



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Efeitos biológicos de citrato de ródio II livre e de sua
associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas
em células de carcinoma mamário: estudos *in vitro* e *in vivo***

MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO

Orientadora: Prof³. Dra. Sônia Nair Bão
Co-orientadora: Prof³. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Brasília, 2011

Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Efeitos biológicos de citrato de ródio II livre e de sua
associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas
em células de carcinoma mamário: estudos *in vitro* e *in vivo***

MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO

Tese de doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular, UnB.

Orientadora: Prof³. Dra. Sônia Nair Bão
Co-Orientadora: Prof³ Dra. Zulmira G. M. Lacava

Brasília, 2011

MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO

**EFEITOS BIOLÓGICOS DE CITRATO DE RÓDIO II LIVRE E DE SUA ASSOCIAÇÃO A
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E A MAGNETOLIPOSSOMAS EM CÉLULAS DE CARCINOMA
MAMÁRIO: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof³. Dra. Sônia Nair Bão (IB, UnB)
(Orientadora)

Prof³. Dra. Zulmira Marques Lacava (IB, UnB)
(Co-orientadora)

Prof³. Dra. Mônica Cristina de Oliveira (UFMG)
(membro titular)

Prof³. Dra. Andrea Barreto Motoyama (Faculdade de Saúde, UnB)
(membro titular)

Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva (Embrapa, Brasília)
(membro titular)

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo (IB, UnB)
(membro titular)

Brasília, 14 de fevereiro de 2011

Dedicatória

À Deus Jeová, a maior fonte de sabedoria e conhecimento do universo, por me conceder a oportunidade de concluir esta etapa de minha caminhada com sucesso.

Ao meu marido Walfredo e à minha filha Lara, grandiosos incentivadores do meu trabalho, minhas fontes perenes de inspiração e motivação.

Agradecimentos

À Jeová Deus, por ter me concedido vida e saúde e também oportunidades que tornaram possíveis todo o percurso da minha formação acadêmica e científica.

À Prof.^a Dra. Sônia Bão, pelo seu pleno apoio, incentivo e dedicação na orientação deste estudo!

À Prof.^a Dra. Zulmira Lacava, pelo seu carinho e pelas apropriadas sugestões concedidas ao longo deste trabalho.

Ao prof. Dr. Aparecido de Souza e Eloiza Nunes por terem produzido os compostos utilizados neste estudo e, principalmente, pela assistência e ensinamentos fundamentais e por terem sido sempre tão prestativos!

Ao prof. Dr. Ricardo Azevedo por ter disponibilizado gentilmente seu laboratório para realização de vários experimentos! Obrigada pela confiança e apoio!

À prof.^a Dra. Leonora Vianna pelo apoio essencial nas análises histopatológicas!

Ao prof. Antônio Teixeira por ter autorizado o uso do citômetro de fluxo.

Aos colaboradores do Laboratório de Microscopia Eletrônica, que trabalharam arduamente comigo neste trabalho, entre eles, Raphael Peixoto, Ricardo de Oliveira, Luiza Lourenço e Luís Telles. A contribuição deles foi vital para o sucesso deste trabalho! Muito obrigada queridos!!!

À minha amiga Izabel da Silva, pela sua ajuda fundamental tanto nas análises estatísticas, discussão do desenho experimental e dos resultados! Muito obrigada!!!

Aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia, do grupo de pesquisa do prof. Dr. Ricardo Azevedo, que me ofereceram suporte na execução deste trabalho, especialmente à Graziela Joanitti que foi para mim um modelo de dedicação, garra e persistência! Obrigada querida amiga pelos seus valiosos ensinamentos nos experimentos e

no uso do citômetro de fluxo e pelas conversas edificantes e motivadoras nos momentos de dificuldade e de sucesso!

À D. Zélia pelo apoio e auxílio nas fotografias dos experimentos! Também agradeço por ter sido sempre gentil e prestativa quando precisei de sua ajuda!

A todos os colegas do Laboratório Nanogen, do grupo da prof. Dra. Zulmira Lacava, que me auxiliaram na execução dos experimentos *in vivo*, principalmente, à Flávia Portilho, Ana Luiza Vilela, Luciana Estenarato e Lívia Matos!

À Renatinha e ao prof. José Raimundo Correia pela assistência e auxílio nas análises de microscopia confocal e pelas discussões do trabalho!

Ao meu esposo amado pelo amor, carinho, compreensão e apoios cedidos, principalmente durante a redação desta tese.

À minha mãezinha querida pelo seu imenso amor, apoio, carinho, incentivo e dedicação durante toda a minha vida!

À minha avó por ter me incentivado muito nos estudos escolares que foram a base para eu chegar até aqui!

Ao laboratório Sabin de Brasília, grande incentivador à pesquisa, pela parceria realizada com as análises hematológicas e bioquímicas!

À Universidade Nacional de Brasília (UnB), por ter proporcionado a minha formação e execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal pela bolsa concedida durante os 46 meses do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Financiadora de Estudos e Projetos por terem concedido apoio financeiro neste trabalho!

E, a todos os colegas, amigos e professores que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O aumento da incidência do câncer de mama e suas limitações terapêuticas, atualmente empregadas, suscitam a busca de alternativas terapêuticas mais eficazes. Dentre compostos com potencial terapêutico, o citrato de ródio (II) ($\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$), um membro da família dos carboxilatos de ródio, é promissor por apresentar atividade citotóxica, citostática e antitumoral em células de carcinoma de origem mamária (Ehrlich) e em células tumorais (Y-1) e normais da adrenocortical (AR-1(6)). Contudo, a introdução deste composto em estudos pré-clínicos tem sido limitada devido à sua toxicidade. Nanopartículas de maghemita (NPM) e magnetolipossomas (ML) representam uma plataforma atrativa como sistemas carreadores para entrega de drogas, pois podem agir de forma específica em células tumorais. Portanto, a associação entre $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e NPM ou ML representa uma estratégia potencial para reduzir a toxicidade de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e, assim, melhorar sua ação terapêutica. Nesta pesquisa, reportamos efeitos biológicos de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ livre e do $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ associado a NPM ou ML sobre carcinoma mamário tanto em cultura de células (MCF-7 e 4T1) como em camundongos Balb/c portadores de carcinoma. Células normais (MCF-10A) e camundongos sadios também foram utilizados neste estudo para fins comparativos. O efeito citotóxico de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ livre foi dependente da dose, do tempo e do tipo de linhagem celular. De uma forma geral, este efeito foi mais intenso após 72 h com doses acima de 500 pM e em células normais da mama (MCF-10A) ($p < 0.05$). Os efeitos citotóxicos de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ livre foram evidenciados por alterações morfológicas, como condensação e fragmentação nuclear, formação de *blebbing*, exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática, redução dos filamentos de actina e condensação mitocondrial. Nos tratamentos com 50 pM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ associado a NPM (Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) e a ML (Líp-Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) houve um efeito citotóxico mais pronunciado em células de carcinoma (MCF-7 e 4T1) do que em células normais (MCF-10A) ($p < 0.05$). Além disso, verificou-se que as composições de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ apresentaram atividade antitumoral em camundongos portadores de carcinoma mamário e no grupo de animais tratados com Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ houve maior sobrevida em relação aos animais tratados com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Por meio das análises histopatológicas e ultraestruturais, observou-se que os tratamentos com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ induziram apoptose, necrose e fibrose no tecido tumoral. Também foram notados nestes tecidos NPM no citoplasma e no núcleo celular. Em relação às análises de toxicidade, observou-se linfocitopenia no grupo de animais tratados com Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e aumento da fragmentação do DNA de células da medula óssea em animais tratados com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, mas alterações citostáticas nestas células e bioquímicas (creatinina, ferro sérico, transaminase pirúvica) não foram notadas entre todos os grupos experimentais. De uma forma geral, concluímos que os tratamentos com as composições $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e Lip-Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ apresentaram potencial terapêutico para carcinoma mamário.

Palavras chave: Carcinoma Mamário. Citrato de Ródio (II). Nanopartículas de Maghemita. Magnetolipossomas. Citotoxicidade. Atividade Antitumoral.

SUMMARY

The increase incidence of breast cancer and its therapeutic limitations, currently employed, demand the search for alternative therapies. Among compounds with therapeutic potential, the rhodium (II) citrate ($\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$), a member of the family of rhodium carboxylates, is promising due to its cytotoxic, cytostatic and antitumor activity in mammary carcinoma cells (Ehrlich) and in adrenocortical tumor (Y-1) and normal cells (AR-1(6)). However, the introduction of this compound in preclinical studies has been limited due to its toxicity. Maghemite nanoparticles (NPM) and magnetoliposomes (ML) represent an attractive platform as carrier systems for drug delivery because they can act specifically on tumor cells. Therefore, the association between $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ with NPM or ML represents a potential strategy to reduce the $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ toxicity and to improve its therapeutic action. In this research, we report the biological effects of free $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ and $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ associated with NPM or ML on breast cancer both in cultured cells (MCF-7 and 4T1) and in Balb/c mice bearing carcinoma. Normal cells (MCF-10A) and healthy mice were also used in this study for comparison purposes. The cytotoxic effect of $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ was more intense after 72 h with doses above 500 pM and in normal breast cells (MCF-10A) ($p < 0.05$). The cytotoxic effects of free $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ were evidenced by morphological changes such as nuclear condensation and fragmentation, formation of blebbing, phosphatidylserine exposure on the plasma membrane, reduction of actin and mitochondrial condensation. In treatments with 50 pM $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ associated with NPM (Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) and ML (Lip-Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) the cytotoxic effect was more pronounced in carcinoma cells (MCF-7 and 4T1) than in normal cells (MCF-10A) ($p < 0.05$). Moreover, it was found that $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ and Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ showed antitumor activity in mice bearing breast carcinoma, with increased survival rate in animals treated with Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. By histopathological and ultrastructural analysis, we found that treatment with $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ and Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ induced apoptosis, necrosis and fibrosis in tumor tissue. Also, NPM were found in these tissues both in the cytoplasm and in the nucleus. Regarding the toxicity analysis, lymphocytopenia was observed in animals treated with Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Besides, a slight increase of DNA fragmentation of bone marrow cells was also noted in animals treated with $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, although biochemical and cytostatic alterations were not seen among all groups. In summary, we conclude that treatments with $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ and Lip-Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ compositions showed therapeutic potential for breast carcinoma.

Keywords: Breast Carcinoma. Rhodium (II) Citrate. Maghemite Nanoparticles. Magnetoliposomes. Cytotoxic. Antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 : Estrutura molecular geral do ácido cítrico (a) e citrato de ródio (II) (b).....	22
Figura 2: Representação da ligação química de citrato de ródio (II) com nanopartículas de maghemita.....	27
Figura 3: Representação esquemática das composições antitumorais à base de citrato de ródio (II).....	28
Figura 4: Resumo da estratégia experimental adotada nesta tese.....	35
Figura 5: Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de maghemita por microscopia eletrônica de transmissão.....	54
Figura 6 Efeito de $Rh_2(H_2cit)_4$ sob a viabilidade de células 4T1, MCF-10A e MCF-7 após tratamento por 48 h.....	58
Figura 7: Efeito do tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$ (indicado por Rhodio) nas características morfológicas da população de células MCF-10A, MCF-7 e 4T1 após 48 h de tratamento.....	59
Figura 8: Alterações morfológicas e estruturais induzidas por $Rh_2(H_2cit)_4$ em adenocarcinoma mamário (linhagem MCF-7) após 48 h de tratamento.....	62
Figura 9: Alterações morfológicas e estruturais induzidas por $Rh_2(H_2cit)_4$ em carcinoma mamário (linhagem 4T1) após 48 h de tratamento.....	63
Figura 10: Fragmentação nuclear e redução de filamentos de actina em células de adenocarcinoma mamário (linhagem MCF-7) induzidas por $Rh_2(H_2cit)_4$ após tratamento de 48 horas.....	65

Figura 11: Exposição de fosfatidilserina induzidas por Rh₂(H₂cit)₄ em células de carcinoma mamário (linhagens 4T1 e MCF-7) após 48 horas de tratamento....	66
Figura 12: Efeito citotóxico dos tratamentos com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ em linhagens celulares de carcinoma mamário (MCF-7 e 4T1) e linhagem de células epiteliais da mama normais (MCF-10A).....	68
Figura 13: Crescimento do tumor 4T1 na mama de camundongos BALB/c após transplante ortópico.....	70
Figura 14: Volume tumoral em relação ao tempo de transplante de células tumorais 4T1 em camundongos fêmeas.....	71
Figura 15: Fotomicrografias de tecido mamário de camundongos portadores ou não de carcinoma ortópico.....	72
Figura 16: Efeito de Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ no volume do tumor de carcinoma mamário (linhagem 4T1) em camundongos após 18 dias do transplante tumoral.....	73
Figura 17: Fotomicrografias de carcinoma mamário transplantado na mama de camundongos Balb/c sem (controle) (A-B) ou com tratamento de Rh₂(H₂cit)₄ (C-D) ou com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (E-F) ou com Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (G-I).....	75
Figura 18: Efeito dos tratamentos com Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ sob a média do peso corpóreo de camundongos Balb/c (n=8/grupo) após transplante de carcinoma mamário.....	76
Figura 19: Efeito dos tratamentos com Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ sob o volume tumoral em camundongos Balb/c.....	77
Figura 20: Tempo de sobrevivência de camundongos portadores ou não (sadio) de carcinoma mamário após tratamento com Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ até o 23º dia após o transplante tumoral.....	79

Figura 21: Fotografia dos tumores (carcinoma mamário) na mama de camundongos Balb/c na ausência (A) ou presença de tratamento (B-D).....	80
Figura 22: Fotografia dos tumores (carcinoma mamário) excisados de camundongos Balb/c sob diferentes tratamentos.....	81
Figura 23: Fotomicrografias de tecido mamário de camundongos fêmeas Balb/c.....	81
Figura 24: Fotomicrografias de carcinoma mamário (linhagem 4T1) transplantado na mama de camundongos Balb/c sem tratamento (controle)..	83
Figura 25: Fotomicrografias de carcinoma mamário tratado com Rh₂(H₂cit)₄.....	84
Figura 26: Fotomicrografias de carcinoma mamário tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄.....	85
Figura 27: Fotomicrografias de carcinoma mamário tratado com Magh-v.....	86
Figura 28: Fotomicrografias de glândula mamária de camundongs Balb/c na ausência (A) ou presença de carcinoma mamário transplantado (B-F).....	87
Figura 29: Micrografias eletrônicas da mama de camundongo Balb/c.....	89
Figura 30: Micrografias eletrônicas de carcinoma mamário de camundongo Balb/c do grupo controle (sem tratamento) 23 dias após o transplante de células tumorais da linhagem 4T1.....	90
Figura 31: Micrografias eletrônicas de carcinoma mamário de camundongo Balb/c tratado com Rh₂(H₂cit)₄ 23 dias após o transplante de células tumorais da linhagem 4T1.....	91

Figura 32: Micrografias eletrônicas de transmissão de carcinoma mamário de camundongo Balb/c tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ 23 dias após o transplante de células tumorais da linhagem 4T1.....	92
Figura 33: Micrografias eletrônicas de transmissão de carcinoma mamário de camundongo Balb/c tratado com Magh-V 23 dias após o transplante de células tumorais da linhagem 4T1.....	93
Figura 34: Níveis bioquímicos de creatinina dosados no soro de camundongos portadores de carcinoma mamário sob os tratamentos descritos.....	96
Figura 35: Níveis bioquímicos de transaminase pirúvica dosados no soro de camundongos portadores de carcinoma mamário sob os tratamentos descritos.....	97
Figura 36: Níveis bioquímicos de ferro sérico dosados no soro de camundongos portadores de carcinoma mamário sob os tratamentos descritos.....	97
Figura 37: Efeito de Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-v sobre a fragmentação do DNA em células da medula óssea de camundongos portadores de carcinoma mamário,98
Figura 38: Efeito de Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ na proliferação de células da medula óssea de camundongos portadores ou não (sadios) de carcinoma mamário.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das etapas dos experimentos “in vivo”	47
Tabela 2: Testes e métodos utilizados para dosagens bioquímicas em camundongos.	51
Tabela 3: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de citrato de ródio II ($Rh_2(H_2cit)_4$), linhagem celular avaliada e o tempo após a aplicação do tratamento.....	57
Tabela 4: Distribuição dos valores aproximados de IC_{50} e de seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) nas linhagens celulares MCF-7, MCF-10A e 4T1 após tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$	58
Tabela 5: Análise de parâmetros associados à patologia de tumores sob diferentes tratamentos.....	88
Tabela 6: Resultado de exames hematológicos de camundongos Balb/c portadores ou não (sadio) de carcinoma mamário após tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$	94
Tabela 7: Efeitos dos tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ na contagem global e diferencial de leucócitos de camundongos Balb/c portadores ou não (sadio) de carcinoma mamário.....	95
Tabela 8: Resumo dos efeitos biológicos de $Rh_2(H_2cit)_4$ livre e associado a NPM e ML em células de carcinoma mamário.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

Anexina V-FITC: anexina conjugada a fluoresceína-5-ísoiocianato

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - Albumina sérica bovina

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CDIS - Carcinoma ductal *in situ*

CLIS - Carcinoma lobular *in situ*

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMEM - Dulbecos's modified Eagle's medium

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilendiaminotetracético bipotássico

INCA - Instituto Nacional do Câncer

Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ - magnetolipossomas associados a citrato de ródio (II).

Magh-Rh₂(H₂cit)₄- nanopartículas de maghemita associadas a citrato de ródio
(II).

MCF-7 - Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano

MCF-10A - Linhagem de células epiteliais da mama humana

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

ML - Magnetolipossomas

MTT - Brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio

NPs - Nanopartículas

NPM - Nanopartículas de maghemita

PBS - Solução tamponada de fosfato

PI - Iodeto de propídeo

PTX - Paclitaxel

$Rh_2(H_2cit)_4$ - Citrato de ródio (II)

SFB - Soro fetal bovino

SFE - Soro fetal equino

SPIOs - Partículas superparamagnéticas de óxido de ferro

ALT -Alanina aminotransferase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	CÂNCER DE MAMA: ORIGEM, INCIDÊNCIA E IMPORTÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA.....	18
1.2	QUIMIOTERAPIA E SUAS LIMITAÇÕES NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA.....	19
1.3	O USO DE COMPLEXOS METÁLICOS NA QUIMIOTERAPIA.....	20
1.3.1	<i>Carboxilatos de ródio</i>	20
1.4	NANBIOTECNOLOGIA VERSUS NANOMEDICINA.....	22
1.4.1	<i>Uso de nanopartículas magnéticas na nanomedicina</i>	23
1.4.2	<i>Uso de magnetolipossomas na nanomedicina</i>	25
1.5	MODELOS EXPERIMENTAIS.....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	MATERIAIS.....	32
4.1.1	<i>Células</i>	32
4.1.2	<i>Animais</i>	32
4.1.3	<i>Composições antitumorais à base de citrato de ródio (II)</i>	33
4.2	MÉTODOS.....	33
4.2.1	<i>Desenho experimental</i>	33
4.2.2	<i>Caracterização dos fluidos magnéticos</i>	35
4.2.3	<i>Experimentos in vitro</i>	36
4.2.4	<i>Experimentos “in vivo”</i>	44
5	RESULTADOS.....	54
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	54
5.2	Experimentos <i>IN VITRO</i>	55
5.2.1	<i>Viabilidade celular: relação da citotoxicidade de citrato de ródio (II)</i>	55
5.2.2	<i>Avaliação das alterações morfológicas e estruturais induzidas por $Rh_2(H_2Cit)_4$ em linhagens celulares de carcinoma: 4T1 e MCF-7</i>	60
5.2.3	<i>Citotoxicidade de citrato de ródio (II) associado a nanocompostos: $Rh_2(H_2Cit)_4$ induz aumento do número de células positivas para anexina-V FITC</i>	67
5.3	Experimentos <i>IN VIVO</i>	69
5.3.1	<i>1ª Etapa - Determinação da progressão e padrão de crescimento do tumor 4T1 na glândula mamária de camundongos Balb/c</i>	69
5.3.2	<i>2ª Etapa - Avaliação da atividade antitumoral de $Rh_2(H_2Cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e de Lip-Magh-$Rh_2(H_2cit)_4$ em camundongos portadores de carcinoma mamário: experimento piloto</i>	73
5.3.3	<i>3ª Etapa - Atividade antitumoral de $Rh_2(H_2Cit)_4$ e de Magh-$Rh_2(H_2Cit)_4$ em camundongos portadores de carcinoma mamário</i>	76
6	DISCUSSÃO.....	101
6.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	101
6.2	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	102

6.2.1	<i>Considerações sobre a citotoxicidade de citrato de ródio (II) livre.....</i>	102
6.2.2	<i>Considerações sobre a citotoxicidade de $Rh_2(H_2cit)_4$ associado a NPM e a ML.....</i>	106
6.3	ENSAIOS IN VIVO.....	108
6.3.1	<i>Considerações sobre a progressão e padrão de crescimento ortópico do tumor 4T1 e modelos experimentais.....</i>	108
6.3.2	<i>Considerações sobre atividade antitumoral de $Rh_2(H_2cit)_4$ e de Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$....</i>	109
6.3.3	<i>Considerações sobre toxicidade de $Rh_2(H_2cit)_4$ e de Magh-$Rh_2(H_2cit)_4$.....</i>	112
7	CONCLUSÃO.....	117
8	REFERÊNCIAS.....	120
ANEXO A	130
ANEXO B	131
	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO CITRATO DE RÓDIO ^{II}	131
ANEXO C	135
	OBTENÇÃO DE FLUIDO MAGNÉTICO ESTABILIZADO COM CITRATO DE RÓDIO (II) E SUA CARACTERIZAÇÃO	135
ANEXO D	139
	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MAGNETOLIPOSSOMAS.....	139

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama: origem, incidência e importância na saúde pública

O processo de carcinogênese mamária é resultado de sucessivas alterações proliferativas que originam lesões hiperplásicas na unidade ducto-lobular da mama. Estas lesões são classificadas como hiperplasia ductal típica e atípica, hiperplasia lobular atípica, carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e o carcinoma lobular *in situ* (CLIS), sendo os últimos (CDIS e CLIS) tumores confinados em ductos ou lóbulos. O CDIS, que se desenvolve dentro do sistema ductal, é caracterizado por uma extensa proliferação das células epiteliais do ducto mamário e é bastante comum entre as mulheres com câncer de mama (TAVASSOÉLI e DEVILEE, 2003; LEONARD e SWAIN, 2004).

Os carcinomas mamários podem, ainda, ser chamados de adenocarcinoma quando, além de apresentar alterações nas células epiteliais dos ductos, também apresentam alterações no padrão de crescimento glandular. A maioria dos tumores de mama é classificada em adenocarcinoma (ROBBINS e COTRAN, 2005).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente e a maior causa de morte entre mulheres portadoras de câncer no mundo. Mais de 410.000 mortes são estimadas a cada ano, devido à elevada capacidade metastática deste tipo de câncer (COUGHLIN e EKWUEME, 2009). De acordo com as estimativas, realizadas pelo INCA (Instituto Nacional do Cancer), 49.400 novos casos de câncer de mama são previstos em 2010, com risco estimado de 49 casos a cada 100 mil habitantes no Brasil. Na Região Sudeste, este tipo de câncer é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 novos casos por 100 mil habitantes. O câncer de mama, excluindo os tumores de pele não melanoma, também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (64/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (30/100.000). Na Região Norte este câncer é o segundo tumor mais incidente (17/100.000) (INCA, 2011).

Nos Estados Unidos da América (EUA), o câncer de mama, em mulheres, é também o mais comum entre as mulheres, excluindo o câncer de pele não melanoma. A probabilidade de sobrevivência em mulheres que desenvolvem câncer

de mama, nos EUA, é de 12%. Cerca de 54.010 novos casos de CDIS serão diagnosticados e 39.840 casos de óbitos foram estimados para o ano de 2010 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011). Devido à crescente incidência, mortalidade e ao elevado custo do tratamento desta doença, o câncer de mama representa um grave problema de saúde pública em todo o mundo.

1.2 Quimioterapia e suas limitações no tratamento de câncer de mama

As modalidades terapêuticas, convencionalmente, empregadas para o câncer de mama, tais como quimioterapia, radioterapia, cirurgia e hormonioterapia são ineficazes quando a doença não é detectada precocemente. Este fato demanda um contínuo desenvolvimento de alternativas terapêuticas que possam tratar esta doença de forma mais efetiva e, ao mesmo tempo, de maneira menos invasiva (DHANKHAR *et al*, 2010).

Atualmente, a maioria dos quimioterápicos age tanto em células tumorais como em células normais e isto causa toxicidade sistêmica e efeitos indesejáveis ao organismo. Isto ocorre porque os quimioterápicos agem mais intensamente em células saudáveis do que em células cancerígenas (BRANNON-PEPPAS e BLANCHETTE, 2004). Além disso, a rápida eliminação e ampla distribuição de quimioterápicos em tecidos não alvos requerem sua administração em grande quantidade, o que é impraticável devido à toxicidade inespecífica inerente dos agentes quimioterápicos (GU *et al*, 2007). Outra limitação da quimioterapia convencional é a resistência do tumor à droga (COUVREUR e VAUTHIER, 2006),

Assim, a ineficiência e efeitos indesejáveis advindos da quimioterapia são causados, principalmente, pela formulação e farmacocinética dos quimioterápicos. Por outro lado, seu sucesso depende da liberação controlada destes fármacos dirigida especificamente às células cancerígenas, com uma dose suficientemente segura para o organismo por um longo período de tempo (FENG, 2004; PENG *et al*, 2008).

Neste sentido, o desenvolvimento de estratégias que permitem entregar agentes antitumorais, de forma seletiva, sem afetar tecidos saudáveis, bem como,

tratar o tumor de forma menos invasiva ao organismo, representa uma das áreas de grande interesse na pesquisa contra o câncer.

1.3 O uso de complexos metálicos na quimioterapia

O uso medicinal de metais é conhecido há quase 5000 anos (ORVIG e ABRAMS, 1999) e seu uso terapêutico no câncer é relatado desde o século XVI. Porém, estes materiais ficaram esquecidos até 1960 quando a atividade antitumoral da cisplatina, um complexo metálico, foi descoberta. A atividade antitumoral da cisplatina está relacionada à sua capacidade de induzir morte celular por meio da formação de ligações covalentes cruzadas com bases adjacentes de guanina do DNA, impedindo processos fundamentais como a transcrição e outros eventos relacionados (ROSENBERG *et ai*, 1969; PASETTO *et ai*, 2006).

Com o excelente potencial da cisplatina para uso farmacêutico, as propriedades de coordenação e “redox” dos seus íons foram extensivamente estudadas. Descobriu-se, assim, que centros metálicos, sendo positivamente carregados, favorecem a ligação de biomoléculas carregadas negativamente com constituintes de proteínas e ácidos nucléicos (ZHANG e LIPPARD, 2003). Todavia, a eficácia terapêutica da cisplatina é limitada por que ela induz elevada toxicidade no organismo, levando à ocorrência de efeitos colaterais severos e também devido à quimioresistência adquirida por células tumorais (ZHANG e LIPPARD, 2003; ZHAO e LIN, 2005).

1.3.1 Carboxilatos de ródio

A descoberta de novos complexos metálicos que apresentem atividade citotóxica similar à cisplatina, porém com menor toxicidade que esta droga, poderia representar uma melhor eficácia terapêutica no tratamento de câncer. São relatados vários agentes metálicos que apresentam propriedades antitumorais em linhagens celulares resistentes à cisplatina, tais como complexos de rutênio, ródio e cobre.

Contudo, a introdução desses complexos, em testes clínicos, tem ocorrido lentamente devido aos seus elevados índices de toxicidade (ZHANG e LIPPARD, 2003).

Entre os complexos citados acima, carboxilatos de ródio constituem uma classe de compostos metálicos de transição com promissoras propriedades antitumorais. Estudos mostraram que carboxilatos de ródio (II) (fórmula geral $[Rh_2(O_2CR)_4]$), exibem significativa atividade carcinostática em tumores L1210, carcinoma ascítico de Ehrlich, sarcoma 180 e P388 e melanoma B16 (KATSAROS e ANAGNOSTOPOULOU, 2002).

No entanto, o mecanismo de ação pelo qual carboxilatos de ródio exercem suas atividades biológicas ainda não foi bem elucidado, mas investigações têm sido realizadas para esclarecer as interações entre os carboxilatos de ródio (II) e moléculas biológicas. Acredita-se que a atividade antitumoral destes complexos pode estar, em parte, associada a um mecanismo de inibição de síntese de DNA e proteínas, de maneira similar ao que ocorre com a cisplatina (KATSAROS e ANAGNOSTOPOULOU, 2002). Ainda, foi demonstrado que carboxilatos de ródio (II) podem interromper a síntese e transcrição do DNA porque podem fazer ligações diretas com átomos de nitrogênio, enxofre, oxigênio e fósforo estabilizando nucleotídeos no DNA, o que indica seu potencial para uso na quimioterapia (HOWARD, SPRING e BEAR, 1976; CHIFOTIDES e DUNBAR, 2005).

1.3.1.1 *Citrato de ródio (II)*

Citrato de ródio (II) ($Rh_2(H_2cit)_4$), um membro da família dos carboxilatos de ródio, é um complexo dinuclear formado pela ligação em ponte de quatro íons citrato a uma unidade dimetalica $Rh^{2+}-Rh^{2+}$. A nomenclatura deste composto proposta é tetrakis(p-0,0-citrato) de dirródio (II). Este complexo possui uma cadeia fechada composta por duas moléculas de ródio ligadas a água na sua posição axial e por quatro grupos radicais constituídos por citrato. Os grupos citrato são constituídos, por sua vez, por três carboxilas que podem estar tanto nas posições alfa (a) como beta (P) (Figura 1).

Foi demonstrado que este tipo de carboxilato de ródio apresentou atividade citotóxica, citostática e antitumoral em células de carcinoma de origem mamária

(Ehrlich) e em células tumorais (Y-1) e normais da adrenocortical (AR-1(6)) (ZYNGIER, KIMURA e NAJJAR, 1989). Apesar do $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cit})_4$ ter apresentado toxicidade para células normais, sua menor toxicidade em relação aos análogos de carboxilatos de ródio (II) indica $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cit})_4$ como promissor agente para quimioterapia (KATSAROS e ANAGNOSTOPOULOU, 2002). Contudo, poucos estudos têm sido realizados para explorar seu potencial.

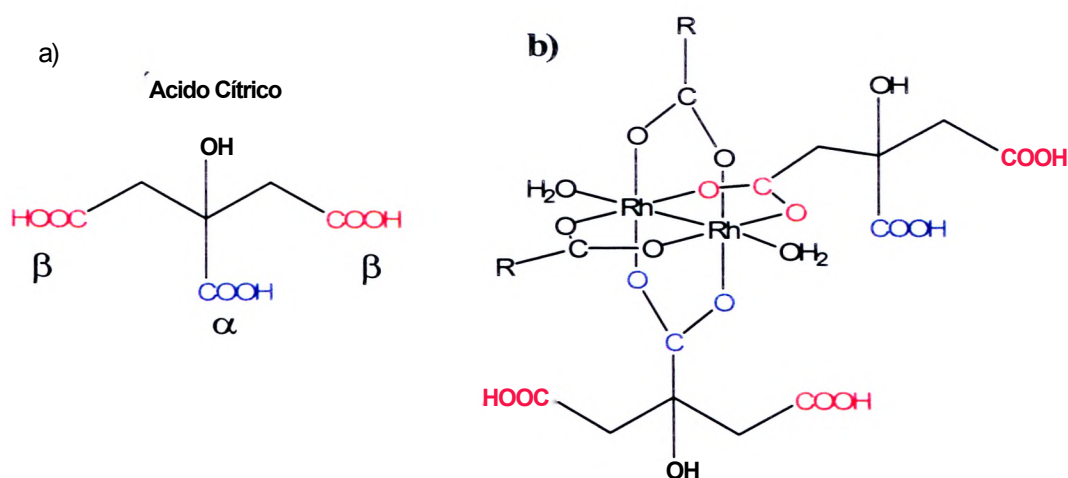


Figura 1 : Estrutura molecular geral do ácido cítrico (a) e citrato de ródio (II) (b) Os grupos carboxílicos do ácido cítrico são observados nas posições α e β . Na representação (b) pode ser visualizado que a coordenação com o centro dimetálico de ródio pode ocorrer com ambos os grupos.

1.4 Nanobiotecnologia versus nanomedicina

Uma revolução na medicina, iniciada neste século, convergindo pesquisas interdisciplinares, originou um inovador campo da ciência com promissoras aplicações biomédicas: a nanobiotecnologia. Este campo da ciência refere-se a tecnologias em que materiais, que são manipulados à escala atômica e molecular, exibem propriedades físicas, químicas e biológicas inovadoras em função do seu tamanho, que varia entre 1 a 100 nanômetros (CHAN, 2006).

Ao longo da última década a nanobiotecnologia permitiu o desenvolvimento de importantes ferramentas com finalidades terapêuticas, oferecendo soluções para as atuais limitações no diagnóstico, no tratamento e na conduta clínica de doenças humanas (GU *et al.*, 2007; MALAM, LOIZIDOU e SEIFALIAN, 2009). Dentre as

diversas aplicações da nanobiotecnologia para a saúde humana, área conhecida como nanomedicina, destaca-se seu uso na regeneração de tecido (ZHANG e WEBSTER, 2009), em sistemas de liberação controlada de princípios ativos tais como fármacos em geral, hormônios e vacinas (YOKOYAMA, 2005) e como agentes de contraste de imagens de ressonância magnética (MCCARTHY e WEISSLEDER, 2008).

Dentre as formas de veiculação e liberação controlada de quimioterápicos destacam-se as baseadas em nanogéis, nanoemulsões, lipossomas, dendrímeros, nanotubos de carbono e nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas) poliméricas ou metálicas (RAWAT, SINGH e SARAF, 2006; YIH e AL-FANDI, 2006; LACERDA *et al*, 2007; TORCHILIN, 2007).

As principais vantagens do uso desses nanosistemas, em relação às prescrições de fármacos convencionais, são aumento da dose no sítio específico, aumento da estabilidade e da meia-vida, diminuição da toxicidade, direcionamento específico a alvos celulares, menor número de aplicações da droga, possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas ou hidrofóbicas ou de biomoléculas alvo, elevada área de superfície para ligação de biomoléculas e maior retenção e permeabilidade no tumor. Todas estas vantagens resultam em maior eficácia e minimização de reações adversas em comparação com quimioterápicos convencionais (DOUZIECH-EYROLLES *et al*, 2007; GU *et al*, 2007; MCBAIN, YIU e DOBSON, 2008). Em virtude destas vantagens, têm-se observado, nos últimos anos, elevados investimentos e um aumento crescente do número de patentes e publicações relacionadas ao enorme interesse científico na área de nanociência,

1.4.1 Uso de nanopartículas magnéticas na nanomedicina

Partículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIOs) consistem de óxido metálico baseados em ferritas que apresentam propriedade magnética tais como magnetita (Fe_3O_4) ou maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Para formar suspensões coloidais estáveis as SPIOs precisam ser dispersas em líquidos carreadores polares ou não polares, a depender do sistema utilizado. Este conjunto (SPIOs e líquidos

carreadores) forma os denominados fluidos magnéticos ou ferrofluidos que consistem de SPIOs dispersas em suspensões coloidais estáveis responsáveis por evitar a agregação das SPIOs (XU e SUN, 2009).

Ainda, para que SPIOs sejam consideradas biocompatíveis, elas devem ser biodegradáveis, hemocompatíveis e não tóxicas ao organismo. Dessa forma, é necessário que elas sejam recobertas por materiais biocompatíveis e estáveis tais como dextrana, citrato, ácido poliaspártico, albumina, fosfolipídios, entre outros (DOUZIECH-EYROLLES *et al.*, 2007; MCBAIN, YIU e DOBSON, 2008; MCCARTHY e WEISSLEDER, 2008). Além disso, a cobertura de SPIOs pode servir como suporte para biomoléculas que conferem sua especificidade para sítios alvos tais como íons específicos, nucleotídeos, peptídeos, açúcares e anticorpos os quais atuam, por exemplo, direcionando SPIOs para células cancerígenas (CHEN *et al.*, 2008; MCCARTHY e WEISSLEDER, 2008).

O uso de SPIOs têm se revelado bastante promissor no tratamento e diagnóstico de câncer sendo, assim, usadas em sistemas de liberação de drogas (NAMDEO *et al.*, 2008), na magnetohipertermia (LATORRE e RINALDI, 2009), como contraste de imagens de ressonância magnética (MCCARTHY e WEISSLEDER, 2008) e na rotulagem e separação celular (OLSVIK *et al.*, 1994). Inclusive, já existem algumas formulações de SPIOs que se encontram em fases avançadas de testes clínicos (GRADISHAR *et al.*, 2005; JOHANNSEN *et al.*, 2005; MAIER-HAUFF *et al.*, 2007).

Assim, uma diversidade de drogas antitumorais vem sendo utilizada nessas pesquisas, como doxorubicina (WIDDER *et al.*, 1983; ASADISHAD, VOSSOUGH e ALAMZADEH, 2010), metotrexato (KOHLENER *et al.*, 2005), tamoxifeno (DREADEN *et al.*, 2009) e paclitaxel (GRADISHAR *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2010).

As propostas desses tipos de formulações têm por objetivo principal melhorar a eficácia terapêutica de quimioterápicos no sentido de reduzir as doses aplicadas e, com isso, seus efeitos colaterais, visto que uma das propriedades mais particulares de SPIOs é que elas apresentam maior permeabilidade e retenção, especialmente no tecido tumoral (MAEDA *et al.*, 2000; BRIGGER, DUBERNET e COUVREUR, 2002).

SPIOs ainda podem ser usadas na magnetohipertermia sinergicamente com a quimioterapia. Esta estratégia terapêutica é baseada na lise de células tumorais que são mais suscetíveis ao aumento da temperatura (42 a 45°C) do que células

normais. Neste caso, a susceptibilidade magnética das SPIOs é explorada, já que o processo de lise de células tumorais, devido ao aumento de temperatura, provém da agitação destas partículas quando expostas a um campo magnético de frequência alternada (GUEDES *et al.*, 2004; HILGER, HERGT e KAISER, 2005). Estes efeitos vantajosos das SPIOs podem contribuir para redução de efeitos colaterais de quimioterápicos, podendo também atuar como co-adjuvantes e, assim, promovendo um maior sucesso na terapia.

Além disso, é descrito na literatura que SPIOs podem ser guiadas ou localizadas em um sítio específico por meio de um campo magnético externo, o que pode aumentar significativamente a eficiência de quimioterápicos associados a SPIOs no sítio de interesse (SAIYED, TELANG e RAMCHAND, 2003; FENG, 2004).

1.4.2 Uso de magnetolipossomas na nanomedicina

Lipossomas são vesículas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de lipídios, um ou multilamelares, que se organizam espontaneamente em sistemas de fase aquosa. Devido à sua alta biocompatibilidade e sua natureza versátil, os lipossomas também têm sido associados à SPIOs, resultando nos denominados magnetolipossomas. Por estas estruturas apresentarem natureza magnética, elas apresentam um vasto campo de aplicação, incluindo seu uso como agentes em imagens de ressonância magnética, na hipertermia do câncer e em sistemas de entrega de drogas (SOENEN, HODENIUS e DE CUYPER, 2009),

O uso de lipossomas é uma alternativa promissora para melhorar a interação entre as células de interesse e nanopartículas, por eles terem composição química semelhante à de membranas biológicas. Outro fator interessante para o uso desses sistemas baseia-se no fato de que lipossomas, de uma forma geral, são biologicamente inertes, não apresentando considerável toxicidade celular. Em decorrência dessas vantagens, os lipossomas têm sido investigados como importantes sistemas para o transporte/entrega de uma série de moléculas com características lipofílicas e/ou hidrofílicas. Também é possível adicionar ligantes à superfície lipossomal que apresentem afinidade por receptores específicos de

normais. Neste caso, a susceptibilidade magnética das SPIOs é explorada, já que o processo de lise de células tumorais, devido ao aumento de temperatura, provém da agitação destas partículas quando expostas a um campo magnético de frequência alternada (GUEDES *et al.*, 2004; HILGER, HERGT e KAISER, 2005). Estes efeitos vantajosos das SPIOs podem contribuir para redução de efeitos colaterais de quimioterápicos, podendo também atuar como co-adjuvantes e, assim, promovendo um maior sucesso na terapia.

Além disso, é descrito na literatura que SPIOs podem ser guiadas ou localizadas em um sítio específico por meio de um campo magnético externo, o que pode aumentar significativamente a eficiência de quimioterápicos associados a SPIOs no sítio de interesse (SAIYED, TELANG e RAMCHAND, 2003; FENG, 2004).

1.4.2 Uso de magnetolipossomas na nanomedicina

Lipossomas são vesículas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de lipídios, uni ou multilamelares, que se organizam espontaneamente em sistemas de fase aquosa. Devido à sua alta biocompatibilidade e sua natureza versátil, os lipossomas também têm sido associados à SPIOs, resultando nos denominados magnetolipossomas. Por estas estruturas apresentarem natureza magnética, elas apresentam um vasto campo de aplicação, incluindo seu uso como agentes em imagens de ressonância magnética, na hipertermia do câncer e em sistemas de entrega de drogas (SOENEN, HODENIUS e DE CUYPER, 2009).

O uso de lipossomas é uma alternativa promissora para melhorar a interação entre as células de interesse e nanopartículas, por eles terem composição química semelhante à de membranas biológicas. Outro fator interessante para o uso desses sistemas baseia-se no fato de que lipossomas, de uma forma geral, são biologicamente inertes, não apresentando considerável toxicidade celular. Em decorrência dessas vantagens, os lipossomas têm sido investigados como importantes sistemas para o transporte/entrega de uma série de moléculas com características lipofílicas e/ou hidrofílicas. Também é possível adicionar ligantes à superfície lipossomal que apresentem afinidade por receptores específicos de

células tumorais, direcionando o fármaco, exclusivamente, aos tecidos desejados. Isso aumenta a eficácia terapêutica do fármaco associado ou encapsulado ao lipossomo e reduz seus efeitos colaterais em relação a fármacos convencionais (RAWAT, SINGH e SARAF, 2006; SOENEN, HODENIUS e DE CUYPER, 2009).

A utilização de lipossomas, como vetores de agentes antitumorais abre perspectivas para o tratamento do câncer, pois, além deste tipo de sistema poder reduzir a toxicidade de agentes quimioterápicos, ele ainda permite a redução da dosagem do quimioterápico no organismo (SCHWENDENER, 2007; CINTRA *et al*, 2009). Além desta abordagem, é possível, ainda, a associação de fármacos com efeitos farmacológicos semelhantes, gerando assim uma resposta sinérgica (MALAM, LOIZIDOU e SEIFALIAN, 2009).

1.4.2.1 Associação de citrato de ródio (II) a nanopartículas de maghemita e magnetolipossomas

Citrato de ródio (II) apresenta oito ácidos carboxílicos livres (R-COOH) em sua estrutura, sendo dois para cada um dos seus quatro radicais (**Figura 2**). Estes grupos funcionais (R-COOH) podem estabelecer interações físicas e químicas quando usados em reações com determinadas moléculas ou superfícies iônicas. Devido à similaridade entre os grupos funcionais de (-COOH e -OH) e os de moléculas bioativas (presentes em ácidos orgânicos, aminoácidos, carboidratos, etc.), estes têm sido utilizados para funcionalizar SPIOs (GUPTA e GUPTA, 2005).

Desta forma, o grupo citrato possui capacidade de funcionalizar SPIOs para promover a estabilidade de suspensões coloidais biocompatíveis e estáveis, tornando-as adequadas para aplicações em sistemas de liberação de drogas. Nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_{203}$) também contém sítios ativos e seletivos para íons ou moléculas, denominados trocadores iônicos (**Figura 2**). Assim, os grupos carboxilas livres, presentes na estrutura química do citrato de ródio (II), podem se ligar ao Fe-OH da superfície das nanopartículas, reação que ocorre com a eliminação de água e formação do complexo Fe-OOC-R (**Figura 2**).

SPIOs com apropriada funcionalização da sua superfície, apresentadas nesta Tese como fluidos magnéticos compostos por nanopartículas de maghemita e por magnetolipossomas, representam uma atrativa plataforma como carreadoras em sistemas de entrega de drogas, já que elas podem agir especificamente em células tumorais (NAMDEO *et ai*, 2008). Particularmente, SPIOs constituídas de maghemita têm potencial para aplicações clínicas devido às suas propriedades magnéticas e sua baixa toxicidade (DOUZIECH-EYROLLES *et ai*, 2007).

Portanto, a associação entre $Rh_2(H_2cit)_4$ e SPIOs representa uma estratégia para melhorar a ação terapêutica de $Rh_2(H_2cit)_4$. Nesta Tese, será reportada a citotoxicidade de três promissoras composições antitumorais baseadas em $Rh_2(H_2cit)_4$ livre, em fluidos magnéticos baseados em $Rh_2(H_2cit)_4$ associado a NPM (Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$) e a ML (Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$) tanto em cultura de células como em animais portadores de carcinoma mamário.

Na **figura 3** é mostrado um esquema representativo destas três composições antitumorais. A composição de magnetolipossoma, representada por Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$, é constituída de $Rh_2(H_2cit)_4$ associado a nanopartículas de maghemita e encapsuladas em lipossoma unilamelar.

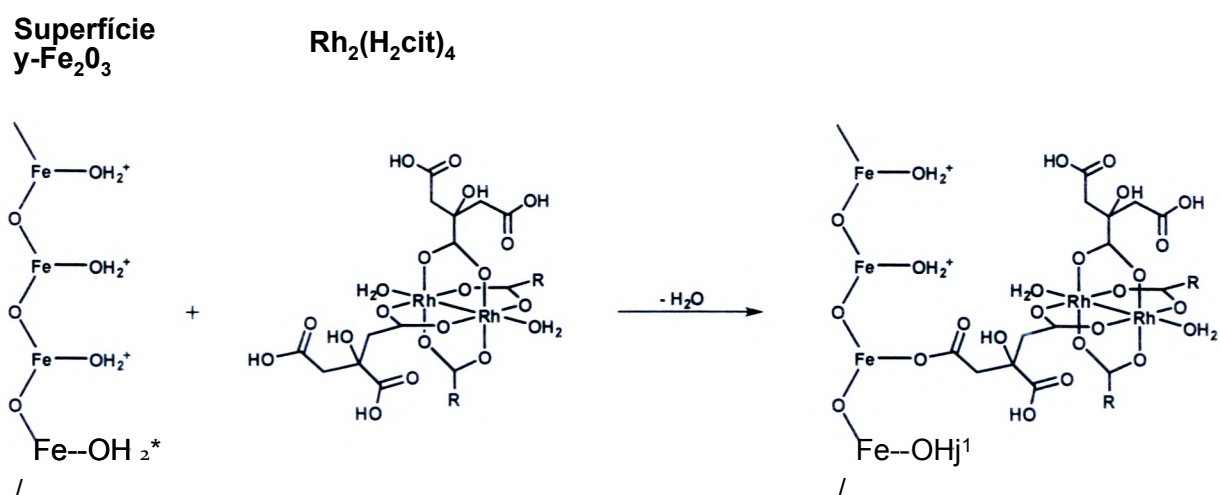


Figura 2: Representação da ligação química de citrato de ródio (II) com nanopartículas de maghemita.

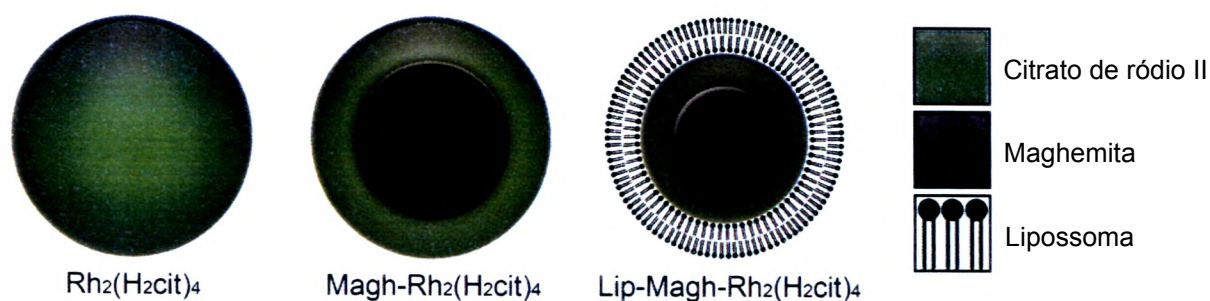


Figura 3: Representação esquemática das composições antitumorais à base de citrato de ródio (II).

$Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ e $Lip-Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ apresentam uma ferramenta potencial para aumentar a especificidade de liberação de $Rh_2(H_2cit)_4$ e, assim, para diminuir seus efeitos tóxicos para células normais. Em nossa pesquisa, estas composições foram usadas a fim de verificar se elas induziam efeito citotóxico diferenciado entre células de carcinoma mamário (MCF-7 e 4T1) e células normais de origem epitelial da mama (linhagem MCF-10A) e também para verificar se elas apresentavam maior eficácia citotóxica e antitumoral em relação ao $Rh_2(H_2cit)_4$ livre.

1.5 Modelos experimentais

A linhagem 4T1 representa um modelo de carcinoma mamário derivado de tumor espontâneo em camundongos Balb/c. Este tumor apresenta características semelhantes a um modelo humano de câncer de mama (estágio IV). Por isso, esta linhagem de células torna-se um modelo experimental apropriado para estudo de câncer de mama humano. Uma das vantagens do uso desta linhagem celular é que células 4T1 são facilmente transplantadas na glândula mamária e isto permite crescimento do tumor no mesmo sítio anatômico daquele em que haveria o desenvolvimento do tumor primariamente (crescimento ortópico). Além disso, assim como ocorre no câncer de mama humano, células da linhagem 4T1 originam a doença metastática, espontaneamente, a partir do tumor primário e isto permite estudos de câncer metastático. Outra grande vantagem de utilização desta linhagem

refere-se ao fato de ela poder ser cultivada *in vitro* e ser tumorigênica, facilitando, assim, os estudos comparativos *in vitro* e *in vivo*. Portanto, esta linhagem celular representa um excelente modelo experimental para estudos de toxicidade e eficácia de agentes antitumorais (PULASKI e OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

Outro modelo usado nesta tese refere-se a células da linhagem MCF-7. Células desta linhagem foram, inicialmente, isoladas de uma efusão pleural de um carcinoma ductal invasivo (estágio IV) e representa um modelo de adenocarcinoma humano (SOULE *et al.*, 1973). Células MCF-7 são aneuplóides e apresentam elevada instabilidade cromossômica e defeito no seu sistema de reparo do ciclo celular (WATANABE *et al.*, 2001) e são sensíveis à apoptose por um mecanismo independente de caspase 3 (IM *et al.*, 2001). Ainda, células MCF-7 expressam moléculas de adesão como a E-caderina e receptores de estrógeno e progesterona, o que a torna um modelo celular com baixa capacidade invasiva e, portanto, baixa capacidade metastática. Outro aspecto favorável ao uso deste modelo celular é que esta linhagem é tumorigênica quando transplantada em linhagens de camundongos imunodeficientes. (KUREBAYASHI *et al.*, 1993). Ainda, o fato de esta linhagem ser de origem humana também favorece estudos comparativos com linhagens murinas como a 4T1. Por isso, células da linhagem MCF-7 também representam um ótimo modelo para estudos de citotoxicidade.

Células da linhagem MCF-10A representam um modelo de células epiteliais que foram isoladas a partir de doença fibrocística da mama e imortalizadas espontaneamente. Esta linhagem corresponde a células epiteliais não tumorais e não tumorigênicas (SOULE *et al.*, 1990). Além disso, células da linhagem MCF-10A apresentam genomas comparáveis com células epiteliais da mama humana e também apresentam controles de proliferação e checagem do ciclo celular intactos (IGNATOSKI *et al.*, 1999; YOON *et al.*, 2002). O modelo de células MCF-10A foi utilizado a fim de se realizar um estudo comparativo entre células normais e tumorais de origem mamária.

Ainda, foram utilizados camundongos imunocompetentes da linhagem Balb/c como modelo experimental *in vivo*.

2 JUSTIFICATIVA

A crescente incidência do câncer de mama e a falta de métodos terapêuticos amplamente eficientes suscitam a busca de alternativas terapêuticas mais eficazes. Embora $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ seja um promissor agente antitumoral, poucos estudos têm sido realizados para explorar seu potencial terapêutico. Ainda, para que as composições antitumorais, investigadas nesta Tese ($\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$), tenham futura aplicabilidade clínica é imprescindível a elucidação dos seus efeitos biológicos tais como de sua biocompatibilidade, toxicidade e atividade citotóxica e antitumoral. Além disso, estes conhecimentos poderão contribuir com os próximos passos para uma associação das nanocomposições ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) com anticorpos monoclonais que tenha como alvo células de câncer de mama. Isto poderia favorecer a maior eficácia citotóxica e antitumoral destas composições devido ao potencial de entrega seletiva proporcionado por um sistema como este.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Investigar efeitos biológicos de $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ em cultura de células normais e de carcinoma da mama e em camundongos portadores de carcinoma.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a morfologia e diâmetro modal de Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

- Determinar a progressão e padrão de crescimento do tumor de carcinoma (linhagem 4T1) na glândula mamária de camundongos Balb/c.

- Verificar se os complexos de $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ induzem, em cultura de células:

- Citotoxicidade em células de carcinoma mamário e epiteliais da mama normais, por meio de análises de viabilidade celular;
 - Alterações morfológicas e estruturais em cultura de células de carcinoma mamário, por meio de microscopia de óptica e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Morte celular por apoptose, por meio de citometria de fluxo.

- Verificar se os complexos de $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ induzem em camundongos portadores de tumor:

- Toxicidade por meio de análises clínicas, histopatológicas, hematológicas, bioquímicas e genotóxicas;
- Efeito antitumoral por meio de avaliações clínicas dos animais e de análises histopatológicas;
- Aumento da sobrevivência dos animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Células

A linhagem celular MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC® HTB-22TM) e a linhagem 4T1 (carcinoma mamário murino) foi cedida pela Prof³. Dra. Suzanne Ostrand-Rosenberg (Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de Baltimore; Maryland-EUA, ATCC® CRL-2539TM). A cultura de células da linhagem MCF-10A (célula epitelial de dueto mamário normal) foi cedida pela Prof³. Dra. Maria Mitzi Brentani (Departamento de Radiologia, Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo - Brasil; (ATCC® CRL 1037TM).

4.1.2 Animais

Camundongos fêmeas isogênicos da linhagem BALB/c (12 semanas), utilizados neste estudo, foram comprados do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Unicamp (Campinas-SP). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório Nanogen (UnB) em gaiolas de plástico contendo serragem e com fornecimento de água e ração *ad libitum*. Os camundongos foram mantidos à temperatura controlada (23°C) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Brasília (UnBDOC n° 104934/2008 consta no **anexo A**).

4.1.3 Composições antitumorais à base de citrato de ródio (II)

O complexo de $Rh_2(H_2cit)_4$ e o fluido magnético composto por Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ foram sintetizados e caracterizados pela mestre Eloiza da Silva Nunes, sob orientação do Prof. Dr. Aparecido Ribeiro de Souza. Ambos os pesquisadores realizaram a síntese e caracterização das amostras no Instituto de Química da UFG, localizada em Goiânia. Um resumo da síntese e da caracterização física e química destas composições encontra-se nos **anexos B e C**.

A encapsulação de Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ em lipossomas (Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$) foi feita pela Dra. Andreza Simioni, sob orientação do Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco (Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Departamento de Química, USP). A composição lipídica do lipossoma, usado para encapsulação de Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$, é basicamente constituída de derivados de L-a-fostatidilcolina ou de 1,2-diacil-sn-glicerol-3-fostatidilcolina. Um resumo deste processo encontra-se no **anexo D**.

4.2 Métodos

4.2.1 Desenho experimental

Um resumo da estratégia experimental deste trabalho pode ser verificado na Figura 4. Inicialmente, foram investigados os efeitos citotóxicos de $Rh_2(H_2cit)_4$ em diferentes linhagens celulares utilizando diferentes doses e tempos de tratamento. Para avaliação de citotoxicidade, foram utilizados um método que avalia atividade metabólica celular (MTT - brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) e outro que avalia a integridade da membrana plasmática (PI - iodeto de propídio). Ainda nos estudos *in vitro* foram feitas análises morfológicas e estruturais por meio de microscopia óptica e eletrônica em células tratadas com $Rh_2(H_2cit)_4$. Também se realizou uma análise para verificar morte celular induzida por $Rh_2(H_2cit)_4$ por meio de citometria de fluxo utilizando os marcadores anexina V-FITC (Fluoresceína-5-

isotiocianato) e PI (**Figura 4**: ensaios *in vitro*). Com estes resultados, foi possível delimitar uma dose apropriada para associação de citrato de ródio (II) a nanopartículas magnéticas (50 pM).

Posteriormente, o modelo experimental de carcinoma mamário, proveniente da linhagem 4T1, foi validado visto que se obteve com sucesso a implantação do tumor na glândula mamária de camundongos e delimitou-se o tempo de desenvolvimento e o comportamento do tumor nos animais. Então, foi realizado um experimento piloto para avaliar se $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ induzia atividade antitumoral em camundongos (n=3/grupo). Com isto, foi determinada uma estratégia de tratamento e definida a dose dos complexos para serem usados no próximo experimento com maior replicata (n=8/grupo). Doravante, neste experimento, estes animais foram submetidos a vários tipos de análises para verificar efeitos biológicos dos complexos de $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ associados à sua toxicidade e atividade antitumoral (**Figura 4**: ensaios *in vivo*).

A fim de se escolher a dose de $Rh_2(H_2cit)_4$ para os testes biológicos, adotou-se como referência o estudo feito por Zyngier Kimura, *et ai*, (1989). Estes autores não observaram toxicidade aguda provocada por $Rh_2(H_2cit)_4$ até o 14º dia em doses de até 260 mg/kg deste complexo em camundongos Swiss portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Em nosso experimento, a concentração da solução estoque de $Rh_2(H_2cit)_4$ era de 2,3 mM. Assim, a fim de se identificar uma dose adequada para os testes biológicos, a proposta foi trabalhar com doses em que não havia sido observada toxicidade em animais sadios e portadores de tumor, conforme relatado por Zyngier Kimura, *et ai*, (1989). Para isso, foi feito, inicialmente, um cálculo para determinar doses equivalentes entre as soluções estoques usadas por estes autores (dada em miligrama/kg) e pelo nosso grupo (dada em Molar).

Assim, considerando o valor do peso molecular de $Rh_2(H_2cit)_4$ sendo de 941,74 g/mol, a dose equivalente de 260 mg/kg (dose máxima), utilizada por Zyngier Kimura, *et ai*, (1989), corresponde a 6,9 pM, considerando-se a média do peso corporal do animal de 25 gramas.

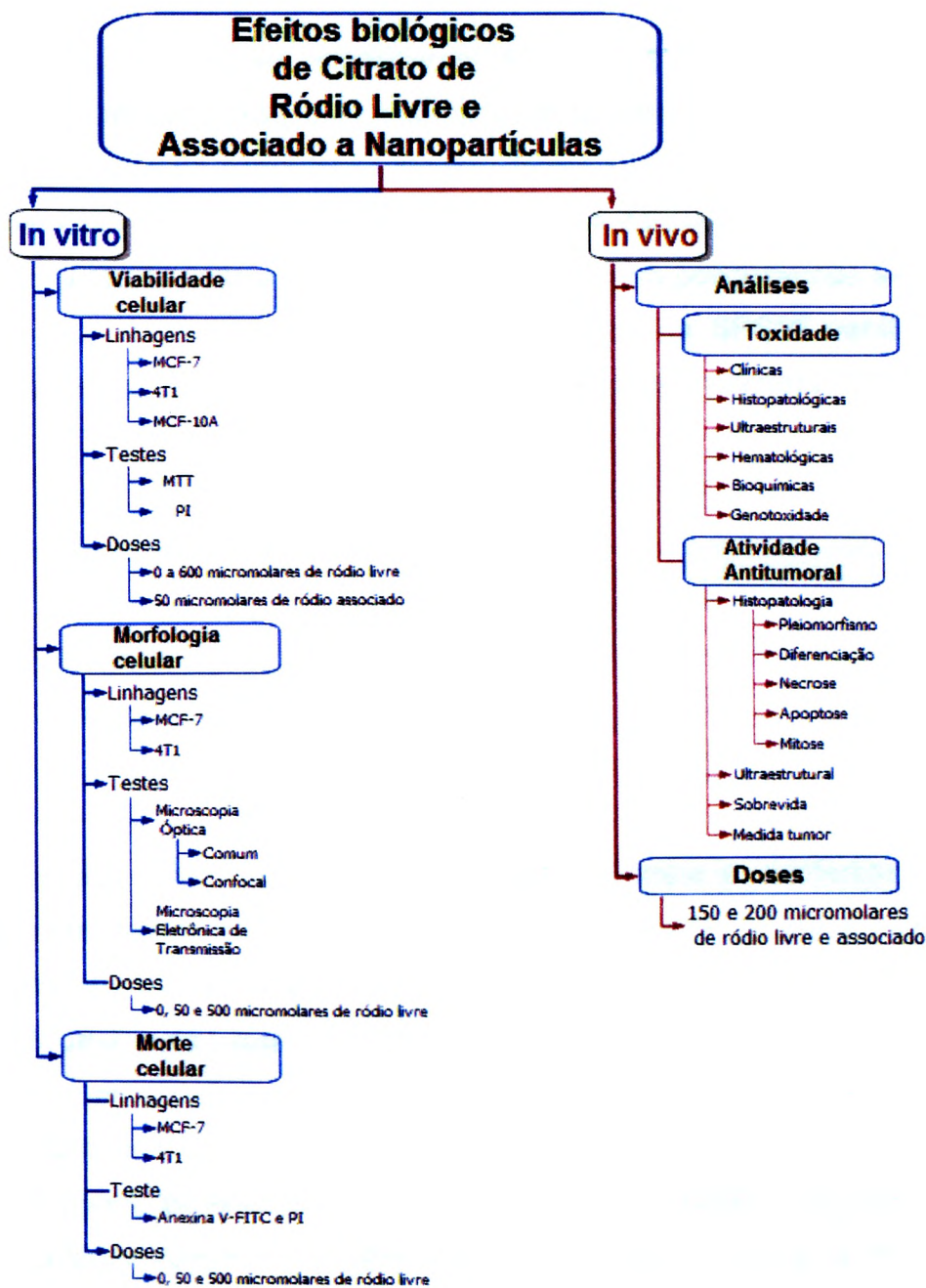


Figura 4: Resumo da estratégia experimental adotada nesta tese.

4.2.2 Caracterização dos fluidos magnéticos

A caracterização morfológica e a mensuração das partículas foram obtidas a partir de MET. As composições antitumorais foram preparadas com a adição de 10

pL de 0,2% de Magh-RH₂(H₂cit)₄ (3,12 X 10¹³ partículas de ferro/mL; 236 pM de ferro) ou de 0,4% de Lip-Magh-RH₂(H₂cit)₄ (1,25 X 10¹³ partículas de ferro/mL; 94,5 pM de ferro) sobre telas de cobre (300 malhas), previamente recobertas com 0,7% de Formvar. As telas foram visualizadas em MET (JEOL 1011, 100 kV) e as fotomicrografias foram obtidas com a câmara Gatan Ultrascan.

Com o auxílio do *software* Image Pro-Plus 5.1 foram avaliadas manualmente 370 nanopartículas e os dados foram ajustados para cálculo do diâmetro modal, cuja distribuição foi obtida utilizando-se o melhor ajuste para polidispersão segundo uma função log normal por meio do *software* de estatística SPSS® versão 17.0. As demais caracterizações químicas e físicas estão descritas no **anexo B**.

4.2.3 Experimentos *in vitro*

4.2.3.1 Cultura e manutenção das células

As células foram estocadas em nitrogênio líquido e, conforme necessário, descongeladas, transferidas para frascos de 25 cm² (TPP, EUA) e mantidas com meio de cultura em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. Células das linhagens MCF-7 e 4T1 foram cultivadas com meio de cultura *Dulbecos's modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO) e células MCF-10A foram cultivadas com uma solução contendo: nutriente mix F12 (Ham's F-12) e DMEM (Sigma); 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal humano (Sigma); 100 ng/mL de toxina colérica (Sigma); 1 mg/mL de insulina bovina (Sigma) e 500 ng/mL de hidrocortisona (Sigma). Os meios de cultura DMEM e DMEM/Ham's F12 foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), no caso das células MCF-7 e 4T1, ou com 10% de soro fetal equino (SFE) para as células MCF-10A (Gibco BRL, Argentina). Ainda, nas três linhagens foi também utilizado 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma).

Os repiques foram feitos quando as células atingiam confluência no frasco de cultura. As células eram então semeadas em densidade inicial já cerca de 30% da confluência, repicadas duas vezes por semana e mantidas em incubadora úmida até

atingirem um número suficiente para os experimentos. Os repiques foram realizados por meio da ação proteolítica de solução 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco, USA) por 4 minutos a 37°C. A seguir, a ação proteolítica era neutralizada pela ressuspensão das células em meio de cultura com soro. O número de células para os experimentos era estimado por meio de contagem direta em câmara de Neubauer e utilizava-se o método de exclusão por azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis.

4.2.3.2 *Tratamento das células*

Uma quantidade inicial de células ($14 \times 10^3/\text{cm}^2$) foi semeada em placas de poliestireno de 6 ou 96 poços (TPP, USA) e mantida sob condições de cultura celular. Transcorridas 24 horas, as células foram tratadas com (1) $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ livre ou (2) $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ associado a nanopartículas de maghemita ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, 23 mM de ferro com 3×10^{15} partículas de ferro/mL) ou (3) $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ associado a magnetolipossomas ($\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, 94,5 mM de ferro com $1,25 \times 10^{16}$ partículas de ferro/mL). Em ambos os tratamentos com estes nanocompostos, foi empregada uma dose equimolar de 50 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Para que fossem fornecidos os mesmos estímulos de crescimento celular, em todos os tratamentos, adotou-se manter o mesmo volume de meio de cultura para todos os grupos experimentais, variando-se apenas o volume da solução de tratamento com água deionizada estéril e composições antitumorais descritas para esse fim, já que este componente é o diluente da solução de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$.

Células sem adição de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e tratadas com NPM (Magh-v ; 23 mM de ferro com 3×10^{15} partículas de ferro/mL) e ML funcionalizados apenas com citrato (Lip-Magh-v ; 94,5 mM de ferro com $1,25 \times 10^{16}$ partículas de ferro/mL) serviram como controle negativo do ensaio. Paclitaxel (PTX), um quimioterápico empregado na clínica, foi utilizado como controle positivo para validar estes modelos experimentais. Também se utilizou DMSO (dimetilsulfóxido; 0,85%) como controle da citotoxicidade causada por paclitaxel, visto este ser seu diluente. Após os tratamentos descritos, as células foram mantidas em incubadora úmida por 24, 48 e 72 horas

4.2.3.3 Análise da viabilidade celular

4.2.3.3.1 Análise metabólica da desidrogenase mitocondrial: método colorimétrico do MTT

Um dos métodos utilizados para avaliar a viabilidade celular foi o método colorimétrico do MTT (Invitrogen), que se baseia na análise da redução do reagente MTT em formazan, pela ação de desidrogenases mitocondriais. A presença destas enzimas ativas é um indicativo de viabilidade celular. Os cristais do corante roxo formazan, formados pela redução do MTT, são quantificados por técnicas de espectrofotometria (HUSASAIN, NOURI *et al*, 1993). Este tipo de análise de viabilidade têm sido largamente utilizada, com acurácia, para avaliar perfis de citotoxicidade de drogas (HEO *et al*, 1990; 1993; NIU, ZHAO e JING, 2001; HAYON *et al*, 2003; AHMADIAN *et al*, 2009).

Após o período de incubação das células com $RH_2(H_2Cit)_4$ o meio de cultura de cada poço (placa de 96 poços) foi substituído por uma solução de meio contendo 0,5 mg/mL de MTT (5 mg/mL em 0,15 M de PBS (tampão de fosfato de sódio: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 2 mM; pH 7,4). Posteriormente, as células foram incubadas por 2,5 horas em incubadora úmida. Em seguida, o meio de cultura com MTT foi removido e, logo, foram adicionados 200 pL de DMSO (Sigma) para solubilizar os cristais de formazan formados. Logo, estes cristais foram quantificados em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices) utilizando comprimento de onda de 595 nm. Os valores de absorbância obtidos foram considerados proporcionais ao número de células viáveis ao final do experimento e convertidos em percentual. Todos os valores dos percentuais foram normalizados com o controle (células sem tratamento) e foi utilizado um controle de DMSO (branco) em três poços sem células para descartar a possibilidade deste reagente interferir na análise.

Nos ensaios contendo os tratamentos com Magh- $RH_2(H_2cit)_4$, Lip-Magh- $RH_2(H_2cit)_4$, Magh-v e Lip-Magh-v foram feitas algumas modificações para evitar uma superestimativa da viabilidade devido ao comum depósito de nanopartículas no fundo do poço. A primeira modificação na técnica foi realizada antes da adição do

MTT, na qual os poços foram lavados, rapidamente, com meio de cultura por uma vez. Outra modificação foi feita após o período de 2,5 h da metabolização do MTT, em que o volume de DMSO foi adicionado, homogeneizado e transferido para outro poço da placa, não utilizado anteriormente. Estas alterações de protocolo permitiram estimar com maior precisão a viabilidade de células tratadas com nanocompostos. A viabilidade celular relativa (%) foi calculada utilizando-se células controle com meio de cultura sem nanopartículas por meio da fórmula $[A]_{\text{tratamento}}/[A]_{\text{controle}} \times 100$, onde [A] representa a absorbância.

4.2.3.3.2 Análise da integridade da membrana plasmática: incorporação de iodeto de propídio avaliada por citometria de fluxo

Para esta análise, as células (5×10^5) foram ressuspensas em 300 μL de PBS após tratamento com 50 e 500 μM com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Em seguida, foram adicionados à suspensão celular 30 μL de solução contendo solução tamponada de fosfato (PBS) e PI (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Logo, as amostras foram ressuspensas e mantidas em temperatura ambiente e protegidas da luz por cinco minutos. Após este período, realizou-se a leitura de 10.000 eventos por amostra em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA-USA). O conteúdo de fluorescência, captada no canal de fluorescência vermelha (FL2) foi representado em um histograma no programa *Cell Quest*TM. Os experimentos foram repetidos duas vezes e foram realizados em triplicatas.

O iodeto de propídio não penetra em células cuja membrana plasmática esteja íntegra. Portanto células com membrana íntegra apresentam baixa fluorescência no canal FL2 (560-580 nm). Em contraste, células cuja membrana esteja rompida permitirão a entrada de PI que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência quando excitadas pelo laser de argônio (488 nm). Assim, esta análise permite quantificar a viabilidade celular já que o rompimento da membrana plasmática demonstra que a célula está em processo de morte celular (PERES, 2005).

4.2.3.4 Análises morfológicas e ultraestruturais de células tratadas com $Rh_2(H_2cit)_4$

4.2.3.4.1 Microscopia óptica

As linhagens celulares, em cultura, após 48 horas de tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$ foram visualizadas e fotografadas em microscópio Axiovert 100 (Zeiss), operado em contraste de fase, para observação das alterações morfológicas induzidas por este tratamento.

4.2.3.4.2 Microscopia confocal

Neste estudo, foi realizada análise do citoesqueleto de actina e do núcleo, por meio de microscopia confocal, utilizando-se os marcadores Faloidina-AlexaFluor-488 e DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), respectivamente. Esta análise foi feita para verificar se as alterações morfológicas, observadas na linhagem MCF-7 por meio da microscopia óptica (contraste de fase), estariam associadas às alterações na distribuição da actina e na fragmentação nuclear nos tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$.

As lamínulas foram previamente lavadas com água destilada, secas e autoclavadas. Em seguida, foram acomodadas no interior dos poços de placas de poliestireno e incubadas com poli-L-lisina (1%) a 4°C *overnight*. Após, as lamínulas foram lavadas com água deionizada estéril e mantidas por 1 hora em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. Logo, as células foram semeadas (5×10^5) nas lamínulas e mantidas por 18 horas para adesão e, após este período, foram realizados os tratamentos com 50 e 500 pM de $Rh_2(H_2cit)_4$ livre por 48 horas ou com PTX (10 nmol/L) por 2 h.

Após o período de tratamento, as células foram fixadas com 3,5% de paraformaldeído, por 10 minutos, em temperatura ambiente e, lavadas com PBS, por três vezes, durante três minutos cada, sempre que se mudou o reagente. A permeabilização das células foi feita com solução de Triton X-100 (0,1%) por 5

minutos. A seguir, as células foram pré-incubadas com 1% de albumina sérica bovina (BSA, diluído em PBS) por 30 minutos. Logo, procedeu-se à incubação das células com solução contendo 2,5% de Faloidina-Alexa-Fluor 488 (solução estoque: 6,6 pmol/L, diluída em metanol) e 1% de BSA, durante 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se às células 1 pg/mL de DAPI (solução estoque: 100 pg/mL em água), por 7 minutos em temperatura ambiente. Para prolongar a fluorescência foi utilizada uma solução contendo 4% de N-propil-galato (0,2 g em 1 mL de PBS e 4 mL de glicerol), e depois as lâminas foram montadas em lâminas, previamente limpas, e vedadas com esmalte de cor clara. Após a secagem das lâminas, as células foram analisadas e fotografadas em microscópio confocal de varredura a laser (Leica SP5).

4.2.3.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise ultraestrutural nos permitiu avaliar as alterações induzidas por $Rh_2(H_2Cit)_4$ em células de carcinoma mamário das linhagens MCF-7 e 4T1. Após 48 horas de tratamento com 50 e 500 pM, as células (1×10^6) foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,2), por duas vezes, durante 10 minutos. Logo, elas foram fixadas em temperatura ambiente, por uma hora, com solução contendo 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído e 3% sacarose diluídas em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2). A seguir, as células foram lavadas duas vezes por 10 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio e pós fixadas por 40 minutos com solução de 2% de tetróxido de ósmio e 1,6% ferrocianeto de potássio, na proporção de 1:1. Posteriormente, estas amostras foram lavadas três vezes em água destilada, por 5 minutos cada e, contrastadas, no escuro, por 12 horas com 0,5% de acetato de uranila a 4°C,

A desidratação das células foi feita utilizando-se gradientes crescentes de acetona (50 a 90%), por 10 minutos e, em seguida, as células foram imersas em acetona pura (100%), três vezes, por 5 minutos cada. Logo após, as células foram infiltradas em solução de acetona 100% e resina Spurr's nas proporções de 2:1 por 12 horas; 1:1 por 6 horas; 1:2 por 12 horas e em resina pura por 6 horas. Em seguida, as amostras foram incluídas com resina Spurr's pura em estufa, a 60°C,

para polimerização. Após 48 horas, os blocos foram seccionados em cortes ultrafinos em ultramicrótomo (Reichert, modelo Supernova) e coletados em telas de cobre (300 malhas). Os espécimes foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM, modelo 1011), operado a 80 kV, e fotografados com câmera Gatan Ultrascan.

4.2.3.5 *Análise de morte celular por meio de citometria de fluxo: quantificação de fosfatidilserina.*

A análise de exposição de fosfatidilserina foi realizada por meio de um ensaio de citometria de fluxo empregando-se o Kit Anexina-V-FITC (Invitrogen, catálogo n.º, PHN1008) e iodeto de propídio (PI) (Sigma). Essa análise permite avaliar a população de células que se encontra no início do processo de apoptose, distinguindo-as das células necróticas (FERLINI *et al*, 1996).

Após o tratamento com 50 e 500 pM de $Rh_2(H_2cit)_4$, as células ($1 \times 10^6/ml$) foram lavadas com PBS, durante 2 minutos. Em seguida, cada amostra foi incubada, por 15 minutos, com solução de 100 pL de tampão de ligação (10 mM de HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM de cloreto de sódio; 2,5 mM de cloreto de cálcio) contendo 5 pL de Anexina-V-FITC (isotiocinato de fluoresceína) e 0,5 pL de iodeto de propídio (5 pg/mL). Nesta etapa, as amostras foram mantidas no escuro e sob temperatura ambiente.

Transcorridos os 15 minutos desta incubação, foram adicionados mais 400 pL de tampão de ligação às células e as amostras foram analisadas dentro de 1 hora. Analisou-se 10.000 células por amostra, em fluxo de cerca de 300 eventos por segundo em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA-USA). O conteúdo de fluorescência, captada no canal de fluorescência verde (FITC) e vermelha (PI), foi plotado em histograma representativo por meio do programa *Cell Quest™*. Os experimentos foram repetidos duas vezes e foram realizados em triplicatas.

4.2.3.6 Análises estatísticas

Para analisar possíveis diferenças na viabilidade das células entre os diferentes tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ realizou-se, inicialmente, um teste de repetibilidade para averiguar o índice de correlação intraclass (ICC) dos experimentos após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Assumido um resultado de boa repetibilidade ($ICC > 0,9$) destes, as variáveis foram testadas quanto ao tipo de distribuição por meio do teste de normalidade de Shapiro Wilk. Logo, a homogeneidade de variâncias foi analisada por meio do teste de Levene. Devido aos valores de significância de p encontrados nos métodos de Shapiro Wilk ($p > 0,05$) e no de Levene ($p > 0,05$) as médias foram analisadas por análise de variância (ANOVA) paramétrica two way (General Linear Model). Ainda, para comparações entre o controle (sem tratamento) e os tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$, em um dado tempo, foi utilizado ANOVA one way com pós teste de Dunnet (bicaudal).

Para avaliar se o tempo e a resposta de cada linhagem eram diferentes, para dados tratamentos, foi realizada uma ANOVA two way. Para isto foram calculados os intervalos de confiança 95% pela estratégia General Linear Model. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$) e as análises foram realizadas com auxílio do software de estatística SPSS® versão 17.0.

Os valores da concentração inibitória (IC_{50}) e seus intervalos de confiança de 95% foram derivados de um modelo de regressão linear, baseado em uma curva dose resposta. Esta análise foi realizada pelo software de estatística GraphPad Prism® versão 5.0.

Para determinar o diâmetro modal das nanopartículas (NP), a distribuição dos seus diâmetros foi obtida utilizando-se o melhor ajuste para polidispersão segundo uma log normal.

4.2.4 Experimentos "in vivo"

4.2.4.1 Transplante das células tu morais 4T1 em camundongos Balb/c

As células de carcinoma mamário (linhagem 4T1) foram descongeladas e cultivadas rotineiramente conforme descrito no item 4.2.3.1. Este procedimento foi realizado com duas semanas de antecedência da data do transplante tumoral nos animais conforme instruções de Pulaski e Ostrand-Rosemberg *et. al* (2000).

Antes do transplante tumoral, os animais foram anestesiados, via intraperitoneal, com uma solução contendo 20 μ L de quetamina (15 mg/kg), 12 μ L de xilasina (5 mg/kg) e 68 μ L de água. Após a anestesia, os animais foram pesados e uma suspensão de 50 μ L contendo 2×10^4 de células 4T1 e meio de cultura (DMEM sem SFB) foram injetadas diretamente na penúltima glândula mamária esquerda dos camundongos, utilizando-se seringa comum de 1 mL. O primeiro dia do experimento correspondeu ao dia em que se realizou o transplante tumoral. Durante todo o experimento, os animais foram monitorados quanto ao desenvolvimento tumoral e às modificações no comportamento. Após o transplante, os experimentos *in vivo* foram realizados em três etapas sucessivas e uma descrição resumida encontra-se na **Tabela 1**.

4.2.4.2 1ª Etapa - Determinação da progressão e padrão de crescimento do tumor 4T1 na glândula mamária de camundongos Balb/c

Para validar a resposta ao transplante ortópico da linhagem celular 4T1 (carcinoma mamário) em camundongos Balb/c e avaliar o crescimento destas células na mama, os camundongos (n=2/grupo) foram sacrificados em intervalos periódicos entre 5 e 21 dias após o transplante tumoral. Nestes períodos, os tumores

de mama foram excisados, mensurados e fixados em formalina tamponada (10%) para avaliação histológica.

4.2.4.3 2ª Etapa - Avaliação da atividade antitumoral de $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e de $Lip-Magh-Rh_2(H_2Cit)_4$ em camundongos portadores de carcinoma mamário: experimento piloto.

Realizou-se um experimento piloto para avaliar se $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ tinham eficácia antitumoral em camundongos Balb/c portadores de tumor 4T1.

Assim, após conhecer a histopatologia do tumor infiltrado na glândula mamária, definiu-se uma estratégia preliminar de tratamento para os animais. Então, neste experimento piloto os animais (n=3/grupo) foram distribuídos em quatro grupos (G1, G2, G3, G4), sendo que todos os animais eram portadores de tumor. O primeiro grupo (G1) portador de tumor transplantado correspondeu a animais sem tratamento; o segundo grupo (G2) correspondeu a animais tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$ livre; o terceiro grupo (G3) foi tratado com Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e o quarto grupo (G4) foi tratado com Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$. A dose de $Rh_2(H_2cit)_4$ utilizada foi de 100 pM.

O sacrifício de todos os animais foi realizado cinco dias após a última aplicação de tratamento, o que totalizou 18 dias de estudo. Com este experimento piloto foi possível delimitar novas estratégias de tratamento para o experimento posterior tais como tempo de aplicação, dose e volume utilizado das composições.

4.2.4.4 3ª Etapa - Avaliação da atividade antitumoral de $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ em camundongos portadores de carcinoma mamário

Neste experimento, os animais (n=8/grupo) foram distribuídos, aleatoriamente, em cinco grupos experimentais, sendo que os grupos um a quatro constituíram animais portadores de tumor e o grupo cinco animais sem tumor. Assim, o grupo um (G1) correspondeu a animais sem tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$

(controle); os grupos dois e três corresponderam, respectivamente, a animais tratados com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cit})_4$ livre (G2) e associado a nanopartículas magnéticas (Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) (G3). O grupo quatro foi constituído de animais tratados com nanopartículas magnéticas sem citrato de ródio (II) (Magh-v) (G4). Já o grupo cinco (G5) foi formado por animais sem tumor e sem tratamento, sendo considerados sadios.

Nos tratamentos com Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cit})_4$ e Magh-vazia a dose final de ferro e de partículas foi de 0,37 M e $2,4 \times 10^{15}$ partículas, respectivamente. No tratamento com Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ foi utilizada uma dose equimolar de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (150 pM) para futuras comparações entre as composições.

Os animais foram anestesiados conforme **item 4.2.4.1**, porém com uma redução no volume das composições aplicadas (50 μL). Os camundongos foram tratados com 50 μL de solução aquosa simples (G1) ou contendo $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (G2) ou Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (G3) ou Magh-v (G4). A injeção dessas composições foi feita na penúltima glândula mamária e aproximadamente a 1 mm do tumor, via subcutânea. Os tratamentos foram realizados três vezes por semana até resultarem em sete aplicações, o que totalizou uma dose de 1050 pM. Na mama dos animais do grupo controle foi injetado 50 μL de água destilada. Os animais sadios não receberam tratamento algum.

Como a dose de cada aplicação de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cit})_4$ neste experimento (150 pM) foi superior ao do experimento piloto (100 pM), realizou-se os tratamentos, nesta etapa, em dias alternados para evitar uma elevada toxicidade diária no organismo dos animais. Assim, decidiu-se realizar o sacrifício dos mesmos vinte e três dias após o transplante do tumor para se obter uma dose total de 1050 pM.

Os camundongos foram anestesiados, pesados e sacrificados por deslocamento cervical. Foi feita uma incisão no abdômen dos animais e, com auxílio de instrumentos cirúrgicos o tumor foi retirado e, em seguida, mensurado e fixado em formalina 10% tamponada.

Tabela 1: Resumo das etapas dos experimentos *in vivo*.

Etapas	Objetivos	Grupos	Tratamentos	Tempos
1 ^a	<p>- Validar o transplante ortópico da linhagem celular 4T1 em camundongos Balb/c.</p> <p>- Avaliar o crescimento de células 4T1 na mama, ao longo do tempo em camundongos Balb/c.</p>	<p>G1: animais saudáveis.</p> <p>G2: animais portadores de carcinoma.</p> <p>(n=2/grupo).</p>	<p>Os animais não receberam tratamento.</p>	<p>3, 5, 7, 9, 11, 13, 18 e 23 dias após transplante tumoral.</p>
2 ^a	<p><u>Experimento piloto:</u></p> <p>- Avaliar se citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas magnéticas e magnetolipossoma induzem atividade antitumoral em camundongos portadores de carcinoma mamário.</p>	<p>G1: controle</p> <p>G2: Rh₂(H₂cit)₄</p> <p>G3: Magh-Rh₂(H₂cit)₄</p> <p>G4: Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄</p> <p>(n=3/grupo)</p>	<p>Rh₂(H₂cit)₄: 600 μM fracionado em 6 aplicações</p> <p>Magh-Rh₂(H₂cit)₄: 300 μM fracionado em 3 aplicações</p> <p>Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄: 300 μM fracionado em 3 aplicações</p> <p>Doses equivalentes de Rh₂(H₂cit)₄</p>	<p>18 dias após transplante tumoral</p>
3 ^a	<p>Avaliar a atividade antitumoral de citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas magnéticas em camundongos portadores de carcinoma mamário.</p>	<p>G1: controle</p> <p>G2: Rh₂(H₂cit)₄</p> <p>G3: Magh-Rh₂(H₂cit)₄</p> <p>G4: Magh-v</p> <p>G5: animais saudáveis</p> <p>(n=8/grupo)</p>	<p>Rh₂(H₂cit)₄: 1050 μM fracionado em 7 aplicações</p> <p>Magh-Rh₂(H₂cit)₄: 1050 μM fracionado em 7 aplicações</p> <p>Doses equivalentes de Rh₂(H₂cit)₄</p>	<p>23 dias após transplante tumoral</p>

4.2.4.5 Toxicidade e atividade antitumoral induzida por $Rh_2(H_2cit)_4$ e de Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ em camundongos Balb/c

Possíveis efeitos tóxicos e antitumoral provenientes dos tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ em camundongos portadores de carcinoma mamário foram avaliados por meio das análises a seguir:

4.2.4.5.1 Análise histopatológica

A análise histopatológica consistiu na avaliação das secções histológicas obtidas do tumor a fim de se verificar possíveis alterações provocadas pelo tratamento, tais como presença de infiltrado inflamatório, infiltrado tumoral, diferenciação e morte celular, pleiomorfismo, frequência de mitose, presença de aglomerados de nanopartículas, entre outros.

A cavidade abdominal dos animais foi exposta e, com auxílio de instrumentos cirúrgicos, o tumor foi coletado. Logo, fragmentos destes tumores (em torno de 5 mm) foram fixados com solução de formalina (10%) por vinte e quatro horas em temperatura ambiente. Em seguida, as peças foram lavadas por duas vezes com solução de álcool 70% e armazenadas em temperatura ambiente por 24 h.

Transcorrido este tempo, realizou-se a desidratação destes fragmentos com álcool 80%, 90% e 100% por 1 hora cada etapa. Logo, esses foram diafanizados em solução de álcool anidro hidratado (100%) e xileno em diluição 1:1 (vol/vol) e com três banhos em xileno com intervalo de 1 hora cada banho. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para parafina purificada (Proquímica) a 56 °C (três banhos com duração de 1 hora cada). Ao término do terceiro banho, os fragmentos de tumores foram emblocados em parafina com auxílio de formas de metal (3 cm * 3 cm) e permaneceram por 18 horas, para solidificação completa da parafina.

As secções semi-seriadas dos tumores, com fragmentos de 2 a 5 p de espessura foram obtidas com um micrótopo modelo Leica RM2125RT. Após desbaste da parafina, foram feitas secções as quais foram distendidas primeiramente em álcool 70% e depois em banho-maria (35°C). Estas secções

foram coletadas com auxílio de um pincel ou palito em lâminas de vidro, previamente limpas e identificadas.

Após a adesão da secção histológica nas lâminas, estas foram mantidas em estufa (37 °C) por 24 horas. Em seguida, foi feita a coloração com técnica de hematoxilina e eosina (H&E) ou Perls em três lâminas (uma de cada plano de corte). Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz (modelo Zeiss Axiophot) e fotografados com auxílio de uma câmera fotográfica (MC 80 DX) acoplada ao microscópio Zeiss Axiophot em aumentos de 100* a 1000*.

4.2.4.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As interações entre o tecido e nanopartículas, bem como a ultraestrutura dos tumores e do tecido mamário foram analisadas em MET para verificar possíveis alterações morfológicas induzidas pela administração de $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$.

Fragmentos de tecidos (aproximadamente 1 a 2 mm) foram lavados com cacodilato de sódio (0,1 M) e fixados por quatro horas em solução contendo 2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, e 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Em seguida, esses fragmentos foram lavados em cacodilato de sódio e pós-fixados, durante uma hora, em 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio (5 mM $CaCl_2$ em tampão cacodilato de sódio 0,1 M). Posteriormente, o material foi lavado em água destilada e contrastado durante 12 horas com 0,5% de acetato de uranila em uma temperatura de 4°C. Então, procedeu-se com a desidratação em gradiente de acetona (50-100%) durante 10 minutos para cada concentração. Após, os fragmentos de tecidos foram infiltrados e, em seguida, incluídos em resina Spurr. Os cortes ultrafinos foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão no equipamento Jeol® 1011 operado a 80 kV e as micrografias foram feitas com a câmera Gatan Ultrascan.

4.2.4.5.3 Análises hematológicas e bioquímicas

A depuração de substâncias exógenas administradas no organismo como quimioterápicos ocorre, comumente, por via hepática (metabolismo e/ou excreção na bile) e/ou renal. Por conseguinte, substâncias tóxicas ao organismo podem causar danos ao fígado e aos rins e isto pode ser monitorado por meio de exames bioquímicos (MOTTA, 2003). Assim, as análises bioquímicas foram realizadas para verificar se $Rh_2(H_2Cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2Cit)_4$ causam hepatotoxicidade (dosagem de transaminase pirúvica) e nefrotoxicidade (dosagem de creatinina). Além disso, dosagens de ferro sérico foram feitas para avaliar se este elemento ficaria alterado nos tratamentos que continham nanopartículas de ferro, como no caso de $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-v$.

Os animais foram anestesiados e o sangue (em torno de 1.000 μ L) foi retirado, por meio de punção cardíaca. O sangue obtido foi dividido em dois minitubos distintos, sendo que um deles foi utilizado para hematologia e o outro para a bioquímica. O minitubo para a hematologia continha anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético bipotássico, 10%) e imediatamente após a coleta, o sangue foi homogeneizado no minitubo por inversão para evitar sua coagulação e depois foi armazenado a 4°C até a leitura no laboratório. O minitubo para a bioquímica continha um gel separador de soro sanguíneo e o minitubo foi centrifugado a 4°C por 10 minutos com velocidade de rotação de 4.000 rpm.

Os minitubos com os fluídos sanguíneos foram enviados ao Laboratório clínico Sabin para realização de hemograma completo, dosagens de creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e ferro sérico. Na **Tabela 2** é mostrada a relação entre testes e métodos utilizados para as análises bioquímicas. Os aparelhos foram calibrados para dosagens em animais de pequeno porte.

Tabela 2: Testes e métodos utilizados para dosagens bioquímicas em camundongos.

Testes bioquímicos	Métodos
Alanina aminotransferase (ALT)	Cinético otimizado UV
Creatinina	Colorimétrico (Jaffe)
Ferro sérico	Ferrozine

4.2.4.5.4 Análises clínicas

A regressão clínica do tumor foi avaliada por meio da observação do peso, do comportamento, mensuração do tumor e sobrevivência dos animais. Ainda, alterações clínicas e comportamentais foram observadas ao longo do experimento (23 dias) nos grupos estudados.

Peso corpóreo

O peso dos animais foi determinado em balança digital (OHAUS A560) com o objetivo de determinar a alteração de peso médio conforme a progressão tumoral e o tratamento dos animais. As pesagens foram registradas no dia do transplante das células neoplásicas, antes dos tratamentos e antes da eutanásia dos animais.

Mensuração dos tumores

O volume tumoral foi estimado pela mensuração dos tumores com auxílio de um paquímetro milimetrado digital após o tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$. Para calcular o volume tumoral foram utilizadas as fórmulas $V = \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{profundidade}$ (etapas 1 e 2) ou $V = (\text{comprimento} \times (\text{largura})^2) / 2$ (etapa 3) e o valor obtido foi expresso em mm^3 , conforme descrito por Kukowska-Latallo e Cândido *et al*, (2005).

Análise do tempo de sobrevivência

Para avaliação da sobrevivência dos animais portadores de tumor foi registrada diariamente a ocorrência da morte dos mesmos, o que possibilitou o preparo de uma curva de mortalidade. O ponto final do experimento foi determinado pelo último dia de tratamento descrito na 2ª etapa (23 dias após o transplante tumoral). A mediana do tempo de sobrevivência dos animais foi avaliada até 23 dias após o transplante tumoral.

4.2.4.5.5 Análise de genotoxicidade: fragmentação do DNA de células da medula óssea e avaliação do ciclo celular

Após o sacrifício dos animais, os fêmures foram retirados e as epífises seccionadas. Em uma das extremidades do fêmur, introduziu-se uma agulha acoplada à seringa contendo 1000 pL de SFB, a fim de coletar células da medula óssea. Logo, estas células foram centrifugadas por 3 minutos (rotação 2500 rpm, 8°C por 3 minutos) e, em seguida, fixadas em um mililitro de etanol gelado (70%) e mantidas a 0°C por 24 h. Em seguida, as células foram ressuspensas e um volume de 75 pL foi transferido para um Ependorf previamente identificado. Então, prosseguiu-se com a centrifugação e ressuspensão das mesmas em 300 pL de PBS. Após, a suspensão celular foi novamente centrifugada, ressuspensa em 300 pL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 20 pg/mL de iodeto de propídio diluído em PBS, pH 7,4) e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz.

Em seguida, essa suspensão celular foi avaliada em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA-USA) no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm) para avaliação da fragmentação de DNA e identificação das fases do ciclo celular. Os dados obtidos foram analisados com o programa CellQuest 3.0.1 (Becton & Dickinson, EUA).

O tampão de lise atua rompendo as membranas das células e, portanto, expondo seus núcleos. Assim, o iodeto de propídeo se liga ao DNA e as células contendo núcleos íntegros emitem alta fluorescência. Por outro lado, a condensação da cromatina e fragmentação de DNA pode ser observada pela ocorrência de eventos com baixa fluorescência. Além disso, fragmentos menores de DNA captam menos iodeto de propídeo, emitindo menor fluorescência. A determinação da fragmentação do DNA e a identificação de fase do ciclo celular foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Peres (2005) e o cálculo da proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular foi realizado considerando-se apenas as células com DNA não fragmentado.

4.2.4.6 Análises estatísticas

Para analisar possíveis diferenças no peso e volume tumoral dos animais entre os grupos experimentais realizou-se uma ANOVA two way (*General Linear Model*). Já para avaliação das diferenças na fragmentação ou ciclo celular, entre os grupos experimentais, foi aplicada uma ANOVA one way seguida do pós-teste de Tukey ou ANOVA two way seguida de pós-teste de *Bonferroni*, respectivamente. Ainda, foi utilizada a curva Kaplan-Meier e o teste estatístico Log-rank para comparar as curvas obtidas com a sobrevida dos camundongos. Em todos os casos diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das nanopartículas

Partículas de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ apresentaram formato esférico e diâmetro modal de 7,8 nm (desvio padrão de 2,1) (**Figura 5 A e 5 B**) e partículas da composição de $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ apresentaram forma arredondada e diâmetro modal de 28,2 nm (desvio padrão de 6,2) (**Figura 5 C e 5 D**). Ainda, observou-se que as amostras ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) continham partículas de tamanhos distintos entre si, demonstrando que elas são polidispersas. As propriedades magnéticas destes tipos de nanocompósitos são dependentes do seu tamanho.

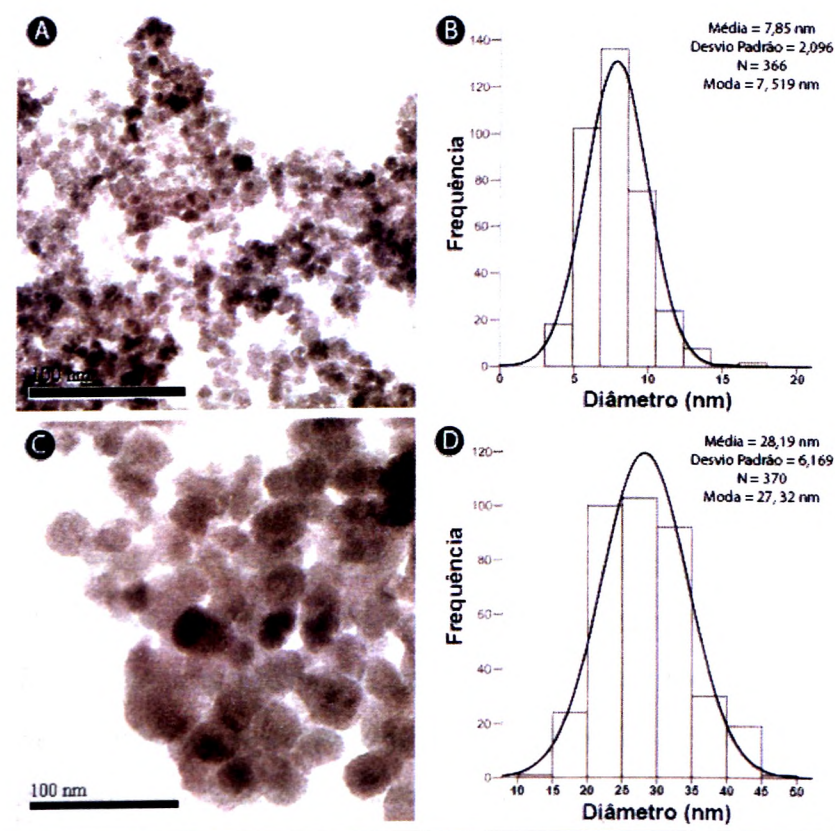


Figura 5: Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de maghemita por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Micrografia eletrônica de nanopartículas de maghemita associadas com citrato de ródio (II) ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$). (B) Histograma da distribuição dos diâmetros de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, apresentando diâmetro modal de 7,85 nm e $\sigma = 2,10$. (C) Micrografia eletrônica de $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. (D) Histograma da distribuição dos diâmetros de $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, mostrando diâmetro modal de 28,19 nm e $\sigma = 6,17$.

5.2 Experimentos *in vitro*

5.2.1 Viabilidade celular: relação da citotoxicidade de citrato de ródio (II)

5.2.1.1 Análise de atividade metabólica: MTT

Os possíveis efeitos citotóxicos dos complexos estudados sobre as células de glândula mamária (MCF-7, 4T1 e MCF-10A) foram avaliados quantitativamente pelo ensaio do MTT. De uma forma geral, observou-se diferença na viabilidade entre células sem (controle) e com tratamento de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ em relação ao tempo e linhagens celulares investigadas. Nas três linhagens estudadas, o efeito citotóxico de 50 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ foi semelhante ao controle após 24 e 48 h de tratamento ($p < 0,05$). Isto indica que nesta dose o $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ não afetou a viabilidade celular das três linhagens, nos tempos iniciais de tratamento. No entanto, em doses acima de 200 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ observou-se menor viabilidade em células normais (linhagem MCF-10A) do que em células de carcinoma (linhagens MCF-7 e 4T1) (**Tabela 3**).

$\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ induziu uma redução da viabilidade dependente do tempo, dose e linhagem celular investigados (**Tabelas 3 e 4**). Após 24 h de tratamento com 300 a 600 μM , houve efeito citotóxico diferenciado entre as linhagens de carcinoma e normais. Em relação a 48 h de tratamento com 200, 500 e 600 μM observou-se semelhança na viabilidade entre as linhagens de carcinoma, o que não ocorreu com 300 μM . Após 72 horas de tratamento houve uma queda acentuada da viabilidade, particularmente, nas células MCF-10A após tratamentos com doses acima de 200 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Inclusive, a porcentagem de células MCF-10A viáveis reduz para aproximadamente 5% em relação às células não tratadas (controle) nas doses de 500 e 600 μM (**Tabela 3**).

Entre as linhagens celulares de carcinoma (MCF-7 e 4T1) observou-se comportamento de citotoxicidade similar. De uma forma geral, o efeito citotóxico de

5.2 Experimentos *in vitro*

5.2.1 Viabilidade celular: relação da citotoxicidade de citrato de ródio (II)

5.2.1.1 Análise de atividade metabólica: MTT

Os possíveis efeitos citotóxicos dos complexos estudados sobre as células de glândula mamária (MCF-7, 4T1 e MCF-10A) foram avaliados quantitativamente pelo ensaio do MTT. De uma forma geral, observou-se diferença na viabilidade entre células sem (controle) e com tratamento de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cít})_4$ em relação ao tempo e linhagens celulares investigadas. Nas três linhagens estudadas, o efeito citotóxico de 50 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cít})_4$ foi semelhante ao controle após 24 e 48 h de tratamento ($p < 0,05$). Isto indica que nesta dose o $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cít})_4$ não afetou a viabilidade celular das três linhagens, nos tempos iniciais de tratamento. No entanto, em doses acima de 200 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cít})_4$ observou-se menor viabilidade em células normais (linhagem MCF-10A) do que em células de carcinoma (linhagens MCF-7 e 4T1) (**Tabela 3**).

$\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cít})_4$ induziu uma redução da viabilidade dependente do tempo, dose e linhagem celular investigados (**Tabelas 3 e 4**). Após 24 h de tratamento com 300 a 600 μM , houve efeito citotóxico diferenciado entre as linhagens de carcinoma e normais. Em relação a 48 h de tratamento com 200, 500 e 600 μM observou-se semelhança na viabilidade entre as linhagens de carcinoma, o que não ocorreu com 300 μM . Após 72 horas de tratamento houve uma queda acentuada da viabilidade, particularmente, nas células MCF-10A após tratamentos com doses acima de 200 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cít})_4$. Inclusive, a porcentagem de células MCF-10A viáveis reduz para aproximadamente 5% em relação às células não tratadas (controle) nas doses de 500 e 600 μM (**Tabela 3**).

Entre as linhagens celulares de carcinoma (MCF-7 e 4T1) observou-se comportamento de citotoxicidade similar. De uma forma geral, o efeito citotóxico de

$Rh_2(H_2cit)_4$ foi maior após 72 h com doses elevadas de $Rh_2(H_2cit)_4$ (500 e 600 μM) e na linhagem MCF-10A ($p < 0,05$) (**Tabela 3**).

Paclitaxel (PTX), usado como controle positivo, induziu citotoxicidade diferenciada entre 24, 48 e 72 h em todas as linhagens celulares investigadas, sendo que este efeito foi mais acentuado após 72 h. O tratamento com DMSO somente foi citotóxico para células 4T1 e MCF-10A após 72 h. Assim, sugere-se que a citotoxicidade de paclitaxel não está relacionada, via de regra, com seu diluente DMSO (**Tabela 3**).

A partir destes experimentos, os valores de IC_{50} foram determinados para todas as linhagens celulares e estão descritos na **Tabela 4**. Como observado nesta tabela, as duas linhagens de carcinoma (MCF-7 e 4T1) foram similarmente sensíveis aos tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ em todos os tempos estudados, porém menos sensíveis do que a linhagem de células normais MCF-10A. Observações de cada linhagem celular ao longo do tempo demonstram que há um aumento da sensibilidade ao tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$. Portanto, o tratamento com este complexo é dose, tempo e tipo de linhagem celular (normal ou carcinoma) dependente.

Tabela 3: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de citrato de ródio II ($Rh_2(H_2cit)_4$), linhagem celular avaliada e o tempo após a aplicação do tratamento.

Tratamento	Linhagem celular	24h	48h	72 h
0 (controlei)	MCF-7	100.00 = 1.50 A*. a'	100.00 = 1.95 A: a	100.00 = 1.06 A: a
	4T1	100.00 = 1.21 A. a	100.00 = 1.16 A: a	100.00 = 1.34 A: a
	MCF-10A	100.00 = 3.30 A. a	100.00 = 1.05 A: a	100.00 = 0.92 A: a
$Rh_2(H_2cit)_4$ 50 μ M	MCF-7	94.96 = 2.44 A. a	91.48 = 2.84 A. a	81.19 = 2.30 B: a
	4T1	90.31 = 1.38 A. a	81.9 = 2.63 A.B. a	81.42 = 2.56 B: a
	MCF-10A	97.75 = 3.7 A. a	98.82 = 1.40 A: a	84.30 = 2.55 B: a
$Rh_2(H_2cit)_4$ 200 μ M	MCF-7	89.28 = 2.60 A. a	81.64 = 2.38 A: a	70.13 = 2.58 B: a
	4T1	79.13 = 1.44 A. b	73.42 = 2.17 A.B. a	68.12 = 3.64 B: a
	MCF-10A	61.82 = 6.54 A: b	44.19 = 1.60 B. b	30.43 = 2.69 C: b
$Rh_2(H_2cit)_4$ 300 μ M	MCF-7	85.33 = 2.14 A. a	73.3 = 2.58 B. a	54.14 = 2.47 C: a
	4T1	73.95 = 2.54 A. a	61.7 = 1.4 B. b	47.79 = 4.11 C: a
	MCF-10A	39.41 = 7.47 A. b	23.81 = 0.74 B. c	12.78 = 0.92 C: b
$Rh_2(H_2cit)_4$ 500 μ M	MCF-7	50.08 = 2.49 A. a	25.29 = 3.46 B.C. a	30.39 = 3.47 C: a
	4T1	46.14 = 3.49 A. a	30.66 = 1.22 B: a	26.07 = 2.5 B: a
	MCF-10A	25.85 = 6.46 A: b	11.62 = 1.1 A.B: b	5.46 = 0.4 C: b
$Rh_2(H_2cit)_4$ 600 μ M	MCF-7	28.71 = 3.90 A. a	16.86 = 1.77 B: a	12.16 = 1.93 B: a
	4T1	27.87 = 3.67 A. a	15.86 = 0.57 B: a	9.97 = 1.49 B: a
	MCF-10A	13.34 = 2.43 A: b	10.26 = 1.27 A: b	4.76 = 0.39 B: b
DMSO (0.85%)	MCF-7	90.51 = 5.9 A. a	90.93 = 1.7 A. a	96.4 = 1.4 A: a
	4T1	106.2 = 1.3 A. b	100.6 = 2.97 A: a	43.07 = 8.2 B: b
	MCF-10A	148.1 = 6.8 A. C	82.45 = 2.3 B: a	63.35 = 2.2 C: c
Pitulluxel 50 μ M	MCF-7	70.07 = 0.4 A. a	55.93 = 1.6 B. a	18.92 = 4.3 C: a
	4T1	68.31 = 1.2 A. a	30.12 = 0.7 B: b	21.51 = 1.4 C: a
	MCF-10A	80.1 = 6.7 A: c	33.52 = 1.09 B. b	20.95 = 1.1 C: a

Os dados representam a média \pm EP (erro padrão da média) de três experimentos independentes realizados em triplicata e com excelente repetibilidade. * Letras maiúsculas diferentes denotam diferença estatística entre a viabilidade nos diferentes tempos em uma dada linhagem celular (MCF-7, 4T1 ou MCF-10A) sob a ação do mesmo tratamento ($p < 0,05$). # Letras minúsculas diferentes significam diferença estatística entre a viabilidade das três linhagens avaliadas num dado tempo (24, 48 ou 72 horas) e sob ação do mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Tabela 4: Distribuição dos valores aproximados de IC_{50} e de seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) nas linhagens celulares MCF-7, MCF-10A e 4T1 após tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$.

Linhagem celular	IC_{50} (IC 95%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
MCF-7	483 pM (459.2 a 507 pM)	376 pM (356.2 a 396.1 pM)	294 pM (259,9 a 332,5 pM)
4T1	440 pM (407.3 a 475 pM)	337 pM (317.3 a 357.8 pM)	271 pM (241,4 a 303.9 pM)
MCF-10A	250 pM (211.1 a 295.2 pM)	181 pM (172.3 a 190.8 pM)	123 pM (114,7 a 132.7 pM)

Estes dados são provenientes de uma análise de IC_{50} , conforme descrito na seção experimental, na qual se refere aos dados de viabilidade celular após tratamentos das células com $Rh_2(H_2Cit)_4$ (50 a 600 pM) por 24, 48 e 72 h.

5.2.1.2 Análise da integridade da membrana plasmática

Esta análise confirmou que $Rh_2(H_2Cit)_4$ alterou a viabilidade das células 4T1, MCF-7 e MCF-10 na dose de 500 μM após 48 h de tratamento. Todavia, apesar de ter sido observada uma queda na média da viabilidade celular não houve diferença estatística na viabilidade entre as três linhagens celulares investigadas neste tratamento. Através deste teste também confirmou-se que não houve diferença na viabilidade entre os grupos controle e 50 μM de $Rh_2(H_2Cit)_4$ nas três linhagens celulares investigadas, assim como foi observado no ensaio de MTT (Figura 6).

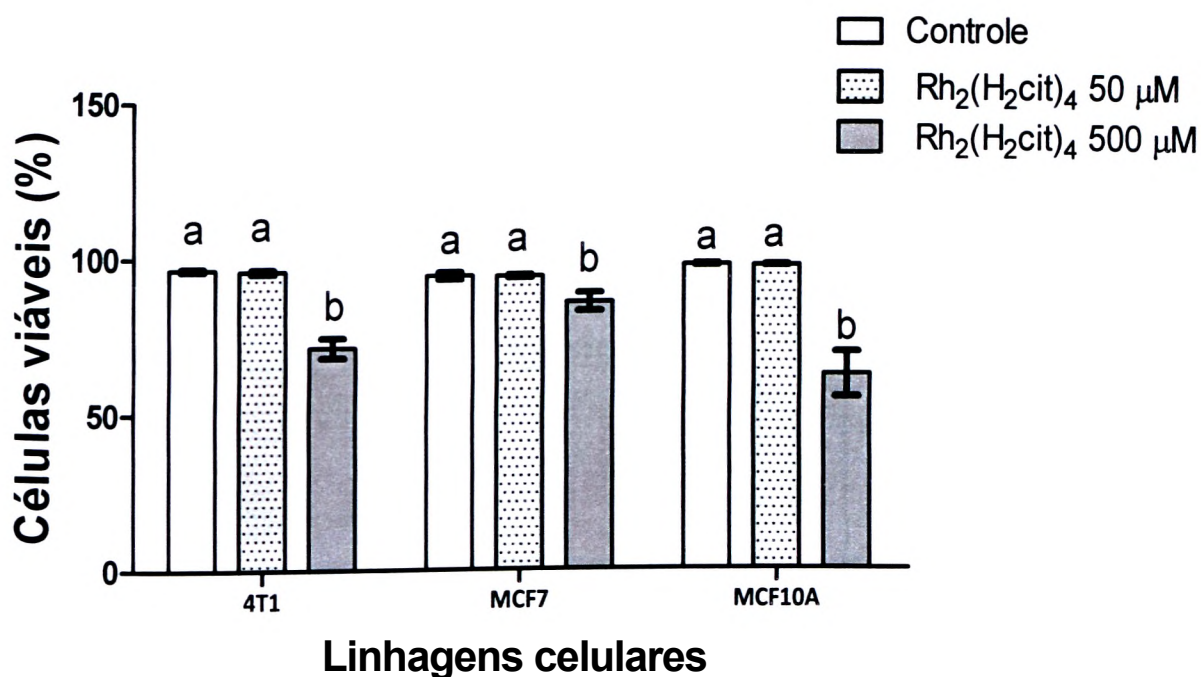


Figura 6 Efeito de $Rh_2(H_2cit)_4$ sob a viabilidade de células 4T1, MCF-10A e MCF-7 após tratamento por 48 h. O número de células viáveis no tratamento com 500 μM de $Rh_2(H_2cit)_4$ foi menor em relação ao controle (células sem tratamento) nas três linhagens celulares investigadas. Todos os dados foram normalizados com o controle e expressos como média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. O teste utilizado para avaliar a citotoxicidade foi o de avaliação da integridade da membrana por meio da quantificação de incorporação de iodeto de propídio em citômetro de fluxo. Letras diferentes indicam diferença estatística dentro do mesmo tratamento ($p < 0.05$).

Ainda, por meio deste teste realizado com iodeto de propídio, foi possível identificar alteração na homogeneidade da população de células 4 PI e MCF-10A

após 48 h de tratamento com 500 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Esta interpretação baseia-se no deslocamento da população celular detectado nos canais SSC-H e FSC-H que indicam granulosidade e tamanho celular, respectivamente (**Figura 7**). Aumentos, na escala linear, detectados nos canais SSC-H e FSC-H indicam respectivamente aumento da granulosidade e agregação celular. Em contrapartida, reduções lineares detectadas no canal FSC-H revelam *debris* de células que estão em processo de morte celular. Assim, é sugerido através dos nossos dados demonstrados na **Figura 7** que a população de células MCF-10A e 4T1 tornou-se heterogênea com populações distintas do controle, onde detectou-se aumento do número de células em morte e aumento da granulosidade celular, que pode estar relacionada ao aumento de vesículas dentro da célula no tratamento com 500 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$.

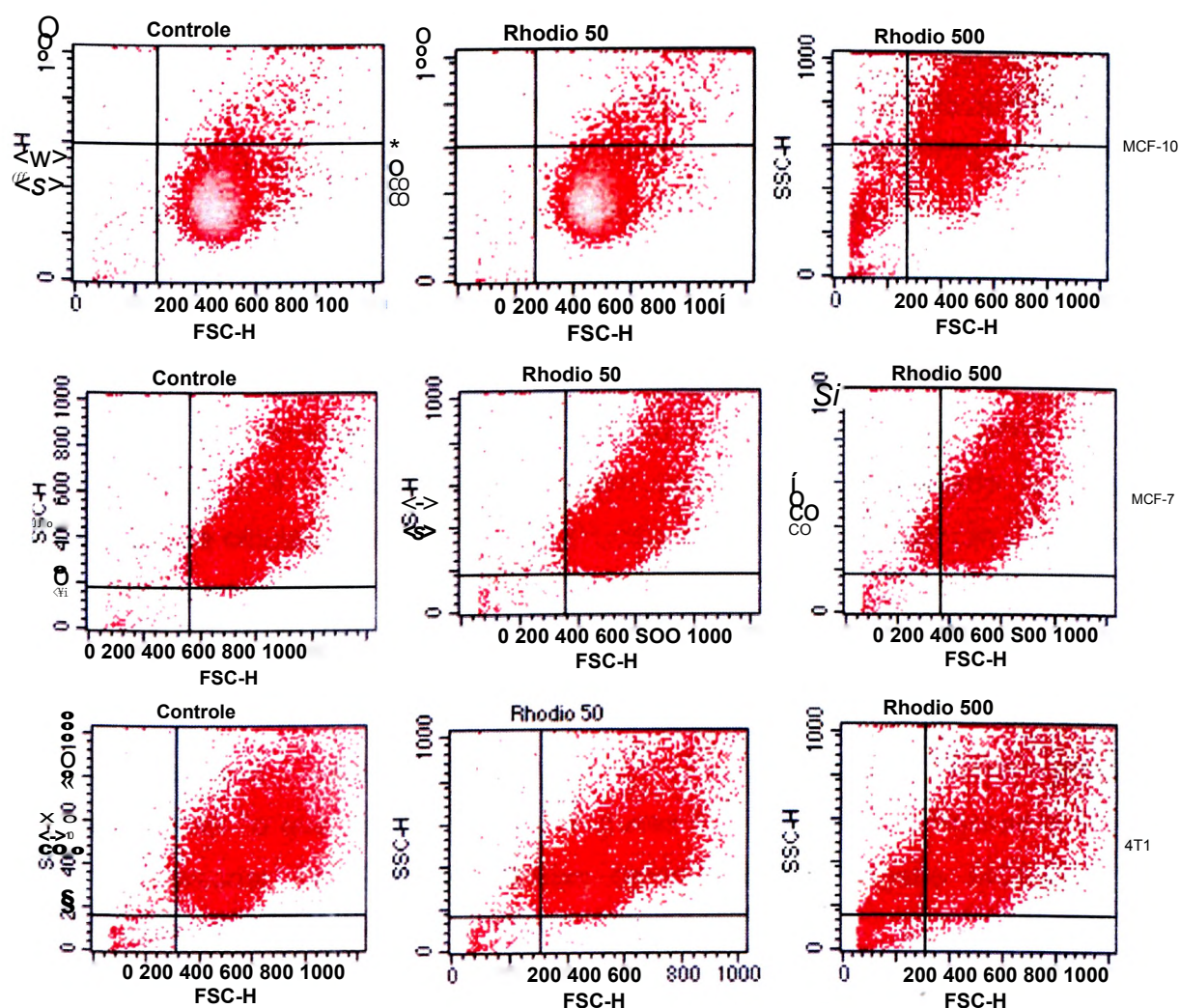


Figura 7: Efeito do tratamento com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (indicado por Rhodio) nas características morfológicas da população de células MCF-10A, MCF-7 e 4T1 após 48 h de tratamento. As células foram incubadas na ausência (controle) ou presença de 50 ou 500 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e após

48 h foram incubadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo (canal FL2), utilizando-se dos parâmetros SSC-H (granulosidade/complexidade citoplasmática) e FSC (tamanho da célula). Esta análise demonstrou que $Rh_2(H_2cit)_4$ na dose de 500 pM (Rhodio 500) induziu alterações morfológicas nas células MCF-10A e 4T1, visto detectados aumentos nos eixos SSC-H e FSC-H.

5.2.2 Avaliação das alterações morfológicas e estruturais induzidas por $Rh_2(H_2cit)_4$ em linhagens celulares de carcinoma: 4T1 e MCF-7.

5.2.2.1 Microscopia óptica e eletrônica de transmissão: $Rh_2(H_2cit)_4$ induz alterações morfológicas e estruturais em células MCF-7 e 4T1.

Foi mostrado nas imagens obtidas com microscopia de contraste de fase que as células 4T1 e MCF-7 sem tratamento (controle) apresentaram morfologia características (**Figuras 8 A e 9 A**, respectivamente), sendo que células da linhagem MCF-7 apresentaram morfologia, predominantemente, fusiforme (**Figura 8 A**). Por outro lado, foi notado que células da linhagem 4T1 apresentaram-se fusiformes e arredondadas (**Figura 9 A**). Após tratamento com 500 pM de $Rh_2(H_2cit)_4$ por 48 h, células 4T1 e MCF-7 assumiram morfologia mais arredondada e tamanho reduzido em relação ao controle. Além disso, foram notados fragmentos celulares eliminados na membrana plasmática das células (*blebs*) em ambas as linhagens celulares (**Figuras 8 B e 9 B**). É notável também que houve pronunciada redução da confluência de células tratadas com $Rh_2(H_2cit)_4$ em relação ao controle (**Figuras 8 A e 8 B; Figuras 9 A e 9 B**).

Detalhes ultraestruturais de células 4T1 e MCF-7 (controle), obtidas em MET, demonstram núcleo, membrana e citoplasma com aspecto característico. Ainda, observou-se que células da linhagem 4T1 apresentam mais projeções citoplasmáticas do que células MCF-7 (**Figuras 8 C e 9 C**). Nas **figuras 8 E e 9 E** são demonstradas detalhes de células controle das linhagens MCF-7 e 4T1, respectivamente.

No tratamento com 50 pM de $Rh_2(H_2Cit)_4$ as células não apresentaram alterações em relação às células sem tratamento (controle) (**Figuras 8 D e 9 D**). Todavia, após tratamento com dose dez vezes maior $Rh_2(H_2cit)_4$ (500 pM) observou-

se várias alterações morfológicas como presença de fragmentos celulares (setas), cromatina condensada na periferia nuclear, presença acentuada de lisossomos (cabeça de setas) e de mitocôndrias condensadas (mais eletrodensas) (**Figura 8 F e 9 F**). Estes aspectos morfológicos são decorrentes de processo de morte celular e, portanto, mostram que $Rh_2(H_2cit)_4$ na concentração de 500 pM induz intensas alterações morfológicas que estão associadas à sua citotoxicidade nas linhagens MCF-7 e 4T1.

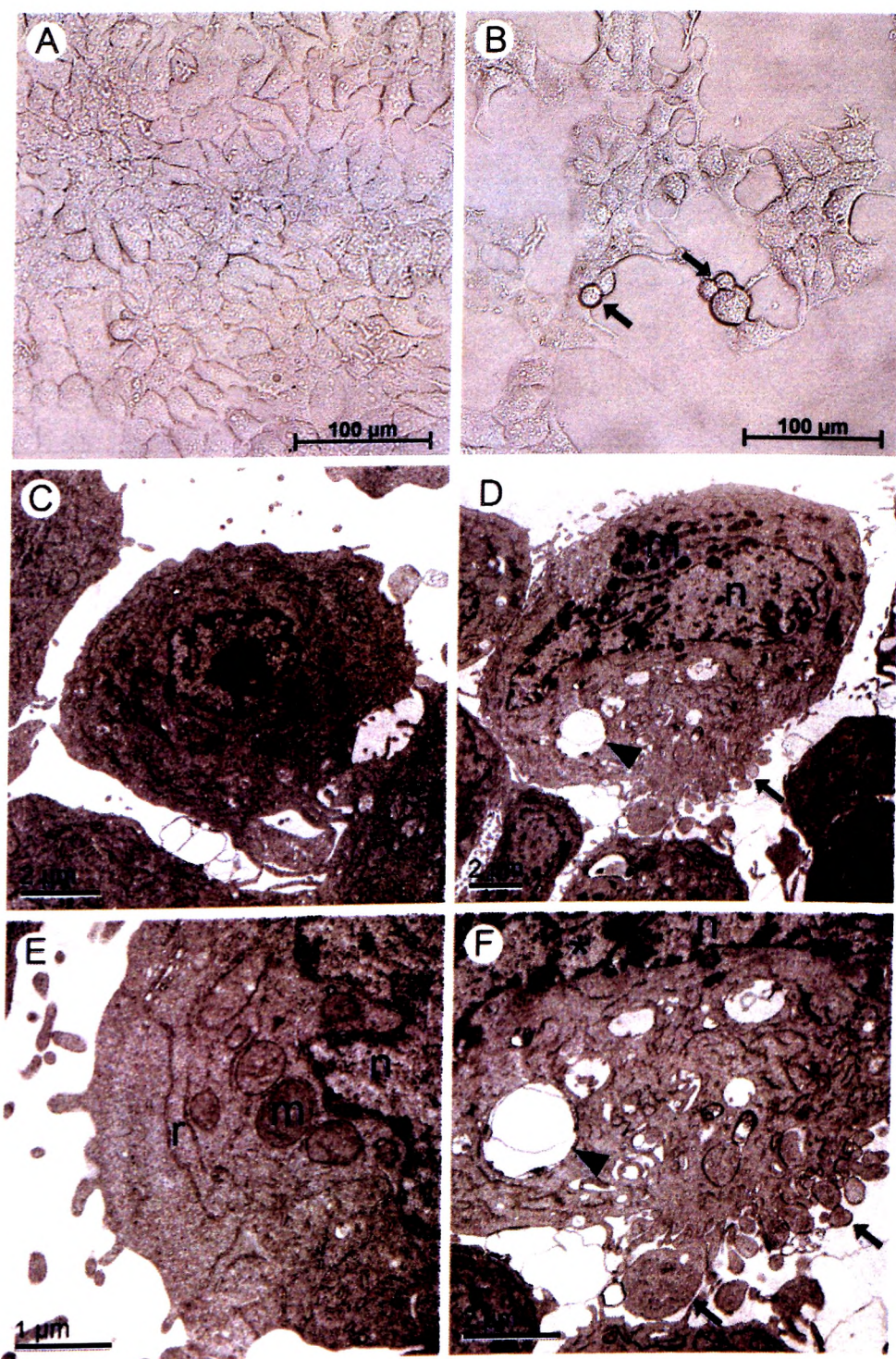


Figura 8: Alterações morfológicas e estruturais induzidas por $Rh_2(H_2cit)_4$ em células de adenocarcinoma mamário (linhagem MCF-7) após 48 h de tratamento. As células foram incubadas com 500 μ M de $Rh_2(H_2cit)_4$ e examinadas por microscopia de contraste de fase (A, B) e microscopia eletrônica de transmissão (C-F). (A, C, E) Controle (células sem tratamento); (B, D, F) células tratadas com 500 μ M de $Rh_2(H_2cit)_4$. Nas micrografias eletrônicas é mostrada cromatina condensada na periferia nuclear (*), aumento de vacúolos citoplasmáticos (cabeças de setas) e formação de "blebs" de membrana (setas). Legendas: mitocôndria (m), núcleo (n), (r) retículo endoplasmático.

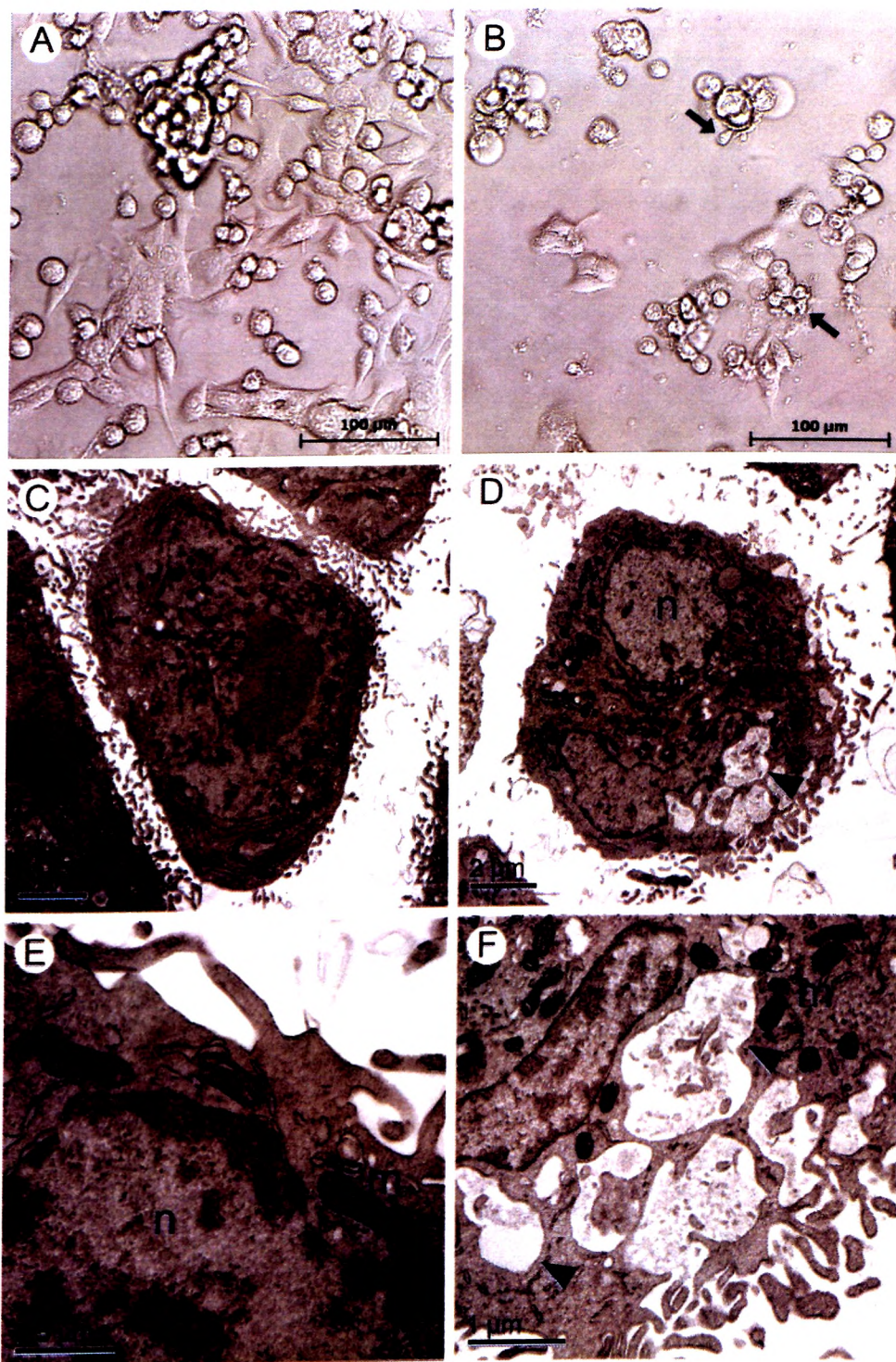


Figura 9: Alterações morfológicas e estruturais induzidas por $Rh_2(H_2cit)_4$ em células de carcinoma mamário (linhagem 4T1) após 48 h de tratamento. As células foram incubadas com 500 μM de $Rh_2(H_2cit)_4$ por 48 horas e examinadas por microscopia de contraste de fase (A, B) e microscopia eletrônica de transmissão (C-F). (A, C, E) Controle (células sem tratamento); (B, D, F) células tratadas com 500 μM de $Rh_2(H_2cit)_4$. Nas micrografias eletrônicas é mostrada maior quantidade de lisossomos (cabeça de seta) e condensação mitocondrial. Legendas: núcleo (n), mitocôndria (m), "blebbing" de membrana (seta).

5.2.2.3 Análise de morte celular por meio de citometria de fluxo: $Rh_2(H_2cit)_4$ induz aumento do número de células positivas para anexina-V FITC

Os valores percentuais de células marcadas com anexina-V FITC (células positivas para anexina) são mostrados na figura 11. Não se observou diferença no perfil de marcação com anexina entre células provenientes do controle e do tratamento com 50 pM de $Rh_2(H_2Cít)_4$. No entanto, o percentual de células marcadas com anexina no tratamento com 500 pM foi significativamente maior em relação ao controle ($p < 0,05$). Observou-se neste tratamento um aumento de células positivas para anexina de mais de 40% em relação ao controle, indicando exposição de fosfatidilserina no exterior da membrana plasmática. Além disso, foi notada diferença nesta marcação entre células das linhagens MCF-7 e 4T1 no tratamento com 500 pM ($p < 0,05$).

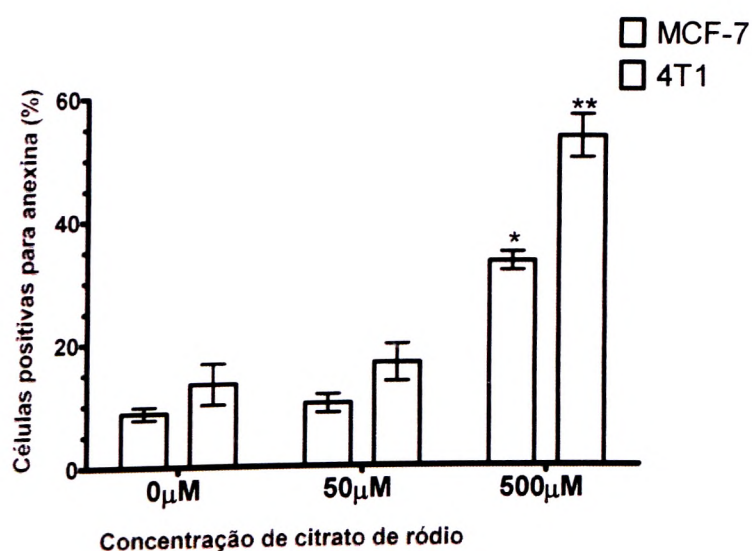


Figura 11- Exposição de fosfatidilserina induzidas por $Rh_2(H_2cit)_4$ em células de carcinoma mamário (linhagens 4T1 e MCF-7) após 48 horas de tratamento. Células foram tratadas com $Rh_2(H_2cit)_4$ nas concentrações indicadas e, após 48 horas, foram marcadas com anexina-V FITC e PI (iodeto de propídio) e analisadas em citômetro de fluxo. O percentual de células positivas para anexina representa células com a fosfatidilserina exposta e, portanto, em morte celular (apoptose). Os dados são expressos como média \pm EP de três experimentos realizados em triplicatas. Um e dois asteriscos (* e ***) indicam diferença estatística entre controle e tratamentos em MCF-7 e 4T1, respectivamente entre o controle e os tratamentos ($p < 0,001$).

5.2.3 Citotoxicidade de citrato de ródio (II) associado a nanocompostos

De uma forma geral, os tratamentos com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄, após 24 e 48 h, induziram maior citotoxicidade do que o tratamento com Rh₂(H₂cit)₄ nas linhagens MCF-7 e 4T1 (**Figura 12**). Após 24 h de tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ observou-se citotoxicidade diferenciada entre as linhagens celulares, sendo que este efeito ocorreu mais intensamente em células de carcinoma mamário. Em células MCF-10A o tratamento com Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ não foi citotóxico em 24 h (p<0,05). No entanto, após 48 h, observou-se citotoxicidade semelhante entre as linhagens MCF-7 e MCF-10A no tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e que o tratamento com Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ foi mais citotóxico do que com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (p<0,05) nas linhagens MCF-7 e 4T1. Ainda, com 72 h de tratamento, foi notada resposta citotóxica mais acentuada em relação a 24 e 48 h nas linhagens 4T1 e MCF-10 no tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Notou-se que no período de 72 h houve maior citotoxicidade nas três linhagens celulares nos tratamentos com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (**Figura 12**).

Observou-se maior queda na viabilidade das células 4T1 após tratamentos com Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ em relação à Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Além disso, observou-se semelhança na viabilidade entre células MCF-7 e MCF-10A. Nos tratamentos com Lip-Magh-v e Magh-v não observou-se citotoxicidade após 24 e 48 horas nas linhagens celulares investigadas (dados não mostrados).

Em geral, os resultados obtidos demonstraram que a associação de Rh₂(H₂cit)₄ com nanopartículas resultou em um efeito citotóxico mais intenso em células de carcinoma do que em células normais e também que Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ induziram atividade citotóxica, especialmente na linhagem 4T1.

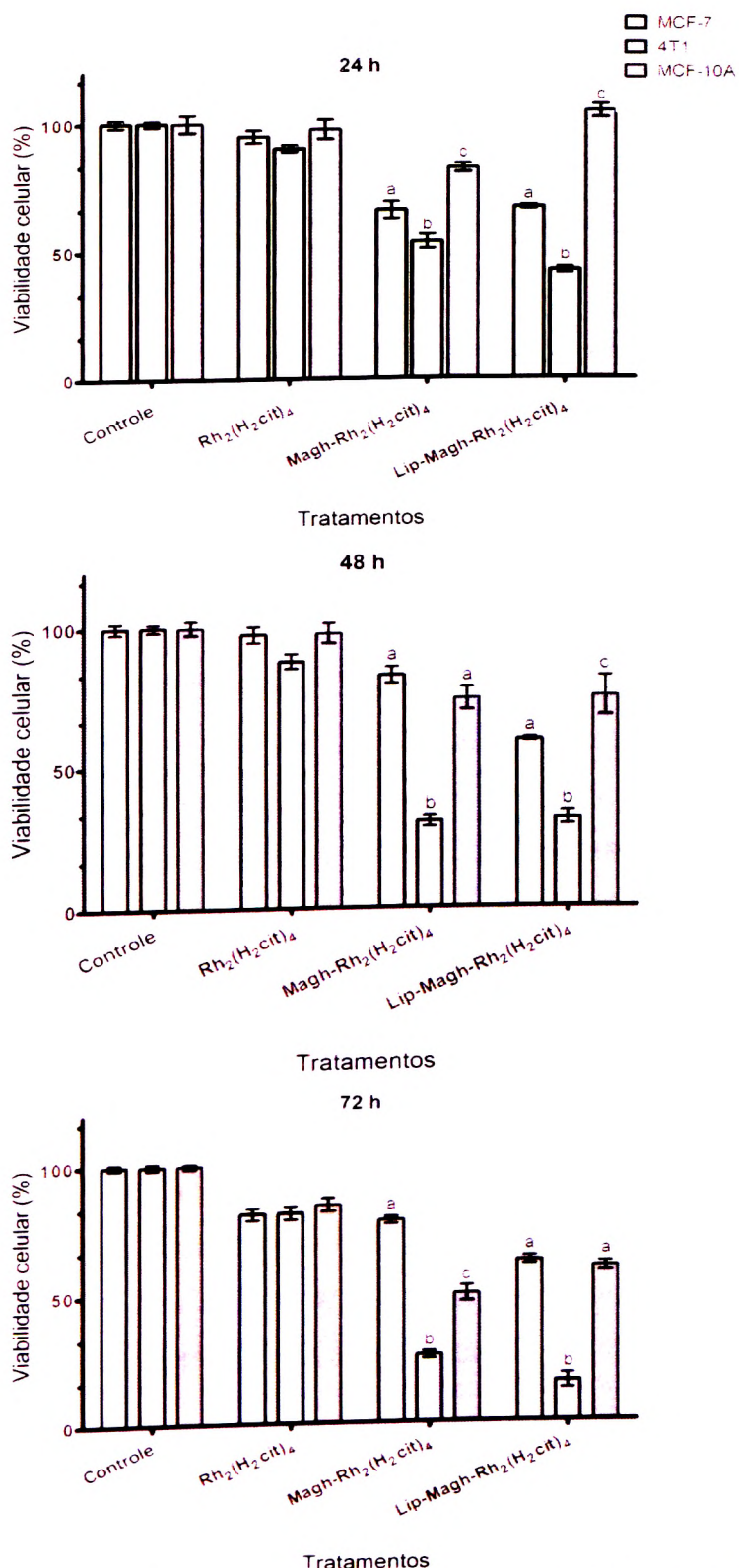


Figura 12: Efeito citotóxico dos tratamentos com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ em linhagens celulares de carcinoma mamário (MCF-7 e 4T1) e linhagem de células epiteliais da mama normais (MCF-10A). As células foram incubadas com dose equimolar de Rh₂(H₂cit)₄ (50 μM) por 24h, 48h e 72h. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo (células sem nenhum tratamento) e expressos como média ± erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Letras diferentes indicam diferença estatística dentro do mesmo tratamento (p < 0.05).

5.3 Experimentos *in vivo*

5.3.1 1ª Etapa - Determinação da progressão e padrão de crescimento do tumor 4T1 na glândula mamária de camundongos Balb/c

Os tumores que proliferaram na mama dos camundongos foram fotografados para comparar seu desenvolvimento e progressão ao longo do tempo. Após 12 dias do transplante de 2×10^4 células 4T1 evidenciou-se o tumor na mama, por meio de autópsia e, por isso, serão apresentados dados a partir do 12º dia.

Assim, observou-se que o tumor formado no 12º dia, após transplante de 4T1, apresentou-se pouco vascularizado e pequeno (14 mm^3), o que indica pouca agressividade do tumor neste período (**Figura 14 A**). Contudo, após o 16º (**Figura 14 B**) e o 18º dia (**Figura 14 C**), o volume tumoral aumentou acentuadamente e notou-se sua invasão no peritônio e intensa vascularização próxima ao tumor. No 21º dia (**Figuras 14 D-E**), observou-se grande invasibilidade tumoral no peritônio. Órgãos como o intestino, fígado, baço, timo e linfonodos apresentaram-se aumentados em volume após o 21º dia do transplante tumoral (**Figura 14 F**).

Nos tempos anteriores a doze dias do transplante de células 4T1 na mama de camundongos o volume do tumor foi inferior a 14 mm^3 (dados não mostrados). Todavia, a partir do 12º dia observou-se um crescimento progressivo e abrupto do tumor ao longo do tempo, principalmente, a partir do 18º dia (**Figura 15**). Observou-se ainda que em apenas três dias de diferença (18º ao 21º dia) o volume tumoral quase triplicou (de 275 para 762 mm^3) (**Figura 15**), demonstrando que esta linhagem celular apresenta comportamento agressivo e tem replicação muito rápida após 18 dias do transplante.

Estas observações foram úteis para a compreensão da relação entre o tempo e o crescimento tumoral neste experimento. O fato de no 18º dia o tumor ter apresentado comportamento agressivo e ter tido um aumento abrupto de seu volume, forneceu subsídios para criar uma estratégia diferenciada de implantação do tumor e tratamento para etapas subsequentes desta pesquisa. Assim, a partir destas informações estabeleceu-se que o tratamento dos animais com as composições à base de citrato de ródio (II) deveria ser iniciado antes do 12º dia e o sacrifício dos

mesmos deveria ser realizado próximo ao 21º dia após transplante tumoral, a fim de se obter maior sucesso com a terapia.

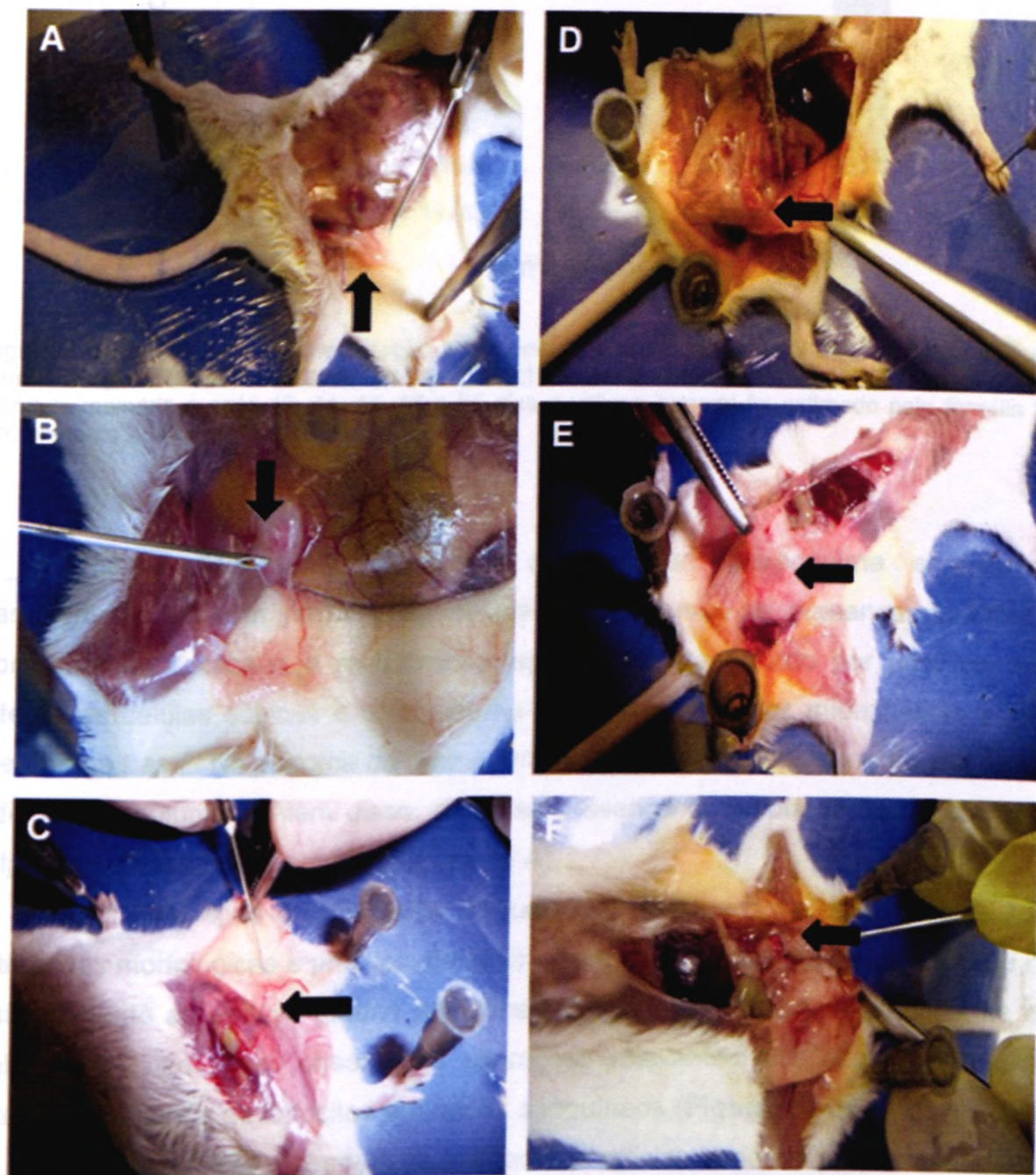


Figura 13: Crescimento do tumor 4T1 na mama de camundongos BALB/c após transplante ortópico. Foram transplantadas 2×10^4 células 4T1 na glândula mamária de camundongos e a avaliação do crescimento tumoral na mama foi realizada com 12 (A), 16 (B), 18 (C) e 21 dias (D) após o transplante. Setas indicam a presença da formação tumoral na glândula mamária dos animais.

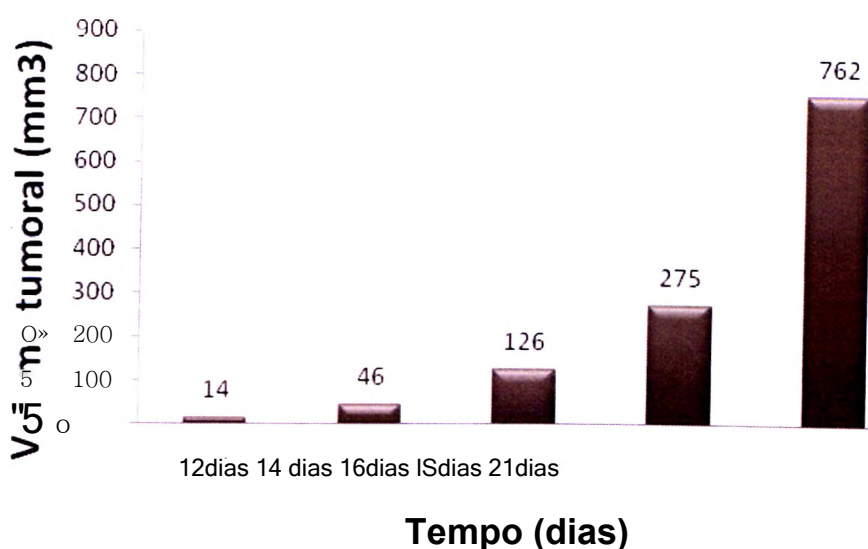


Figura 14: Volume tumoral em relação ao tempo de transplante de células tumorais 4T1 em camundongos fêmeas. Os camundongos (Balb/c) receberam transplante de 2×10^4 células 4T1 na glândula mamária e após 12, 14, 16, 18 e 21 dias o volume tumoral foi estimado pela fórmula $V = \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{profundidade}$.

Animais sem tumor (controle) apresentaram parênquima e estroma característicos e sem proliferação neoplásica. Observou-se presença de lóbulos apresentando duetos cujo revestimento epitelial era constituído por uma camada interna de células cúbicas e uma externa formada por células mioepiteliais e pela membrana basal. No estroma da mama foram observados vasos sanguíneos, tecido adiposo e conjuntivo. Além disso, notou-se presença de linfonodo sem neoplasia, adjacente ao estroma mamário (Figura 16 A).

No 5º dia após o transplante do tumor 4T1, foram observados duetos sem alterações morfológicas e princípio de infiltração de células tumorais nos duetos e no estroma junto ao epitélio (dados não mostrados). Após 12 dias do transplante de células 4T1 não foram observadas alterações relevantes nos duetos mamários, exceto a presença de linfócitos em vasos sanguíneos (Figura 16 B). Todavia, após 21 dias do transplante, observou-se infiltrado de células tumorais próximos às fibras musculares (Fig. 16 C-E) e próximos aos vasos sanguíneos (Fig. 16 E). Além disso, foram observadas células tumorais de aspecto pleomórfico com citoplasma abundante e núcleos ovóides e hiper cromáticos (Fig. 16 F), evidenciando a elevada malignidade do tumor 4T1 após 21 dias de seu transplante na mama de camundongos. De uma forma geral, foi demonstrado por meio da análise histopatológica que o tumor, proveniente de células 4T1, apresenta-se como uma

neoplasia pouco diferenciada, constituída por células fusiformes que infiltra o tecido conjuntivo e muscular após 21 dias do transplante tumoral nos animais.

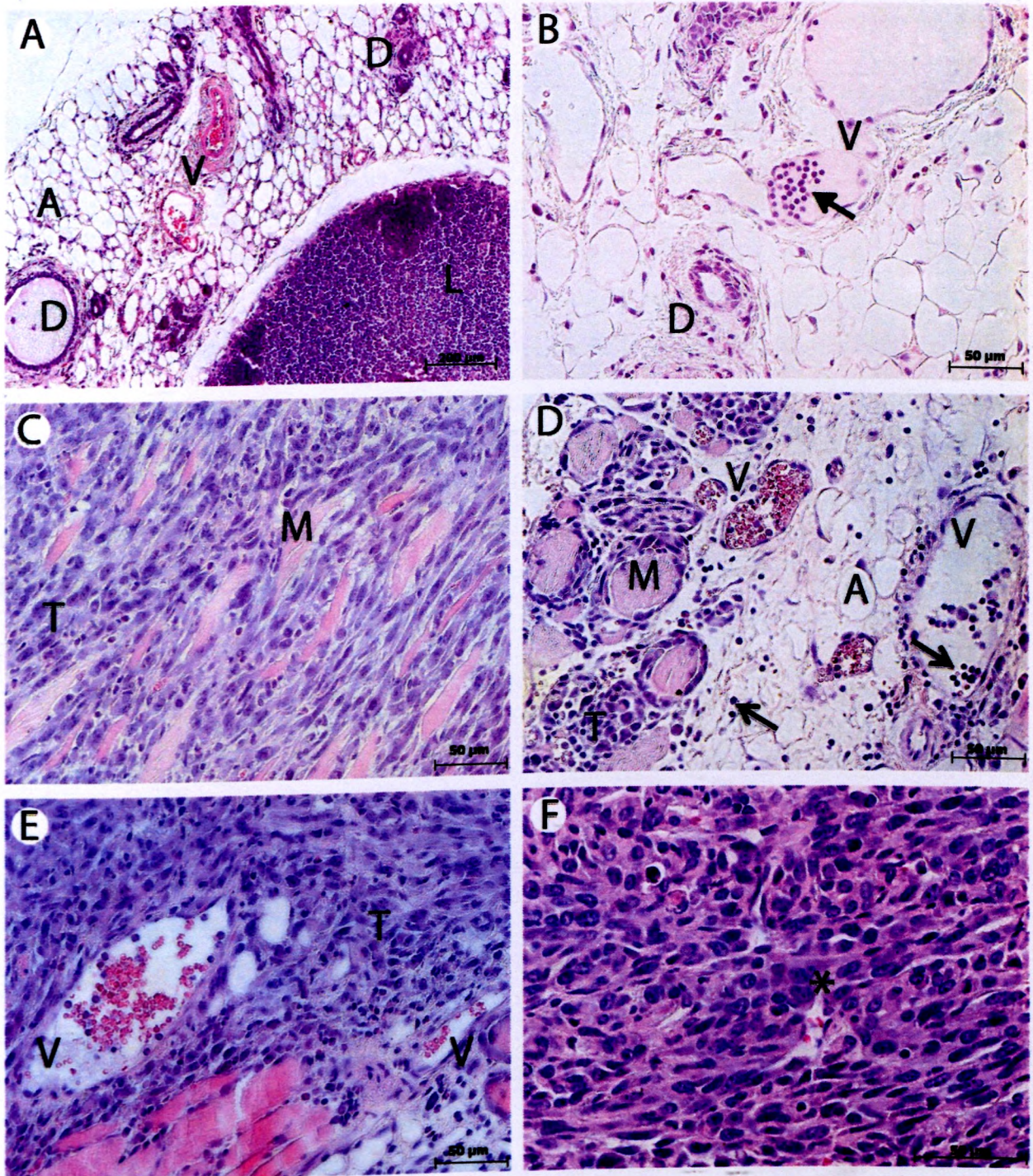


Figura 19. Fintmicoarrafias de tecido mamário de camundongos portadores ou não de carcinoma ortóDico^M Animais sadios e sem tumor. B) Animais após 12 dias de transplante hfrSSTc R Armais Dortadores de carcinoma após 21 dias de transplante tumoral. Legenda: (A) SidfpSo^D) duetos da mama, (V) vasos sanguíneos, (L) linfon«lo, (M) fibras musculares, (T) tecido tumoral, (*) núcleos picnóticos, (setas) leucócitos. Coloração H&E.

5.3.2 2ª Etapa - Avaliação da atividade antitumoral de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e de $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ em camundongos portadores de carcinoma mamário: experimento piloto.

Na **Figura 16** estão representadas as médias referentes ao volume tumoral dos animais após diferentes tratamentos. Observou-se redução da média do volume tumoral nos tratamentos com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ em camundongos Balb/c ($n=3/\text{grupo}$) em comparação com o grupo controle (animais sem tratamento). No tratamento com $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ observou-se redução do tumor de aproximadamente três vezes em relação ao grupo controle, sendo este tratamento o que induziu maior redução do volume tumoral com uma dose equimolar de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ relativamente baixa (300 pM). Assim, pôde-se verificar que essas composições à base de citrato de ródio (II) apresentavam potencial para terapia do tumor 4T1, especialmente a composição $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Contudo, na tentativa de determinar melhor eficácia antitumoral destas composições, adotou-se uma estratégia diferenciada de tratamento no experimento posterior, em que a dose e o tempo de tratamento foram aumentados, conforme detalhado no próximo item.

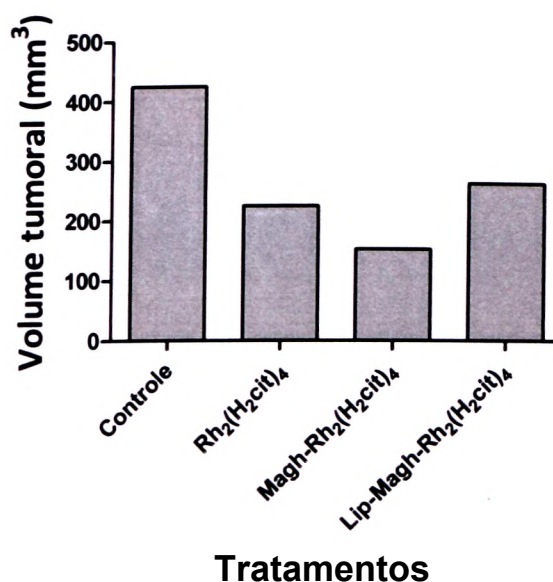


Figura 16: Efeito de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ no volume do tumor de carcinoma mamário (linhagem 4T1) em camundongos após 18 dias do transplante tumoral. Os camundongos receberam seis doses de 100 pM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (dose total: 600 pM) ou três doses de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ou $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (dose de 300 pM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) e foram sacrificados após 18 dias do transplante de células 4T1 na mama. O volume tumoral foi estimado pela

fórmula $V = \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{profundidade}$. Os dados representam a média do volume tumoral de três animais para cada grupo experimental.

A análise histológica dos tumores referentes ao grupo controle caracterizou-se por apresentar densa massa neoplásica indiferenciada e infiltrativa próxima aos duetos e ao tecido adiposo (**Figura 17 A**). Também foram observados pontos focais de necrose de coagulação ou isquêmica no tecido tumoral. O aparecimento dessas áreas de necrose deve-se, provavelmente, à baixa vascularização no interior da massa tumoral. Áreas hemorrágicas foram também identificadas pela presença de eritrócitos difundidos entre as células neoplásicas, próximas à área de necrose (**Figura 17 B**).

Nos animais tratados com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cit})_4$ observou-se células tumorais infiltradas no tecido muscular e infiltrado inflamatório, caracterizado pela presença de linfócitos no tumor próximo às células tumorais (**Figuras 17 C**). Também se observou uma área hemorrágica próxima de células tumorais (**Figuras 17 d**).

Nos animais tratados com NPM ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{Cit})_4$) e com ML ($\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) também observou-se intensa infiltração de linfócitos entre as células neoplásicas, comparando-se com os camundongos sem tratamento (controle) (**Figuras 17 F, 17 H**). Foram observados, no tumor de camundongos tratados com NPM e ML, pigmentos acastanhados na região tumoral, que são, provavelmente, agregados de NPM de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e de $\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (**Figura 17 E, 17 G-I**).

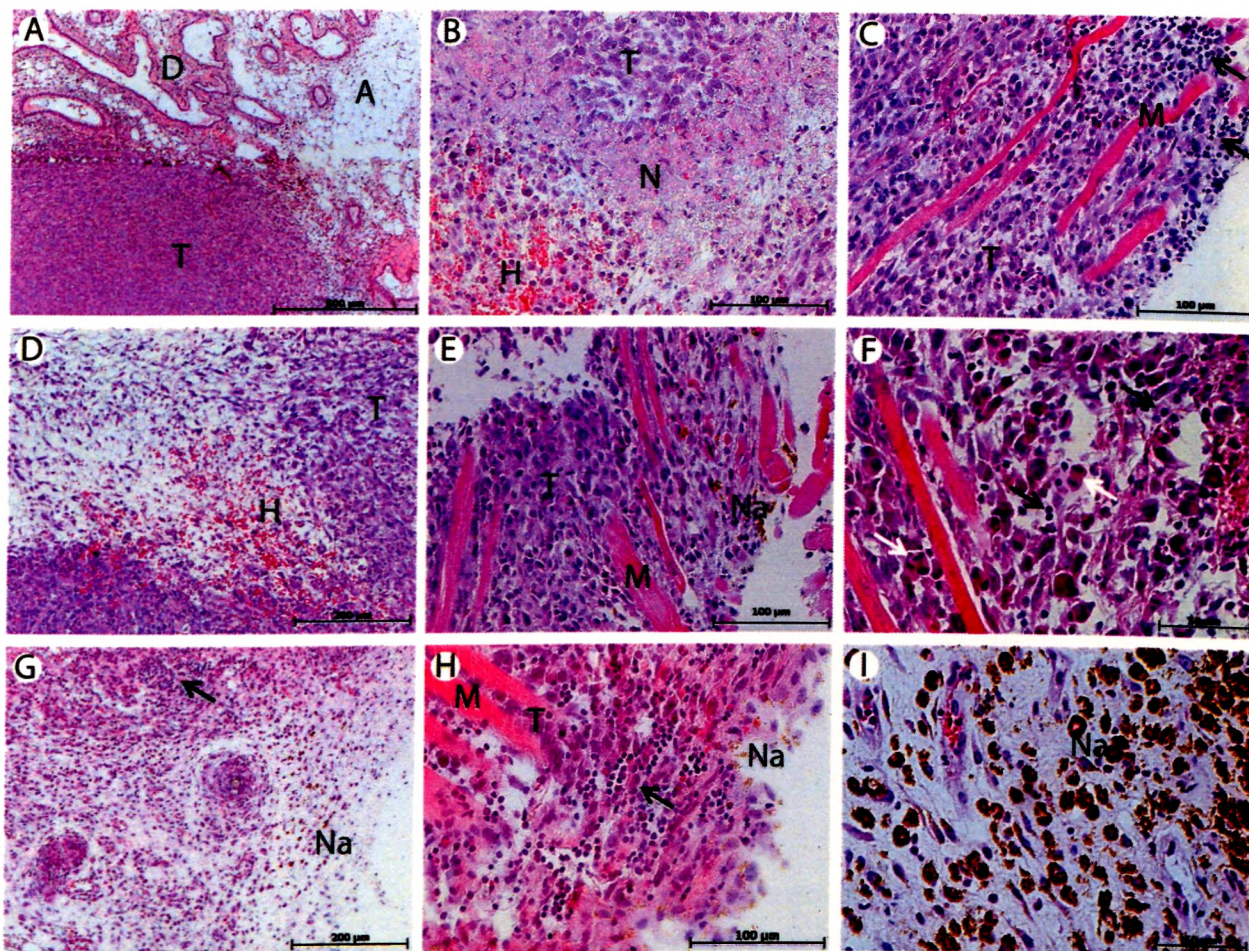


Figura 17: Fotomicrografias de carcinoma mamário transplantado na mama de camundongos Balb/c sem (controle) (A-B) ou com tratamento de RhjfHzCit₄ (C-D) ou com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (E-F) ou com Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (G-I). A) Infiltrado tumoral (T) na região próxima aos duetos (D) e tecido adiposo (A). B) Tecido tumoral apresentando regiões de necrose (N) e hemorragia (H). C) Infiltração de células tumorais e de linfócitos (setas) próximo às fibras musculares (M). D) Área hemorrágica próxima a região de edema inflamatório. E) Infiltração de agregados de nanopartículas (Na) de maghemita associadas Rh₂(H₂Cit)₄ (Na): no tecido tumoral. F) Infiltrado de linfócitos (setas pretas) e células mitóticas (setas brancas). G) Presença de nanopartículas associadas a lipossomas e Rh₂(H₂Cit)₄ (Na) e de infiltrado de linfócitos (seta) próximo às células tumorais. H) Presença de linfócitos próximos ao tecido tumoral e muscular. I) Aglomerado de magnetolipossomas (Na) no interior de células tumorais. Coloração H&E.

5.3.3 3ª Etapa - Atividade antitumoral e toxicidade de $Rh_2(H_2cit)_4$, e de $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ em camundongos portadores de carcinoma mamário

5.3.3.1 Análises clínicas

Alterações clínicas e comportamentais como diarreia, hemorragia, vômito, atividade motora diminuída, atonia, surgimento de manchas ou queda de pêlo não foram percebidas ao longo de todo o experimento (23 dias) nos grupos estudados.

5.3.3.1.1 Peso corpóreo dos animais

O peso dos animais foi registrado a partir do dia do transplante tumoral e, depois, semanalmente durante todo o período experimental. Não houve mudanças significativas no peso corpóreo dos animais ao longo dos tratamentos, exceto no grupo controle em que se verificou uma queda de peso significativa (aproximadamente 20%) no 14º dia após o transplante tumoral ($p < 0,05$) (**Figura 18**).

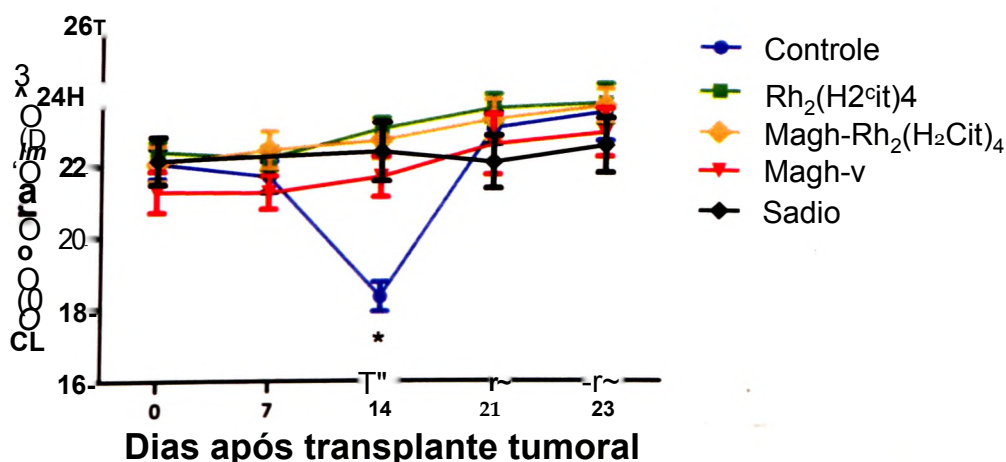


Figura 18: Efeito dos tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ sob a média do peso corpóreo de camundongos Balb/c ($n=8$ /grupo) após transplante de carcinoma mamário. Os grupos controle, Magh-v e sadio correspondem respectivamente a animais sem tratamento; tratados com nanopartículas de maghemita e animais sem tumor (normais). Não houve mudanças significativas no peso corpóreo dos animais ao longo dos tratamentos, exceto no grupo controle na

qual foi observada uma queda abrupta do peso no 14° dia após transplante tumoral ($p < 0,05$). Dados correspondem a valores da média \pm erro padrão.

5.3.3.1.2 Mensuração dos tumores dos animais

Como mostrado na Figura 19, os tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ e com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ reduziram o volume do tumor nos camundongos Balb/c ($n=8$ /grupo) em comparação com o grupo controle (animais sem tratamento). Por outro lado, observou-se semelhança em relação ao volume tumoral entre o grupo de animais tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ ($p < 0,05$), embora tenha havido uma redução na média do volume tumoral do grupo $Rh_2(H_2cit)_4$ em relação a $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$.

Os tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ e com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ (dose total: 1050 pM) resultaram em inibição do volume tumoral de respectivamente 74,5% e 52,2% em relação ao controle, quando foram comparadas as médias destes. Isto demonstra que estas composições apresentaram atividade antitumoral em camundongos Balb/c portadores de carcinoma mamário (linhagem 4T1) nas condições descritas neste trabalho.

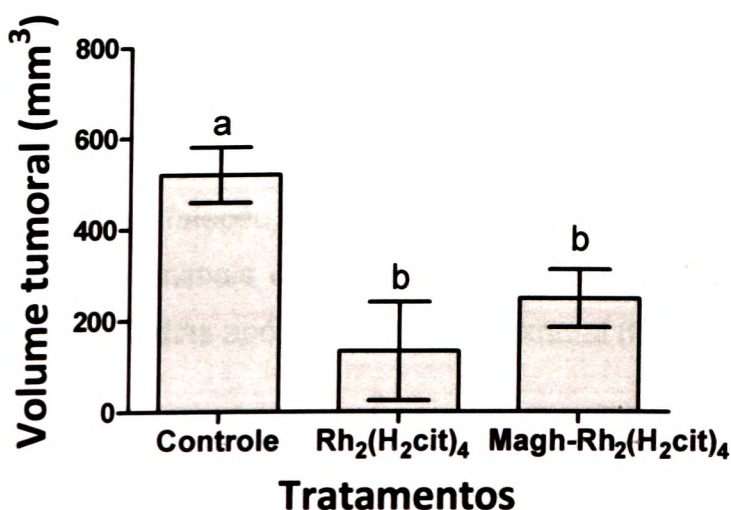


Figura 19: Efeito dos tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ sob o volume tumoral em camundongos Balb/c. Os camundongos portadores de carcinoma mamário ($n=8$ /grupo) tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ receberam sete doses equimolares de $Rh_2(H_2cit)_4$ (dose total: 1050 pM) durante dias alternados até o 23° dia após o transplante tumoral. O volume tumoral foi

estimado pela fórmula: $(a \times b^2)/2$, em que a corresponde ao comprimento e b corresponde à largura do tumor. Dados correspondem a valores da média \pm erro padrão ($n=8$) e letras diferentes indicam diferença estatística dentro do mesmo tratamento ($p < 0.05$).

O grupo Mag-v, usado como controle do tratamento com Magh-Rh₂(H₂Cit)₄, apresentou média do volume tumoral superior ($1880 \pm 296,8 \text{ mm}^3$) à do controle ($519,8 \pm 60,8 \text{ mm}^3$), representando, assim, um aumento de aproximadamente 27,6% do volume tumoral.

Também se pode observar que a resposta ao tratamento entre os diferentes animais de cada grupo foi variável, principalmente nos animais que receberam o tratamento com Rh₂(H₂Cit)₄. Com isso, verificou-se acentuada variação no valor de erro padrão neste grupo. Portanto, é possível que o fato de ter sido observada maior redução na média do volume tumoral, no grupo Rh₂(H₂Cit)₄, tenha relevância biológica, apesar de esta redução não ter refletido em diferença estatística quando comparados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄.

5.3.3.1.3 Tempo de sobrevida dos animais

O tempo de sobrevida foi determinado a fim de se verificar a potencialidade terapêutica de Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ para o câncer de mama. O óbito espontâneo dos animais iniciou-se no 16º e estendeu-se no 18º e 21º dia após o transplante tumoral, totalizando cinco óbitos. Deste total, foram detectados dois óbitos de cada grupo de animais tratados com Rh₂(H₂cit)₄ ou com Magh-v no 16º e 21º dia. No 18º dia, também faleceu um animal do grupo controle. Ainda, verificou-se 100% de sobrevida entre animais do grupo sadio e do grupo tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ ao longo dos 23 dias após o transplante tumoral (**Figura 20**).

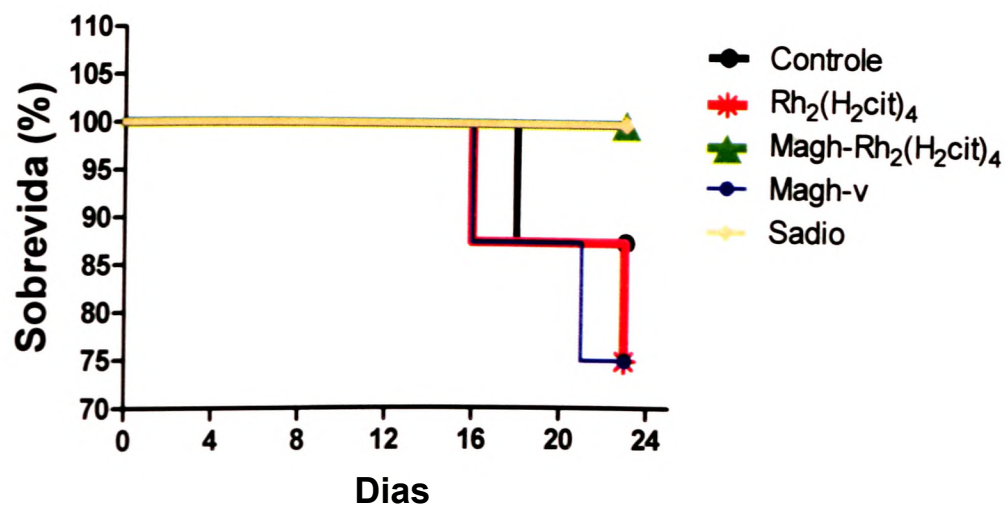


Figura 20: Tempo de sobrevivência de camundongos portadores ou não (sadio) de carcinoma mamário após tratamento com Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ até o 23º dia após o transplante tumoral. Os camundongos portadores de carcinoma mamário (n=8/grupo) tratados com Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (dose total de Rh₂(H₂cit)₄: 1050 pM) durante dias alternados até o 23º dia após o transplante tumoral. A porcentagem de sobrevivência entre animais do grupo sadio e tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ foi integral (100%), diferente do que ocorreu com os demais grupos.

5.3.3.2 Análises macroscópica e histopatológica do tumor 4T1 após tratamentos com Rh₂(H₂Cit)₄ e com Magh-Rh₂(H₂Cit)₄

5.3.3.2.1 Análise macroscópica do tumor 4T1 em camundongos Balb/c

Todos os animais em que células 4T1 foram transplantadas desenvolveram tumor na glândula mamária. Os tumores apresentaram tamanhos variados. Na maioria dos animais, observou-se redução do tumor após tratamentos com Rh₂(H₂cit)₄ e com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, como pode ser verificado na Figura 21.

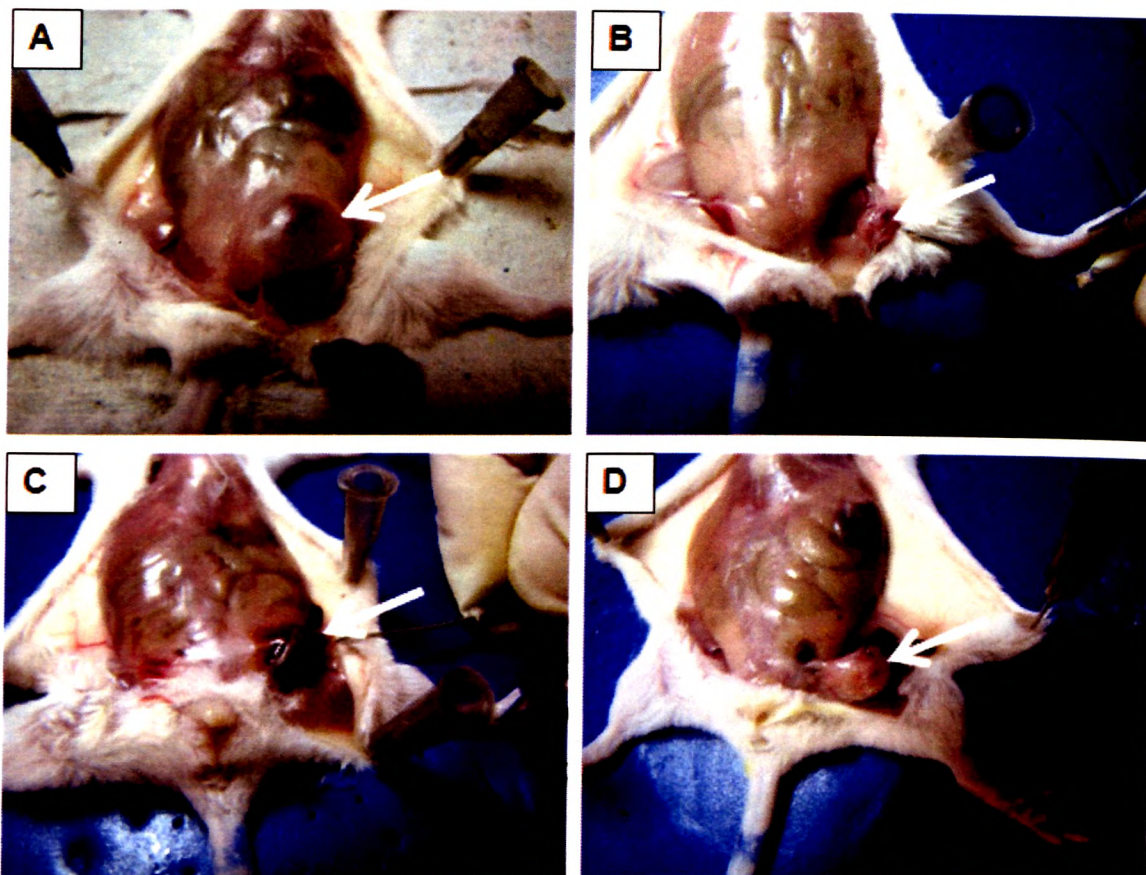


Figura 21: Fotografia dos tumores (carcinoma mamário) na mama de camundongos Balb/c na ausência (A) ou presença de tratamento (B-D). A) Controle. B) Animais tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$. C) Animais tratados com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$. D) Animais tratados com $Magh-v$. As setas indicam o tumor formado na glândula mamária dos animais.

Ao exame macroscópico a massa tumoral apresentou textura e superfícies irregulares (**Figura 22**). Os tumores do grupo controle apresentaram coloração avermelhada, sugerindo hemorragia ou elevada vascularização dos mesmos (**Figura 22 A**). O tumor de animais tratados com $Rh_2(H_2Cit)_4$ apresentou menor área em relação aos demais tratamentos (**Figura 22 B**). Em relação aos tumores de animais tratados com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-v$ notou-se pontos com coloração marrom-escuro, o que provavelmente indica presença de NPM captadas pelas células tumorais (**Figura 22 C e 23 D**).

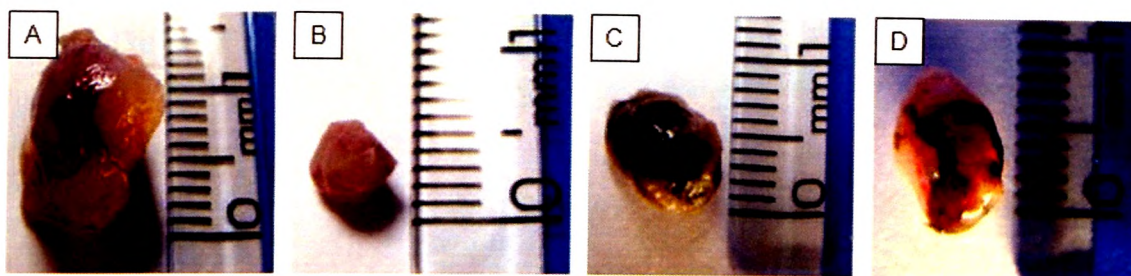


Figura 22: Fotografia dos tumores (carcinoma mamário) excisados de camundongos Balb/c sob diferentes tratamentos. A) Controle (animais sem tratamento). B) Animais tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$. C) Animais tratados com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$. D) Animais tratados com $Magh-v$. Observou-se, de uma forma geral, que nos tratamentos dos animais com $Rh_2(H_2cit)_4$ e com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ os tumores apresentaram-se menores em relação aos do controle e do tratamento com $Magh-v$.

5.3.3.2.2 Análise histopatológica do tumor 4T1

Animais sadios (sem tumor) apresentaram parênquima e estroma característicos e sem alterações hiperplásicas. Observou-se na **Figura 23 A** presença de um lóbulo apresentando dois ductos e estroma mamário composto por vasos sanguíneos, tecido adiposo e conjuntivo, além de linfonodo adjacente. Na **figura 23 B** é mostrado detalhes de ducto composto por uma camada interna de células cúbicas e por uma camada externa formada por células mioepiteliais, circundado por tecido adiposo.

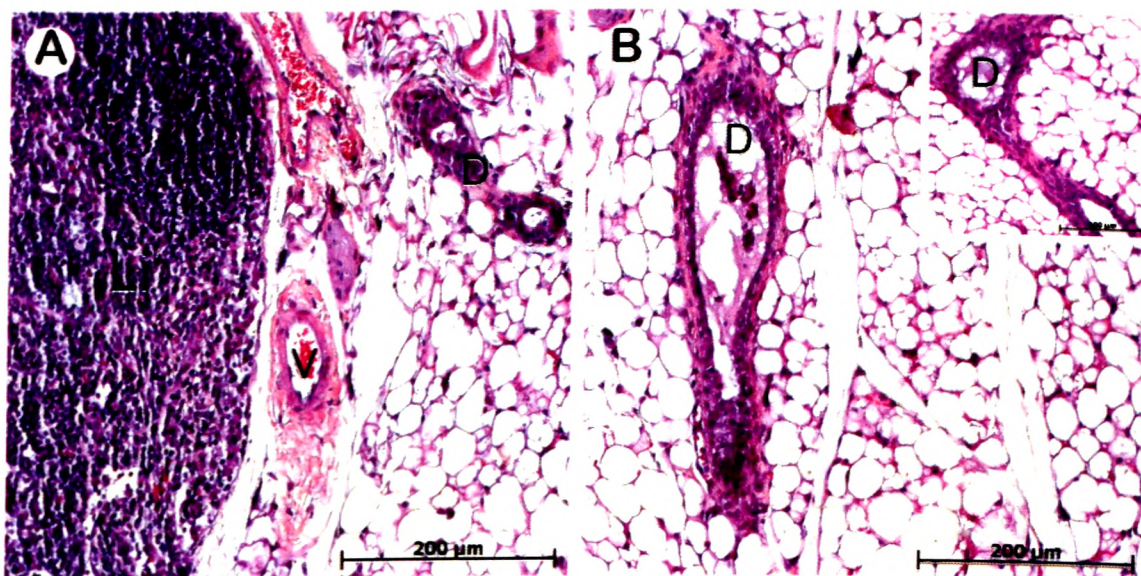


Figura 23: Fotomicrografias de tecido mamário de camundongos fêmeas Balb/c. A) Parênquima e estroma do tecido mamário normal B) Ducto (D) mamário em maior aumento circundado por tecido adiposo. Legenda: V vasos; L: linfonodo. Coloração H&E.

Nas **figuras 24 a 27** são demonstradas fotomicrografias provenientes de carcinoma mamário (linhagem 4T1). Por meio da análise histopatológica demonstrou-se que este tumor é pouco diferenciado e, provavelmente é de origem carcinomatosa invasiva com infiltração no tecido conjuntivo, adiposo e muscular. As características citológicas das células tumorais são variáveis, apresentando desde células pequenas com núcleos homogêneos até células grandes com núcleos irregulares e hipercromáticos.

Os tumores referentes ao grupo controle (animais sem tratamento) caracterizaram-se por apresentarem células neoplásicas indiferenciadas e infiltradas próximas aos ductos e ao tecido adiposo. Além disso, foi observada hiperplasia típica no ducto na **Figura 24 A**, caracterizada pela presença de três ou quatro camadas de células epiteliais. Na **figura 24 B** também foram notadas células tumorais adjacentes a um ducto e ao tecido conjuntivo e adiposo. Em outra região que apresentava densa massa neoplásica foi notado tumor constituído por células fusiformes com componente glandular de permeio e figuras mitóticas, sugestivas do elevado padrão de proliferação tumoral (**Figura 24 C e 24 D**). Infiltração de células tumorais foi observada entre fibras musculares atroficas (**Figura 24 E**). Na **figura 24 F** estão representadas áreas de necrose e hemorragia no tumor.

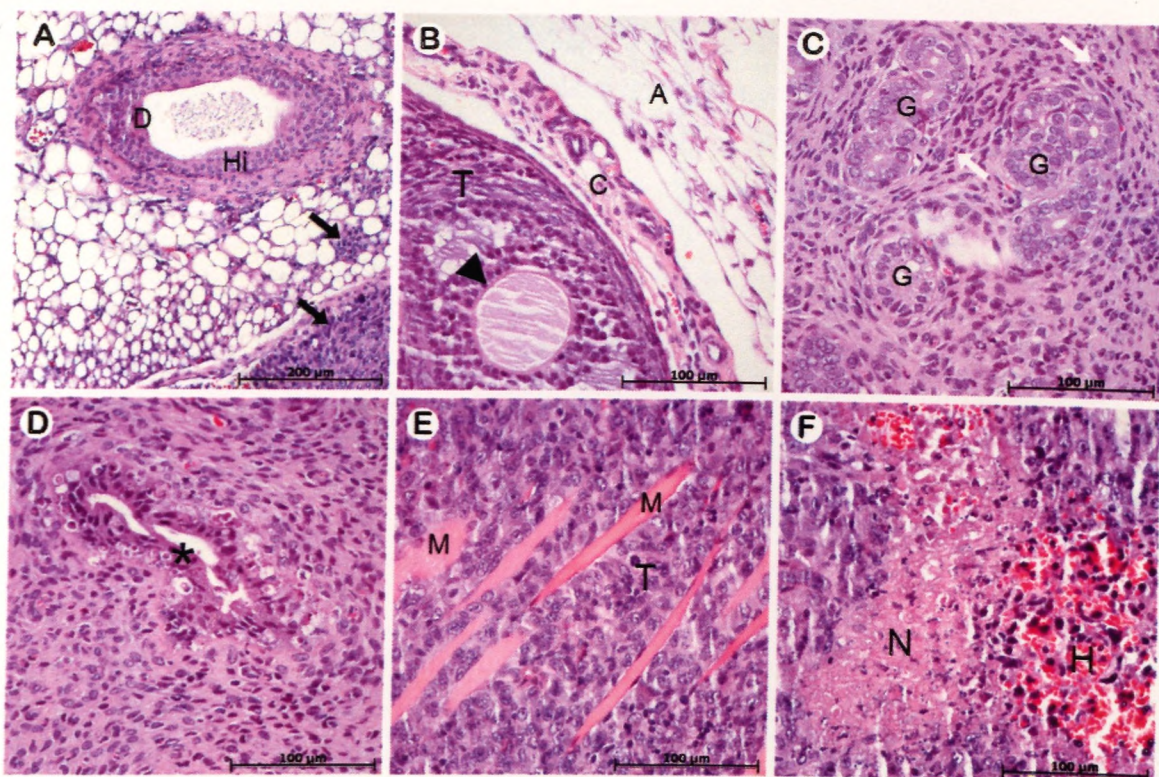


Figura 24: Fotomicrografias de carcinoma mamário (linhagem 4T1) transplantado na mama de camundongos Balb/c sem tratamento (controle). Os animais foram sacrificados após 23 dias do transplante de cédulas tumorais. A) Aspecto geral do parênquima e estroma do tecido mamário composto por duetos (D) com hiperplasia (Hi) e infiltração de células tumorais (seta) adjacentes. B) infiltração de células tumorais (T) adjacentes ao tecido adiposo (A) e conjuntivo (C) e presença de dueto (cabeça de seta). C e D) Tumor constituído por células fusiformes com um componente glandular de permeio (G). Setas brancas representam células em mitose e o asterisco representa alterações no epitélio glandular tumoral. E) Infiltração do tumor 4T1 (T) no tecido muscular (M). F) Áreas de necrose (N) e hemorragia (H) no tumor. Coloração H&E.

No grupo de animais tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$ observou-se células tumorais infiltradas no tecido adiposo e muscular (**Figuras 25 A, B**, respectivamente). Edema inflamatório, caracterizado pela secreção entremeada na região tumoral, foi evidenciado (**Figura 25 C**). Células do tumor, após este tratamento, demonstraram o citoplasma eosinofílico, mais amplo e com núcleo claro (**Figuras 25 D, 25 E**). Além disso, observou-se presença de células apoptóticas, mitóticas e em áreas de necrose (**Figuras 25 D-F**).

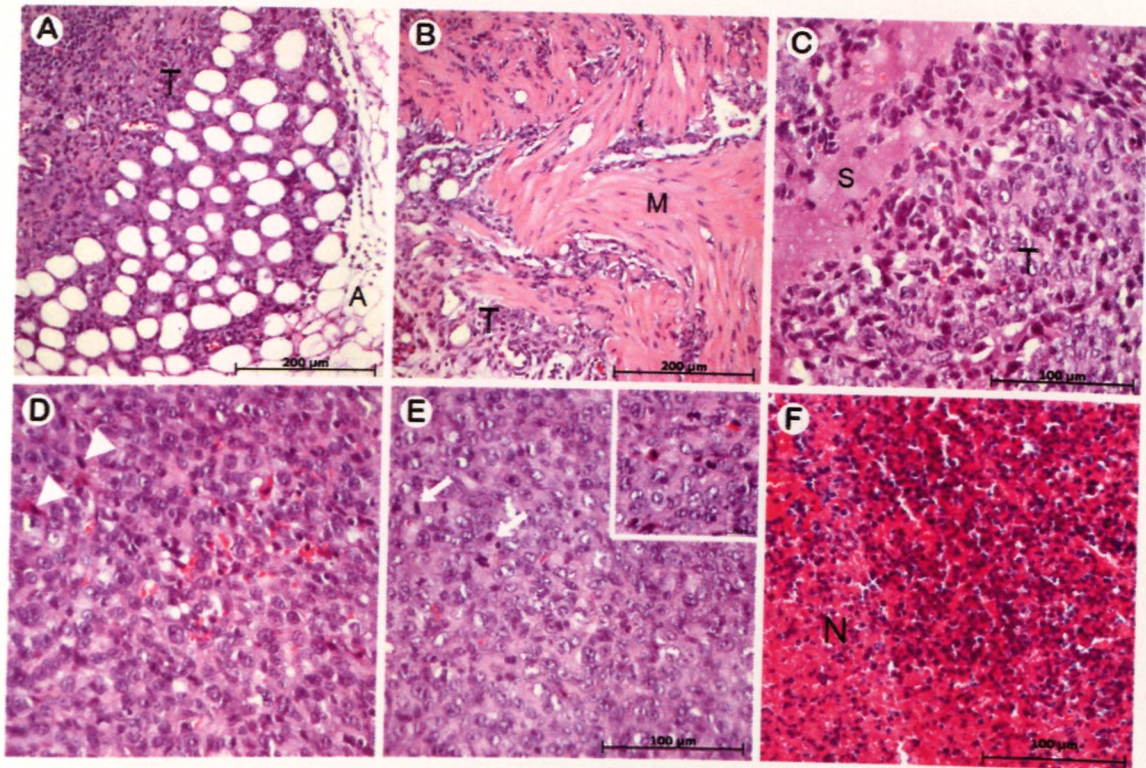


Figura 25: Fotomicrografias de carcinoma mamário tratado com $Rh_2(H_2cit)_4$. Os camundongos receberam uma dose de 1050 μg de $Rh_2(H_2cit)_4$ fracionada em sete aplicações e foram sacrificados após 23 dias do transplante de células tumorais 4T1. **A, B)** Infiltração de células tumorais (T) adjacentes ao tecido adiposo (A) e muscular (M), respectivamente. **C)** Aspecto pleiomórfico de células tumorais 4T1 e região com secreção (S) característica de edema inflamatório. **D, E)** Células tumorais em processo de apoptose (cabeças de setas) e mitose (setas), respectivamente. **F)** Área de necrose (N) no tumor. Coloração H&E.

Uma visão geral do parênquima e estroma mamário é demonstrada na **figura 26 A**, referente à histopatologia de tumores de animais tratados com Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$. Observou-se nesta fotomicrografia ducto circundado por tecido conjuntivo fibroso e muscular e ausência de células tumorais nesta região. Na **figura 26 B** demonstrou-se presença de leucócitos, principalmente de linfócitos, entre as fibras musculares que se apresentam intactas. Também não foram visualizadas células tumorais nesta região do tecido. Área com material de coloração marron-escuro no citoplasma das células revela presença de nanopartículas no tumor, provenientes da composição Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ (**Figura 26 C**). Ainda, como pode ser observado nas **figuras 26 D-E**, o tratamento com esta composição induziu, respectivamente, fibrose, necrose e apoptose no tumor.

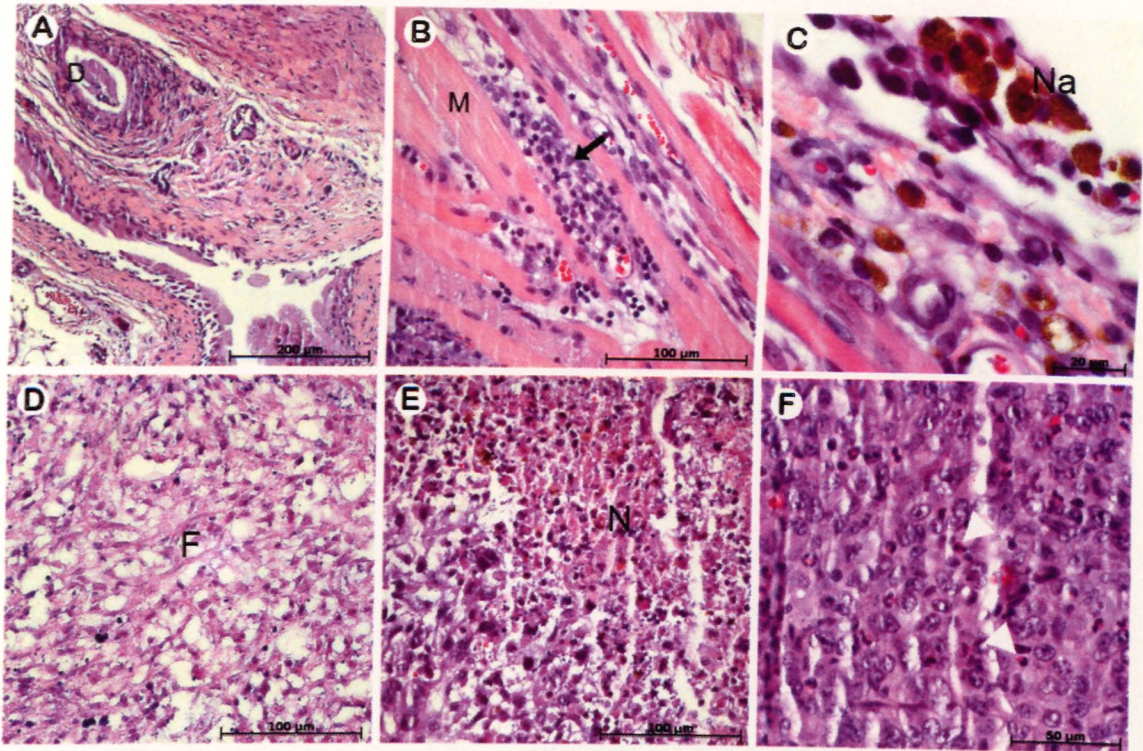


Figura 26: Fotomicrografias de carcinoma mamário tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄. A dose de Rh₂(H₂cit)₄ foi de 1050 pM fracionada em sete aplicações e os animais foram sacrificados após 23 dias do transplante de células tumorais 4T1. A) B) Visão geral do parênquima e estroma mamário formado por ductos (D) circundado por tecido conjuntivo fibroso e muscular (M) adjacentes. Infiltração de linfócitos (seta) entre fibras musculares. C) Presença de agregados de nanopartículas (Na) de maghemita no interior de células tumorais. D e E) Áreas de fibrose (F) e necrose (N) no tecido tumoral. F) Região tumoral com células em apoptose (cabeça de seta). Coloração H&E.

Nos tumores de animais tratados com nanopartículas sem citrato de ródio (Magh-v) notou-se presença de nanopartículas na região central do tumor (**Figuras 27 A-C, E**). Ainda, foram observadas áreas de necrose em regiões próximas aos agregados de nanopartículas (**Figuras 27 B, C**). Neste tratamento notou-se também infiltrado de células tumorais e inflamatórias no parênquima mamário (**Figura 27 D**). Na **figura 27 E** é mostrada em maior aumento uma região de massa tumoral densa apresentando células pleomórficas.

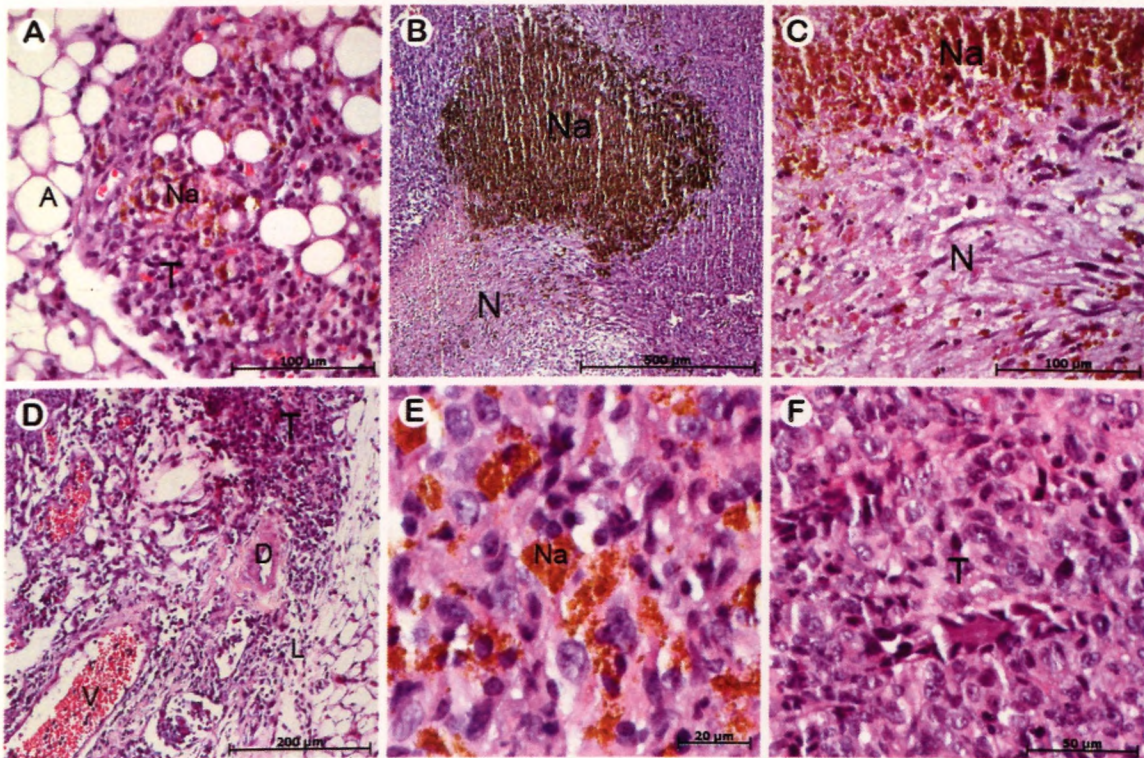


Figura 27: Fotomicrografias de carcinoma mamário tratado com Magh-v. Os camundongos foram tratados com Magh-v e sacrificados após 23 dias do transplante de células tumorais 4T1.

A) Infiltração de células tumorais (T) no tecido adiposo (A) e presença de agregados de nanopartículas (Na) na região tumoral. **B e C)** Tecido tumoral com área de necrose (N) e presença de agregados de nanopartículas (Na) de maghemita na região interna do tumor. **D)** Infiltrado de células tumorais (T) no tecido adiposo e de linfócitos (L), próximo a ducto (D) e vaso sanguíneo (v). **E)** Detalhe da região tumoral apresentando pleiomorfismo e agregados de nanopartículas (Na) de maghemita. **F)** Aspecto pleiomórfico do tumor. Coloração H&E.

Através da coloração de Perls (azul da Prússia) foi possível confirmar presença de materiais de coloração marrom-escuro apenas nos tratamentos com as composições Magh-Rh2(H2Cit)4 ou Magh-v, revelando que estas composições são captadas pelas células tumorais (**Figura 28 A-E**).

Na **figura 28 F** é mostrado um controle positivo para a coloração de Perls, em que estruturas com coloração azulada demonstram a afinidade do ferrocianeto de potássio, presente na solução de coloração, a ferro não oxidado presente como ferro endógeno em componentes celulares tais como hemosiderina, ferritina e/ou melanina. Já as estruturas com coloração marrom-escuro indicam que não houve ligação do ferrocianeto de potássio a estas estruturas e, portanto, indicam presença de ferro oxidado. Como partículas de maghemita são constituídas de ferro oxidado, pressupõe-se que células com a coloração marrom-escuro representam presença destas partículas.

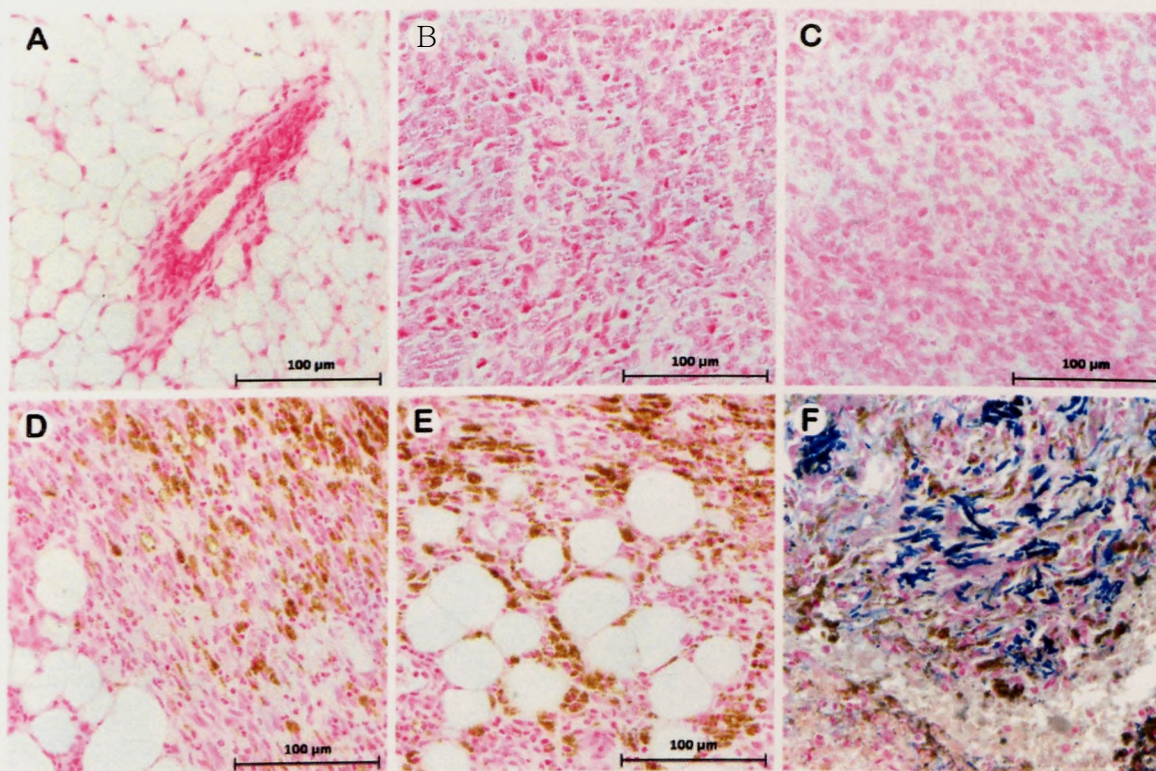


Figura 28: Fotomicrografias de glândula mamária de camundongs Balb/c na ausência (A) ou presença de carcinoma mamário transplantado (B-F). A) Glândula mamária normal. B) Células tumorais 4T1 sem tratamento (controle). C-E) Células tumorais 4T1 com tratamento de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ou $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ou Magh-v , respectivamente. F) Controle positivo da coloração de Perls ou azul da Prússia (tecido humano). A coloração azul-esverdeada indica Fe^{2+} (ferro não oxidado) e a marron indica presença de Fe^{3+} (ferro oxidado). Nas figuras D e E observou-se presença de nanopartículas maghemita (ferro oxidado), representadas pela coloração marron-escuro.

Os diagnósticos histopatológicos nos diferentes grupos experimentais foram baseados em vários critérios descritivos, conforme descrito na tabela 5. Em todos os grupos experimentais os tumores foram caracterizados como pouco diferenciados e com pleiomorfismo moderado. Em relação à necrose, observou-se maior quantidade desta nos tratamentos com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ em relação ao controle e ao tratamento com Magh-v . A necrose visualizada nestes tecidos foi caracterizada como moderada, visto que havia várias áreas compostas por células tumorais viáveis.

O número médio de células em mitose variou entre os diferentes grupos e foi maior no grupo Magh-v , indicando que neste grupo há elevados níveis de proliferação celular. Ainda, observou-se que no grupo controle houve maior quantidade de células em apoptose, provavelmente devido ao intenso crescimento do tumor.

Tabela 5: Análise de parâmetros associados à patologia de tumores sob diferentes tratamentos.

Critérios	Grupos			
	Controle	Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	Magh-v
Apoptose/10CGA	127.5A/10CGA	28.25A/10CGA	107,75/1 OCGA	136.66A/10CQA
Necrose	leve	moderada	moderada	leve
Mitose/10CGA	19,25M/10CGA	8.75M/10CGA	18.75M/10CGA	26.25 M/10CGA
Pie im orfis m o nuc lea r	moderado pouco	moderado pouco	moderado pouco	moderado pouco
D iferenctóció celular	diferenciado	diferenciado	diferenciado	diferenciado

Camundongos portadores de carcinoma mamário receberam sete aplicações de Rh₂(H₂cit)₄ ou Magh-Rh₂(H₂cit)₄ ou Magh-v com doses equimolares de Rh₂(H₂cit)₄ (1050 pM) ou de ferro (1,89 M) durante dias alternados até o 23º dia após o transplante tumoral. Análises histopatológicas foram realizadas em quatro replicatas correspondentes a diferentes animais dentro do mesmo grupo, de acordo com os parâmetros descritos na tabela. As contagens de cada parâmetro, proveniente de análise subjetiva, foram realizadas em 10 campos de grande aumento (CGA) sob magnificação de 400X em microscópio óptico.

5.3.3.2.3 Análises ultraestruturais dos tumores

Uma visão geral do estroma mamário típico de camundongos Balb/c normais (sem tumor) é demonstrada na **figura 29 A**. Foram observados nesta micrografia adipócitos, tecido conjuntivo, vaso sanguíneo e gotículas de lipídio, característicos do estroma da mama. Na **figura 29 B** é mostrada uma região rica em mitocôndrias de um adipócito.

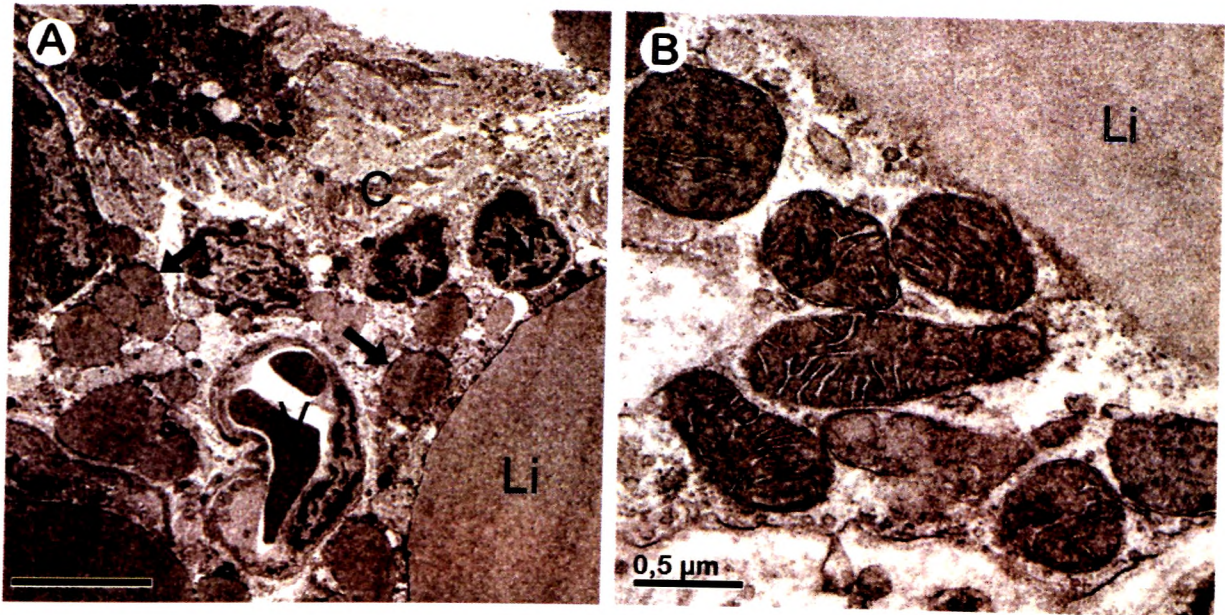


Figura 29: Micrografias eletrônicas da mama de camundongo Balb/c. Legenda: (N) núcleo de um linfócito, (V) vaso sanguíneo, (C) tecido conjuntivo, (M) mitocôndria, (seta preta) gotícula de lipídio

Na **figura 30** são mostradas micrografias de carcinoma mamário de camundongos 23 dias após o transplante de células tumorais da linhagem 4T1 (controle, animais sem tratamento). Uma visão geral da região tumoral é demonstrada na **figura 30 A**. Nesta micrografia pode-se reconhecer presença de fibroblasto e células tumorais apresentando gotículas de lipídio em seu citoplasma. Ainda, são demonstradas em células tumorais presença de gotículas de lipídio próximas ao núcleo e de lisossomos próximos à membrana plasmática (**Figura 30 B**). Células tumorais necrosadas, onde se evidencia membrana plasmática rompida e extravasamento de conteúdos celulares podem ser reconhecidas na **figura 30 C**. Em maior aumento de célula tumoral estão destacados gotículas de lipídio, mitocôndria, complexo de golgi e retículo endoplasmático próximos à região nuclear (**Figura 30 D**).

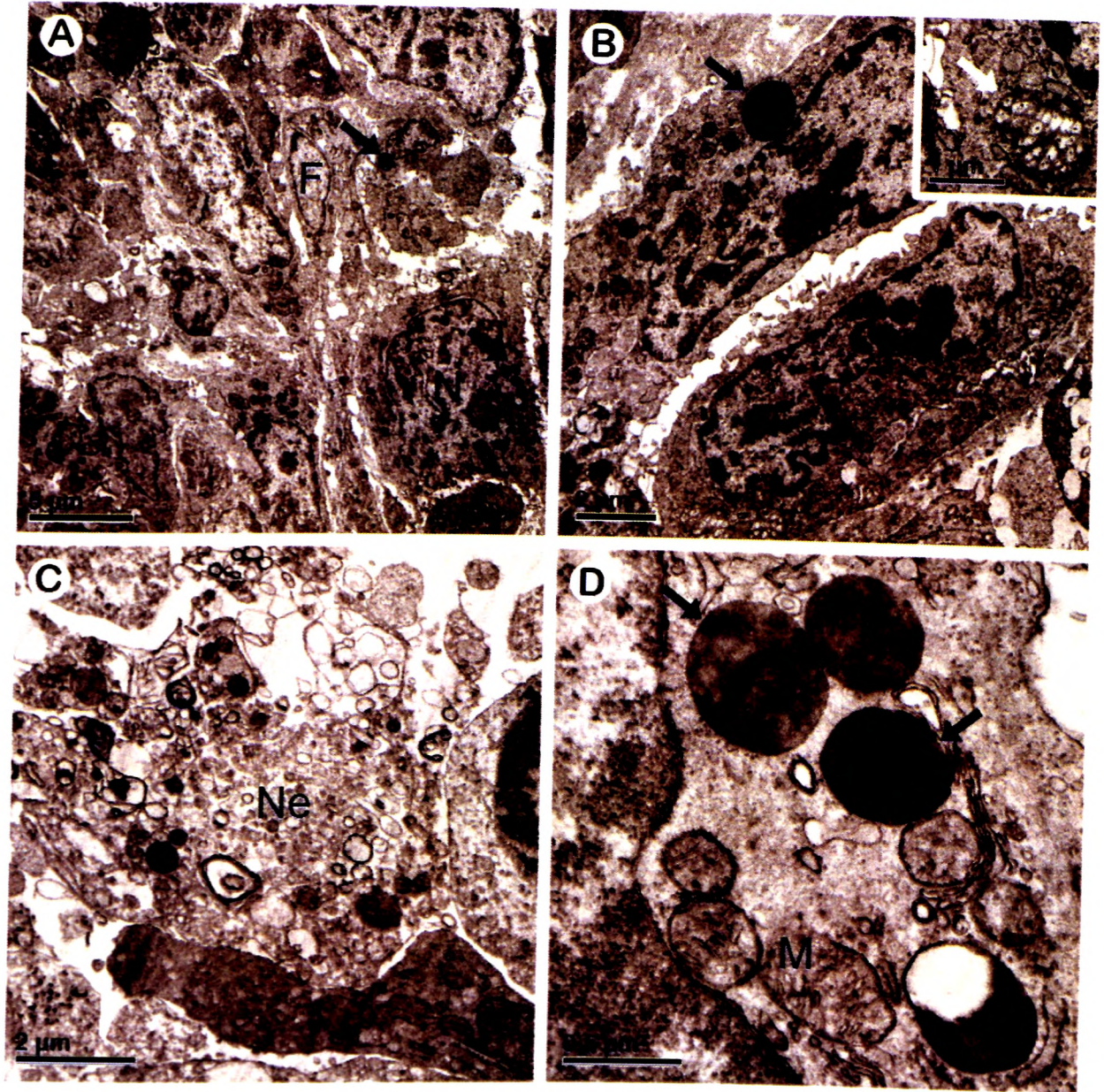


Figura 30: Micrografias eletrônicas de carcinoma mamário de camundongo Balb/c referente ao grupo controle (sem tratamento) 23 dias após o transplante de células tumorais da linhagem 4T1. Legenda: (N) núcleo de célula tumoral, (F) fibroblasto, (Ne) necrose, (seta preta) gotícula de lipídeo, (seta branca) lisossomo, (M) mitocôndria.

São demonstradas na **figura 31** micrografias de carcinoma mamário de camundongos tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$ após 23 dias do transplante do tumor 4T1. Na **figura 31 A** é mostrada uma célula em processo de apoptose com sua cromatina condensada na periferia nuclear. Ainda, nesta micrografia observou-se presença de “bleb” ou corpo apoptótico com conteúdo celular. Um maior aumento deste “bleb” pode ser examinado na **figura 31 B**. Em uma região do tecido tumoral foram observados processos de fibrose e necrose celular (**Figura 31 C**). Um maior

aumento da região que apresenta fibrose, que é caracterizada pela formação ou desenvolvimento de tecido conjuntivo fibroso, é mostrado na **Figura 31 D**.

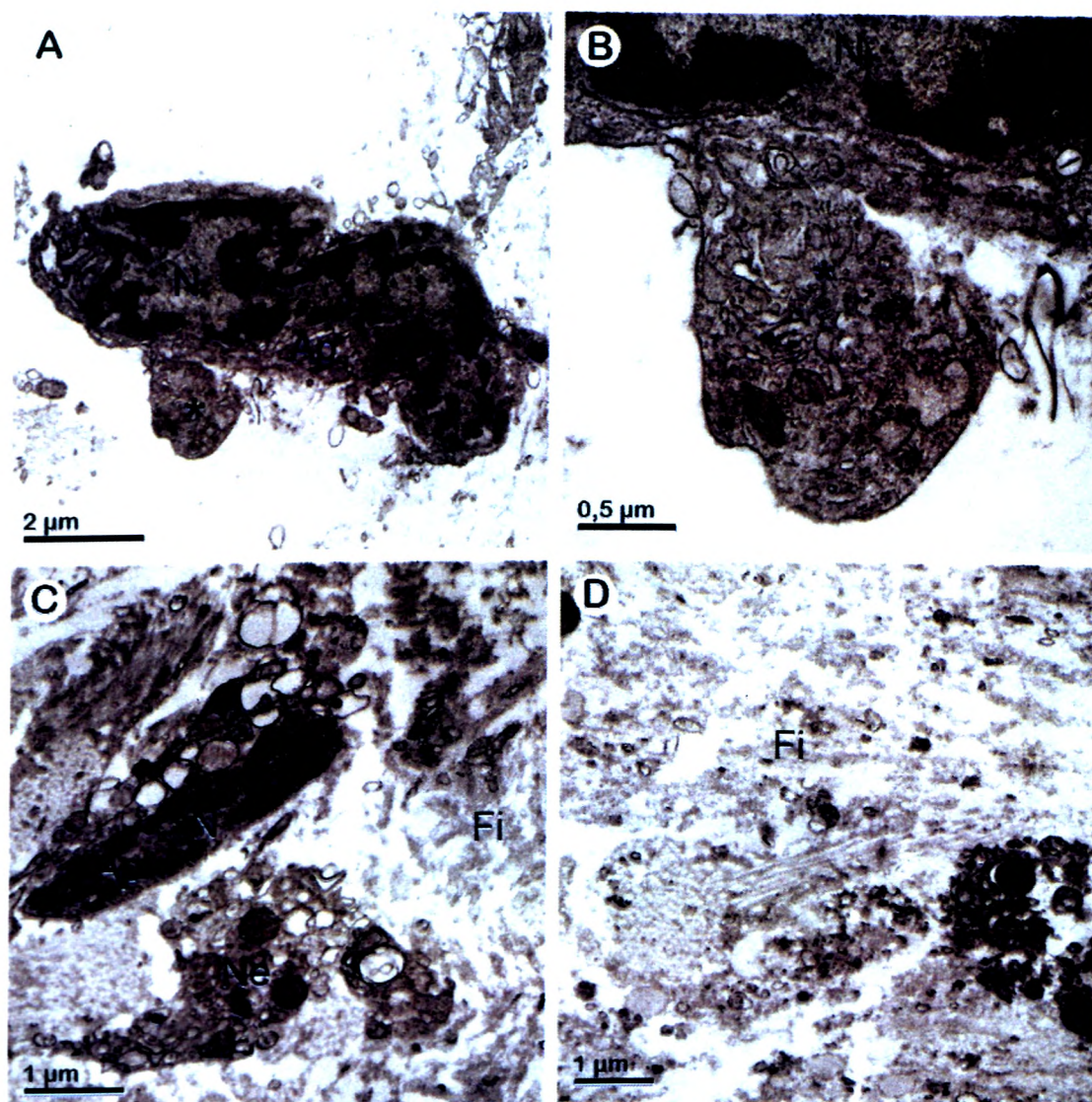


Figura 31: Micrografias eletrônicas de carcinoma mamário de camundongo Balb/c tratado com $Rh_2(H_2cit)_4$ 23 dias após o transplante de células tumorais da linhagem 4T1. Os animais foram tratados com 1050 pM, dose parcelada em sete aplicações. Legenda: (N) núcleo de célula tumoral, (Ap) célula em apoptose, (*) "bleb" de membrana; (Ne) necrose, (Fi) fibrose.

São mostradas na **figura 32** micrografias de carcinoma mamário de camundongos tratados com $Magh-Rh_2(H_2Cit)_4$ após 23 dias do transplante do tumor $4T_1$ é mostrado na **figura 32 A** um panorama do tecido contendo várias células tumorais. Nas regiões de células tumorais foram observadas necrose e gotículas de lipídio (**Figura 32 B e 32 C**, respectivamente). Nanopartículas no núcleo de células tumorais também foram observadas (**Figura 32 D**)

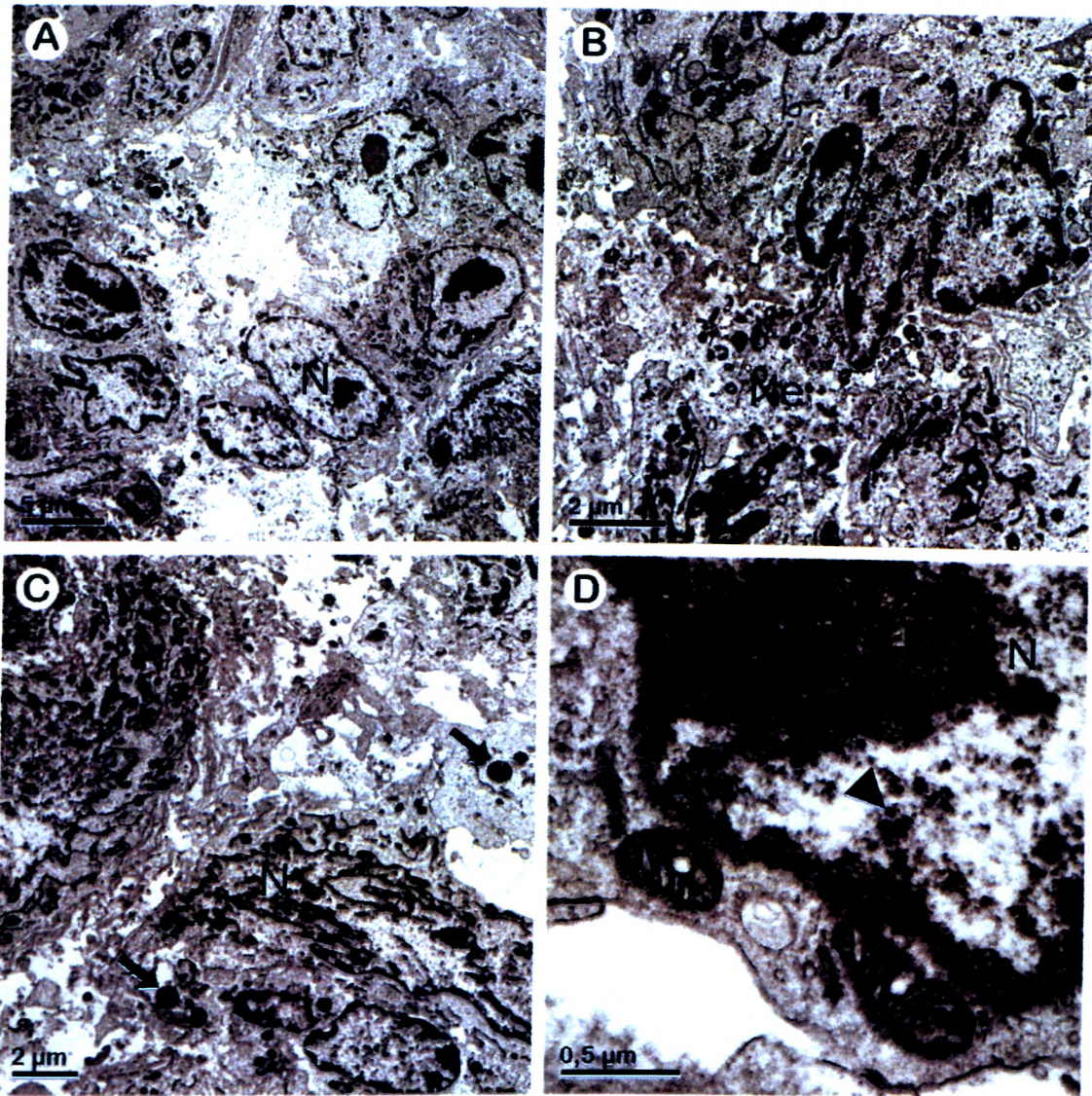


Figura 32: Micrografias eletrônicas de transmissão de carcinoma mamário de camundongo Balb/c tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ 23 dias após o transplante de células tumorais da linhagem 4T1. Legenda: (N) núcleo de célula tumoral, (seta preta) gotícula de lipídio; (Ne) necrose, (M) mitocôndria, (cabeça de seta preta) nanopartícula.

São mostradas na figura 33 micrografias de carcinoma mamário de camundongos tratados com Magh-v após 23 dias do transplante do tumor 4T1, Na figura 33 A é mostrado um panorama do tecido tumoral apresentando células com gotículas de lipídios e células inflamatórias, como linfócito. Nas micrografias representadas nas figuras 33 B e 33 C são mostradas vesículas endocíticas contendo agregados de nanopartículas. Na figura 33 B está representada uma célula tumoral com a cromatina condensada na periferia do núcleo e também a vesícula endocítica é destacada no *in set*. Em um maior aumento de célula tumoral são indicadas várias nanopartículas no citoplasma celular (Figura 33 D).

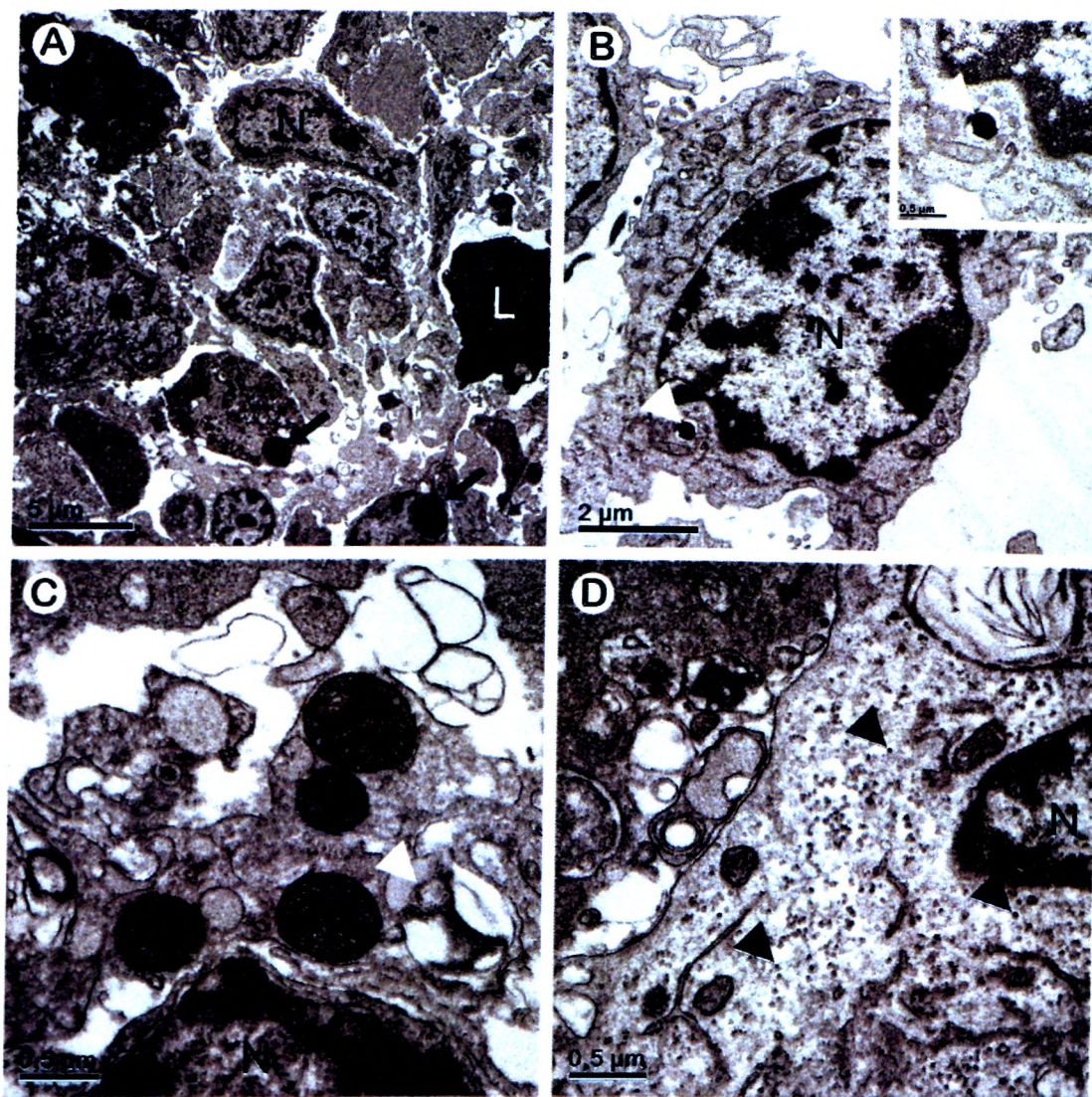


Figura 33: Micrografias eletrônicas de transmissão de carcinoma mamário de camundongo Balb/c tratado com Magh-V 23 dias após o transplante de células tumorais da linhagem 4T1.

Legenda: (N) núcleo de célula tumoral, (L) linfócito, (seta preta) gotícula de lipídio, (cabeça de seta branca) vesícula endocítica contendo nanopartículas; (M) mitocôndria, (cabeça de seta preta) nanopartícula.

5.3.3.2.4 Análises hematológicas e bioquímicas

Em todas as interpretações dos exames hematológicos e bioquímicos os valores obtidos em animais sadios foram adotados como valores de referência, já que o grupo sadio é constituído por animais da mesma raça, idade e submetidos às mesmas condições ambientais. Também sempre foi considerada a referência citada nas tabelas, que são valores de referência para camundongos Balb/c, descritos na literatura.

Análises hematológicas

De uma maneira geral, foram observadas poucas alterações significativas no grupo de animais portadores de tumor em relação a vários parâmetros hematológicos, quando esses foram comparados com o grupo de animal sadio.

Foram verificados aumento do número de plaquetas no grupo de animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (**Tabela 6**) e intensa leucocitose nos animais portadores de carcinoma (grupos controle, Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-v) (**Tabela 7**). Também se detectou um aumento do percentual de células segmentadas e de monócitos.

Por outro lado, verificou-se redução no percentual de eosinófilos em todos os grupos de animais portadores de tumor e redução no percentual de linfócitos, principalmente, no grupo Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Não foram detectados bastonetes nos animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (**Tabela 7**).

Tabela 6: Resultado de exames hematológicos de camundongos Balb/c portadores ou não (sadio) de carcinoma mamário após tratamentos com Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄.

Parâmetros		Controle	Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	Magh-v	Sadio	Referência
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	Média	8.69	10,82	10.07	10.17	11,69	7.3-10.5
	EP	0,27	1.19	1.03	0,86	2.26	
Hemoglobina (g/dL)	Média	13.60	14.75	14.26	13.36	15,47	12.0-15.0
	EP	0.42	0.33	0.14	0.85	0.41	
Hematócrito (%)	Média	41.60	44.62	44.40	41.09	46.00	35,0-50,0
	EP	1.38	0.96	0.39	2.51	1,50	
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	Média	341.50	470.00	576.20	452,29	454.67	497
	EP	51.75	28.91	69.72	53.23	64,71	

Os dados representam a média ± EP (erro padrão da média). Todos os grupos representados correspondem a animais (n=8/grupo) portadores de carcinoma mamário, exceto o grupo sadio que representa animais sem tumor (controle de animais normais). Os grupos de animais Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ receberam sete doses equimolares de Rh₂(H₂cit)₄ (dose total: 1050 ^μM) durante dias alternados até o 23° dia após o transplante tumoral e então as amostras de sangue foram analisadas. Os valores de referência correspondem a valores descritos por Vianna (2007) e por Miyashiro, Massiorom et al, (2010).

Tabela 7: Efeitos dos tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ na contagem global e diferencial de leucócitos de camundongos Balb/c portadores ou não (sadio) de carcinoma mamário.

Parâmetros		Controle	$Rh_2(H_2cit)_4$	$Magh-Rh_2(H_2cit)_4$	$Magh-v$	Sadio	Referência
Leucócitoô {irwnh	Média	18445,50	24555,00	45774,00	59060,00	10306,67	12-13 x 10 ³ *
	EP	6020,68	9693,69	11995,51	25390,07	358,02	
ünfócitos (%)	Média	28,75	38,50	10,80	13,71	79,33	65,9-77,9
	EP	6,651	13,660	3,353	7,665	9,171	
Bastortetes (%)	Média	1,25	0,50	0,00	1,43	1,00	0,13-0,85
	EP	1,25	0,50	0,00	0,65	1,00	
Segmentados (%)	Média	67,00	57,67	84,00	70,57	17,33	15,7-18,5
	EP	7,14	13,40	3,36	7,40	6,84	
Boeinóffios (%)	Média	0,00	0,00	0,00	0,14	0,33	2-2,7
	EP	0,00	0,00	0,00	0,14	0,33	
Basófilos (%)	Média	0,25	0,17	0,00	0,14	0,00	
	EP	0,25	0,17	0,00	0,14	0,00	M
Wortócitos (%)	Média	2,75	3,17	5,20	9,00	2,00	1-1,1
	EP	0,75	1,01	1,11	4,94	1,00	

Os dados representam a média e \pm EP (erro padrão da média). Todos os grupos representados correspondem a animais (n=8/grupo) portadores de carcinoma mamário, exceto o grupo sadio que representa animais sem tumor. Os grupos de animais $Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ receberam sete doses equimolares de $Rh_2(H_2cit)_4$ (dose total: 1050 pM) durante dias alternados até o 23º dia após o transplante tumoral e então as amostras de sangue foram analisadas. Os valores de referência correspondem a valores descritos por Vianna (2007) e por Miyashiro, Massioroni et al, (2010) e o asterisco indica que não foi encontrado um valor de referência para basófilo.

Análises bioquímicas

Os valores bioquímicos dosados a partir do plasma sanguíneo dos animais sadios ou portadores de carcinoma tratados ou não (controle) com $Rh_2(H_2cit)_4$, $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ ou $Magh-v$ estão representados nas **Figuras 34- 36**. Os valores de creatinina, transaminase pirúvica e ferro sérico não foram alterados pelos tratamentos.

Os níveis de creatinina foram iguais a 0,1 mg/mL nos animais dos grupos controle, $Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$. Já nos grupos $Magh-v$ e sadio (animais sem tumor) observou-se um leve aumento no nível médio desse metabólito em relação aos outros grupos, mas esta diferença não representou significância estatística

(Figura 34). Não houve alterações significativas nos níveis de transaminase pirúvica (TGP) e nos níveis de ferro sérico em todos os grupos (Figuras 35 e 36, respectivamente).

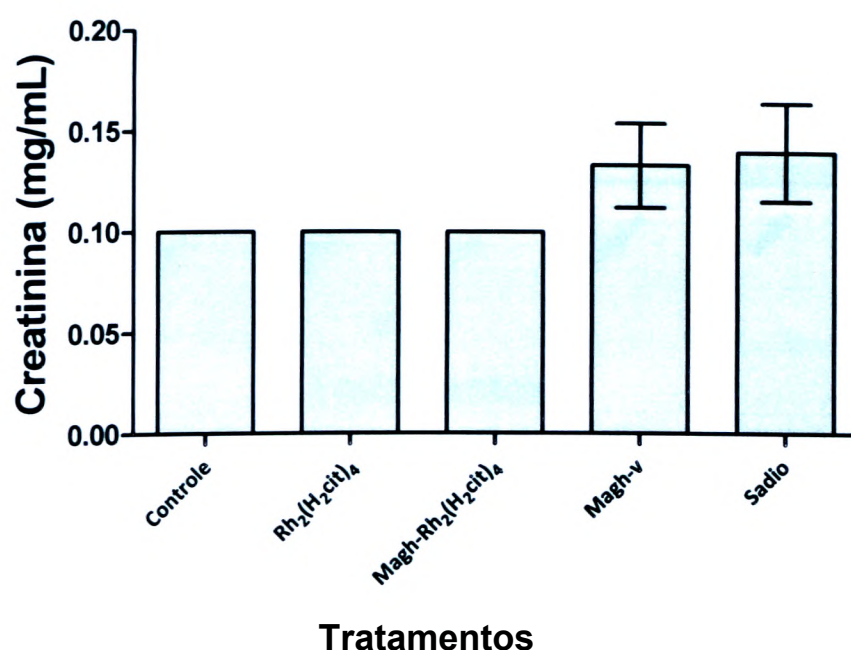


Figura 34: Níveis bioquímicos de creatinina dosados no soro de camundongos portadores de carcinoma mamário sob os tratamentos descritos. Os grupos Rh₂(H₂Cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂Cit)₄ receberam sete doses equimolares de Rh₂(H₂cit)₄ (dose total: 1050 pM) durante dias alternados até o 23º dia após o transplante tumoral. Dados correspondem a valores da média ± erro padrão (n=8/grupo).

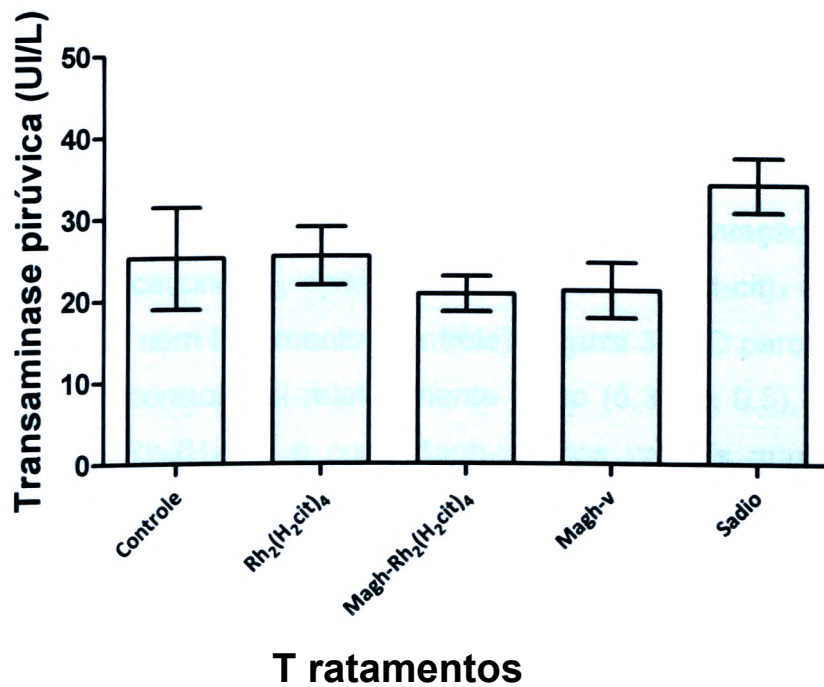


Figura 35: Níveis bioquímicos de transaminase pirúvica dosados no soro de camundongos portadores de carcinoma mamário sob os tratamentos descritos. Os grupos Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ receberam sete doses equimolares de Rh₂(H₂cit)₄ (dose total: 1050 pM) durante dias alternados até o 23° dia após o transplante tumoral. Dados correspondem a valores da média ± erro padrão (n=8/grupo).

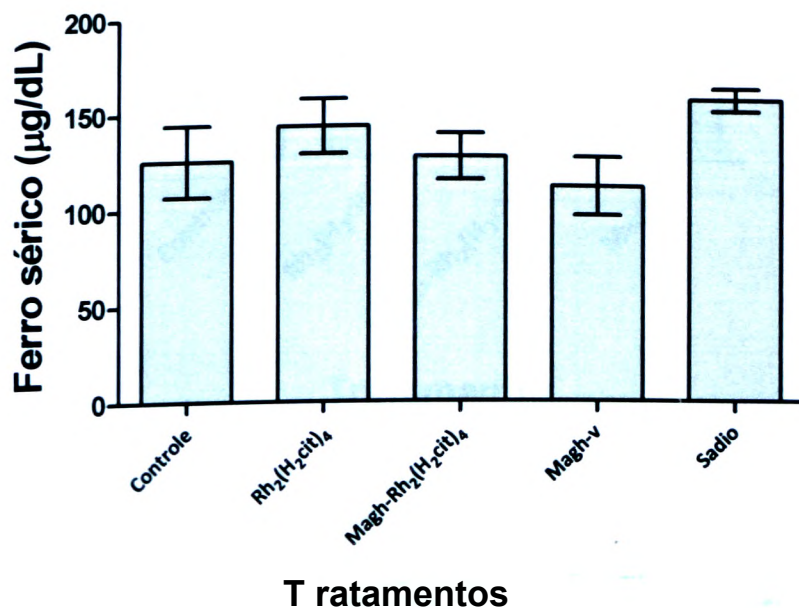


Figura 36: Níveis bioquímicos de ferro sérico dosados no soro de camundongos portadores de carcinoma mamário sob os tratamentos descritos. Os grupos Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ receberam sete doses equimolares de Rh₂(H₂cit)₄ (dose total: 1050 pM) durante dias alternados até o 23° dia após o transplante tumoral. Dados correspondem a valores da média ± erro padrão (n=8/grupo).

5.3.3.3 Análise de genotoxicidade: fragmentação do DNA de células da medula óssea

Foi observado um aumento no percentual de fragmentação de DNA, de animais portadores de carcinoma, após tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$ e com Magh-v em relação aos animais sem tratamento (controle) (Figura 37). O percentual de DNA fragmentado no grupo controle foi relativamente baixo ($5,3\% \pm 0,5$), enquanto que nos tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ e com Magh-v estes valores aumentaram para $9,2\% (\pm 2,1)$ e $8,3\% (\pm 0,9)$, respectivamente. Já nos animais tratados com Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ o percentual de fragmentação foi de $6,3\% (\pm 0,6)$, sendo este considerado, portanto, semelhante ao controle e diferente dos demais tratamentos.

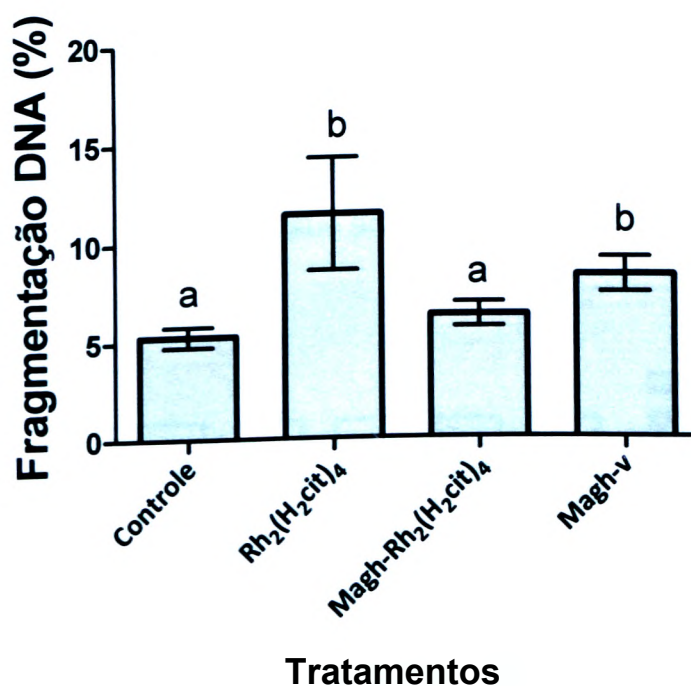


Figura 37: Efeito de diferentes formulações contendo $Rh_2(H_2cit)_4$ sobre a fragmentação do DNA em células da medula óssea de camundongos portadores de carcinoma mamário. Os grupos $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ receberam sete doses equimolares de $Rh_2(H_2cit)_4$ (dose total: $1050 \mu M$) durante dias alternados até o 23 dias após o transplante tumoral. O grupo controle corresponde a animais sem tratamento e Magh-v refere-se a animais tratados apenas com nanopartículas de maghemita. Dados correspondem a valores da média \pm erro padrão ($n=8$ /grupo). Letras diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

5.3.3.4 Análise de efeito citostático: avaliação do ciclo de células da medula óssea

Não houve alteração no perfil do ciclo celular entre os animais portadores de carcinoma. Ainda, a maioria das células da medula óssea de camundongos portadores ou não (sadio) de carcinoma mamário apresentaram-se na fase G0/G1 do ciclo celular, independente do tratamento.

Em relação ao perfil do ciclo observou-se, em todos os grupos de animais portadores de tumor, diferença significativa na proporção de células (não fragmentadas) em cada fase do ciclo celular (G0/G1, S, G2/M) quando se comparou aos animais sadios ($p < 0,05$).

Observou-se que na presença do tumor, independentemente do tratamento, houve um aumento significativo em células que se encontravam em G0/G1 (>75%) em relação àquelas dos animais sadios (<70%). Por outro lado, houve uma queda na proporção de células nas demais fases do ciclo (S e G2/M) nos animais portadores de tumor. Na fase S, por exemplo, observou-se um percentual médio de 12% versus 16%, enquanto que na fase G2/M este percentual foi de 9% versus 15% entre animais portadores de tumor versus animais sadios ($p < 0,01$).

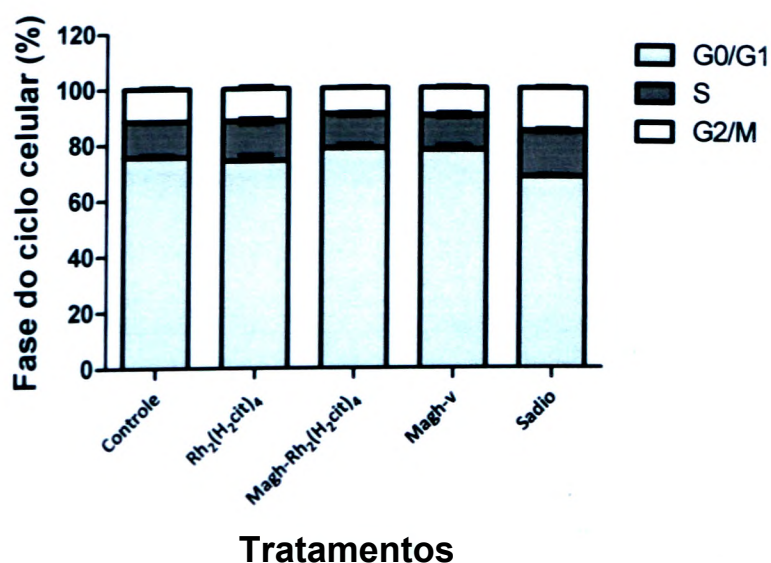


Figura 38: Efeito de Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ na proliferação de células da medula óssea de camundongos portadores ou não (sadios) de carcinoma mamário. Nos grupos Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh^{HzCit} os animais receberam doses equimolares de Rh₂(H₂cit)₄ (dose total: 1050 pM). O grupo controle corresponde a animais sem tratamento e Magh-v refere-se a animais tratados apenas com nanopartículas de maghemita. As fases do ciclo celular foram analisadas pela marcação com

iodeto de propídio por meio de citometria de fluxo. Os dados foram expressos como porcentagens de G0/G1, S e G2/M e representam a média \pm EP (n=8/grupo).

Abaixo são resumidos os efeitos biológicos mais relevantes de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ livre e associado a NPM em carcinoma mamário relacionando os estudos *in vitro* e *in vivo* (Tabela 8).

Tabela 8: Resumo dos efeitos biológicos de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ livre e associado a NPM e ML em células de carcinoma mamário.

Efeito	Resultado
Viabilidade celular	<ul style="list-style-type: none"> • $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ induziu citotoxicidade em células das linhagens MCF-7, 4T1 e MCF-10A de maneira dependente da dose, do tempo e do tipo celular. O efeito citotóxico de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ foi mais intenso com doses mais elevadas, com o decorrer do tempo e em células normais (MCF-10A). • Tratamentos com Magh-$\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e com Lip-Magh-$\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ foram mais citotóxicos do que doses equimolares de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ livre e induziram maior efeito citotóxico em células de carcinoma mamário (MCF-7 e 4T1) do que em células normais (MCF-10A).
Morfologia celular	<ul style="list-style-type: none"> • $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ induziu alterações morfológicas e estruturais em células das linhagens MCF-7 e 4T1 como condensação e fragmentação nuclear, desorganização de filamentos de actina, <i>blebbing</i> na membrana plasmática, aumento da quantidade de lisossomas e condensação mitocondrial.
Morte celular	<ul style="list-style-type: none"> • $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ induziu morte celular provavelmente por apoptose nos tratamentos com 500 μM, pois esta composição aumentou a quantidade de fosfatidilserina no exterior da membrana plasmática.
Toxicidade <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Os tratamentos com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e com Magh-$\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, de uma forma geral, não induziram toxicidade relevante em camundongos Balb/c portadores de carcinoma mamário. O tratamento com Magh-$\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ proporcionou sobrevida de camundongos Balb/c, portadores de tumor, similar à dos animais saudáveis.
Atividade antitumoral	<ul style="list-style-type: none"> • Os tratamentos com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e com Magh-$\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ induziram efeito antitumoral significativo em camundongos Balb/c portadores de carcinoma mamário.

6 DISCUSSÃO

6.1 Considerações sobre a caracterização de nanopartículas magnéticas

As composições de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e de Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄, utilizadas em nosso estudo, apresentaram formatos esféricos e diâmetros modais de respectivamente 7,85 nm (± 2,10) e 28,19 nm (± 6,17). Estudos preliminares realizados por Brugin (2007) demonstram que nanopartículas de maghemita recobertas com citrato apresentaram diâmetro semelhante (10 nm) ao que observamos em nossa composição de nanopartículas de maghemita associadas a citrato de ródio (II) (Magh-Rh₂(H₂cit)₄). Ainda, esse estudo mostrou que nanopartículas de maghemita recobertas com citrato apresentaram elevado potencial para uso em aplicações biomédicas, visto que nanopartículas de maghemita recobertas com citrato não apresentaram toxicidade significativa em camundongos saudáveis da linhagem Swiss (BRUGIN, 2007).

É descrito na literatura que NPs baseadas em cobalto, recobertas com citrato, apresentaram diâmetro semelhante (4,1 a 17,8 nm) ao que observamos na composição de Magh-Rh₂(H₂Cit)₄ (MORAIS *et al.*, 2006). Sabe-se que partículas menores que 12 nm, além de apresentarem boa aplicabilidade magnética, também são ideais para evitar reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear. Com isso, elas podem permanecer por mais tempo na corrente sanguínea, penetrar em pequenos capilares e, assim, ter uma biodistribuição mais efetiva em células-alvo (DOUZIECH-EYROLLES *et al.*, 2007). Desta forma, a composição de Magh-Rh₂(H₂Cit)₄ apresenta potencial aplicação clínica, já que possuem diâmetros dentro da faixa considerada ideal para uso em sistemas biológicos.

6.2 Ensaios in vitro

6.2.1 Considerações sobre a citotoxicidade de citrato de ródio (II) livre

Em nosso estudo, nós demonstramos que $Rh_2(H_2cit)_4$ induziu citotoxicidade em células das linhagens MCF-7, 4T1 e MCF-10A de maneira dependente da dose, do tempo e do tipo celular. Esses resultados estão em conformidade com um estudo pioneiro, realizado por Zyngier e Kimura *et al.* (1989), o qual demonstrou que este mesmo complexo ($Rh_2(H_2cit)_4$) induziu maior citotoxicidade com o aumento da dose e do tempo de tratamento em células de carcinoma de origem mamária (Ehrlich) e em células tumorais (Y-1) e normais da adrenocortical (AR-1(6)). Nós verificamos que o efeito citotóxico de $Rh_2(H_2cit)_4$ foi mais intenso com doses mais elevadas e com o decorrer do tempo, além de este efeito ter sido diferenciado entre as linhagens celulares investigadas (Tabelas 3 e 4). Também verificamos que esta citotoxicidade estava relacionada às alterações estruturais e morfológicas induzidas por este complexo em células tumorais das linhagens 4T1 e MCF-7 (Figuras 5-10). Em virtude de existir apenas um artigo relatando a cito e toxicidade celular de citrato de ródio (II) (ZYNGIER, KIMURA e NAJJAR, 1989), serão discutidos abaixo alguns efeitos biológicos de outros tipos de carboxilatos de ródio em cultura de células e em animais.

Estudos com carboxilatos de ródio tais como acetato, metróxi-acetato, propianato e butirato de ródio demonstraram que estes complexos inibiram a proliferação de células de leucemia (linhagem L1210) de maneira dependente da dose e do tempo de tratamento (HOWARD, KIMBALL e BEAR, 1979). Ainda, similares testes *in vitro* demonstraram que acetato, propianato e butirato de ródio, associados a ácido isonicotínico, induziram citotoxicidade na linhagem de células de leucemia K562 (DE SOUZA *et ai*, 1996).

Vários estudos têm relatado uma promissora atividade antiproliferativa de diversos carboxilatos de ródio em animais portadores de carcinoma mamário de Ehrlich. No entanto, suas atividades citotóxicas e antitumorais têm sido limitadas pela sua toxicidade em células normais (ERCK *et ai*, 1974; ZYNGIER, KIMURA e NAJJAR, 1989; REIBSCHEID *et ai*, 1994; DE SOUZA, COELHO e ZYNGIER,

2006). Em nosso estudo, nós demonstramos que $Rh_2(H_2Cit)_4$ induziu citotoxicidade tanto em células tumorais como em células normais.

Os valores de IC_{50} (Tabela 4) mostraram que o efeito citotóxico de $Rh_2(H_2cit)_4$ foi mais intenso em células normais (MCF-10A) do que em células de carcinoma (MCF-7 e 4T1). Entretanto, de acordo com estes valores de IC_{50} demonstramos que $Rh_2(H_2Cit)_4$ foi menos tóxico em relação a outros carboxilatos de ródio lipofílicos tais como propionato, butirato e acetato (HOWARD, KIMBALL e BEAR, 1979). Portanto, $Rh_2(H_2cit)_4$, um complexo hidrofílico, poderia apresentar maior potencial terapêutico na quimioterapia do que outros carboxilatos.

A distinta toxicidade induzida por carboxilatos lipofílicos e hidrofílicos poderia ser explicada pelas diferenças nas suas propriedades tais como comprimento da cadeia e lipofilicidade dos radicais. Estas características podem alterar características como cinética e solubilidade dos complexos e, dessa forma, afetar suas atividades biológicas. Por exemplo, a maioria dos carboxilatos é capaz de penetrar na membrana plasmática celular devido ao seu caráter lipofílico e isto confere maior toxicidade a estes (KATSAROS e ANAGNOSTOPOULOU, 2002). Ainda, a atividade biológica de complexos de ródio é influenciada pela labilidade de grupos ligados ao ródio, pela presença de sítios de coordenação aberta e pela carga total do complexo. A labilidade, por exemplo, favorece substituições nucleofílicas com átomos doadores de elétrons tais como nitrogênio, enxofre, oxigênio ou fósforo (HOWARD, SPRING e BEAR, 1976; ANGELES-BOZA *et al.*, 2006).

A atividade citotóxica de carboxilatos de ródio, em geral, tem sido atribuída à capacidade destes complexos em se ligar, covalentemente, às bases desemparelhadas de DNA, inibindo sua síntese e transcrição (HOWARD, KIMBALL e BEAR, 1979; ZYNGIER, KIMURA e NAJJAR, 1989; JUNICKE *et al.*, 2003; ANGELES-BOZA *et al.*, 2006). Também tem sido relatado que carboxilatos de ródio estabelecem adutos, através de seus ligantes axiais, com átomos doadores de elétrons (preferencialmente nitrogênio, enxofre, oxigênio e fósforo) de moléculas como adenina e RNase A (ERCK *et al.*, 1974; HOWARD, SPRING e BEAR, 1976; CHIFOTIDES e DUNBAR, 2005).

Ainda, carboxilatos de ródio podem também interagir, irreversivelmente, com enzimas que apresentam grupos tiol livres (-SH) (HOWARD, SPRING e BEAR, 1976). Esta interação poderia explicar a inativação de algumas enzimas essenciais para replicação do DNA, ocasionando sua inibição e conseqüentemente a toxicidade

celular. Assim, a citotoxicidade inespecífica, observada entre complexos metálicos, talvez seja conseqüência deles terem como alvo o DNA de células normais e de carcinoma, já que a replicação do DNA é essencial para sobrevivência de ambos os tipos celulares.

Zyngier e Kimura *et al* (1989) demonstraram que $Rh_2(H_2Cit)_4$ inibiu a síntese de DNA de células de carcinoma mamário (Ehrlich), de carcinoma da adrenocortical (Y-1) e de células normais (AR-1(6)) da adrenocortical. Estes resultados estão de acordo com o que foi observado já que foi verificada citotoxicidade em células de linhagens tumorais e normais. Em células de adenocarcinoma (MCF-7) foi verificado que na dose de 500 μM o $Rh_2(H_2cit)_4$ induziu condensação e fragmentação nuclear após 48 horas de tratamento (Figura 10 C e 10 E).

A elevada citotoxicidade induzida por $Rh_2(H_2cit)_4$ em células normais (Tabela 3 e Figura 6) poderia também ser explicada pelo fato do ânion citrato, presente no complexo de $Rh_2(H_2cit)_4$, poder agir como um dos substratos do ciclo de Krebs. Neste caso, essa molécula poderia interagir com ligantes na cadeia respiratória, interferindo o processo de produção de ATP (adenosina trifosfato) causando, assim, um desbalanço de substratos e interrompendo a respiração celular (ZYNGIER, KIMURA e NAJJAR, 1989). Células normais produzem energia por fosforilação oxidativa mitocondrial; enquanto células tumorais a produzem, preferencialmente, via glicólise anaeróbica (ROSSIGNOL *et al.*, 2004). Portanto, células normais poderiam ser mais sensíveis ao tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$ devido serem mais suscetíveis a interrupção energética do que células tumorais.

De acordo com nossas micrografias de MET, células MCF-7 e 4T1 apresentaram mitocôndrias condensadas após 48 h de tratamento com 500 μM de $Rh_2(H_2cit)_4$ (Figuras 8 D, F e 9 D, F), indicando que esta organela é, de alguma forma, afetada por este complexo. Uma hipótese é que esta condensação de mitocôndria poderia indicar que esta organela estaria em um estado compensatório característico de células tentando manter seu metabolismo energético apropriado (MORSE *et al.*, 2005). Outros estudos associam condensação da mitocôndria com alterações no potencial de membrana, o que está relacionado a processos de morte celular (GOTTLIEB *et al.*, 2003). Ainda, o tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$ (500 μM) induziu o aumento da quantidade de lisossomos em comparação com células não tratadas (Figuras 8 e 9). Um aumento da quantidade de lisossomos poderia indicar

células sob processos autofágicos, já que estas organelas são o destino final de estruturas danificadas (TURCOTTE e GIACCIA; MIZUSHIMA, 2004).

Após 48 h de tratamento com 500 pM de $Rh_2(H_2cit)_4$, foi observado um aumento na quantidade de anexina V* em células de câncer de mama (Figura 11). A presença de anexina V* nas células está relacionada a eventos apoptóticos, já que isto indica exposição de fosfatidilserina no exterior da membrana plasmática (FERLINI *et al.*, 1996).

Também a análise de filamentos de actina, realizada em microscópio confocal, demonstrou que houve uma desorganização do citoesqueleto de actina após tratamento com 500 pM de $Rh_2(H_2cit)_4$ em células MCF-7 (Figura 11). Ainda, houve notável redução na comunicação intercelular possivelmente causada pelas alterações no citoesqueleto de actina. Este componente celular é um importante alvo para terapias anticâncer e antiangiogênica, já que desempenham um papel crucial na manutenção da estrutura celular, na mitose, na regulação da sinalização celular para sobrevivência e motilidade celular (JORDAN e WILSON, 1998; ROSENBLUM e SHIVERS, 2000; ALBERTI, 2009). Foi mostrado que a redução dos filamentos de actina após o tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$ está intrinsecamente relacionada a elevada citotoxicidade deste complexo em células MCF-7 (Tabela 3 e Figura 11).

Em resumo, $Rh_2(H_2cit)_4$ induziu alterações nas células MCF-7 e 4T1 que estão relacionadas a processos de apoptose como fragmentação do núcleo e membrana plasmática, desorganização do citoesqueleto de actina e exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática. Assim, nós sugerimos que $Rh_2(H_2cit)_4$ apresenta potencial para aplicação na quimioterapia já que o sucesso de agentes quimioterapêuticos está relacionado à sua capacidade de induzir apoptose em células malignas (MAZUR *et al.*, 2009).

6.2.2 Considerações sobre a citotoxicidade de $Rh_2(H_2cit)_4$ associado a NPM e a ML

Em virtude do potencial terapêutico de $Rh_2(H_2cit)_4$ no tratamento do câncer, restrito pela sua toxicidade em células normais, foi proposta a associação deste complexo a NPM e a ML. O tratamento com 50 pM de $Rh_2(H_2cit)_4$ associado a NPM (Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$) e a ML (Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$) foram significativamente mais citotóxicos do que doses equimolares de $Rh_2(H_2cit)_4$ livre. Além disso, o tratamento com Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ (em células 4T1 após 72 h) induziu citotoxicidade similar a uma dose dez vezes maior (500 pM) do complexo livre ($26,07 \pm 2,07$ versus $26,13 \pm 1,43$).

As composições Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ induziram efeito citotóxico tempo dependente, assim como observado com o complexo livre ($Rh_2(H_2cit)_4$). Após 72 horas, por exemplo, tratamentos com Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ potencializaram a citotoxicidade de $Rh_2(H_2cit)_4$ até 3,9 a 4,6 vezes, respectivamente. Além disso, em geral, células de carcinoma (MCF-7 e 4T1) foram mais suscetíveis ao tratamento com Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ do que células normais (MCF-10A), diferentemente do que foi observado no tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$ livre (Figura 12 e Tabela 2).

Sabe-se que células de carcinoma e normais apresentam metabolismos diferentes em relação à absorção de ferro. O metabolismo de células de carcinoma, por exemplo, é mais acelerado em relação ao de células normais. Consequentemente, células de carcinoma requerem maior quantidade de micronutrientes, particularmente de ferro. Ainda, células tumorais apresentam maior quantidade de receptores de transferrina em sua membrana plasmática (KWOK e RICHARDSON, 2002). Deste modo, um aumento da absorção de ferro por células tumorais poderia resultar em uma absorção seletiva com maior retenção de Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ em relação ao $Rh_2(H_2cit)_4$ livre. Também níveis mais elevados de ferro poderiam ser responsáveis por produzir radicais livres, o que poderia contribuir para a indução de toxicidade celular (HARHAJI *et al*, 2004).

Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com moléculas aniônicas exibem alta afinidade por sítios catiônicos na membrana plasmática. Adicionalmente, a absorção de nanopartículas magnéticas por células de carcinoma pode estar

relacionada com a sua cobertura de grupos amino (PETRI-FINK *et al.*, 2005). Também é reportado na literatura que grupos tióis livres (SH) interagem com carboxilatos de ródio, que são ricos em grupos carboxílicos (HOWARD, KIMBALL e BEAR, 1979). Talvez os grupos carboxílicos, presentes nas moléculas de citrato na composição Magh-Rh₂(H₂cit)₄, poderiam também facilitar a interiorização de nanopartículas na membrana celular via proteínas ricas em grupos tióis.

Embora nanopartículas de maghemita associadas a Rh₂(H₂Cit)₄ nunca tenham sido descritas antes, a associação de citrato de ródio (II) com microesferas poliméricas de hidroxil-propil-ciclodextrina (SINISTERRA *et al.*, 1999) e ciclodextrinas de hidroxiapatita (BURGOS, BELCHIOR e SINISTERRA, 2002) tem sido reportada. As associações de Rh₂(H₂cit)₄ a estes polímeros representam uma alternativa promissora para minimizar a toxicidade inespecífica de Rh₂(H₂cit)₄, principalmente porque elas aumentam a eficiência de liberação controlada deste complexo (SINISTERRA *et al.*, 1999; BURGOS, BELCHIOR e SINISTERRA, 2002). Em nosso estudo foi mostrado que as composições Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Lip-Magh-Rh₂(H₂Cit)₄ apresentam maior atividade citotóxica em células tumorais do que em células normais e também em relação ao complexo livre. Isto demonstra que estas composições apresentaram-se mais eficazes do que Rh₂(H₂Cit)₄ livre.

Nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato tem sido testadas como bons materiais para produção de fluidos magnéticos biocompatíveis e estáveis (LACAVA *et al.*, 1999; MORAIS *et al.*, 2006; BRUGIN, 2007). É descrito na literatura que este tipo de NPs são absorvidas e não causam citotoxicidade em células humanas de melanoma (SKMEL 37) *in vitro* após 72 horas (DE FREITAS *et al.*, 2008). No presente estudo, a molécula de citrato, presente no Rh₂(H₂cit)₄, foi responsável por estabilizar as nanopartículas de maghemita presentes na composição Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Além disso, a composição de NPM funcionalizadas apenas com citrato (Magh-v), utilizadas neste estudo como um grupo controle de Magh-Rh₂(H₂cit)₄, não causaram citotoxicidade significativa.

Portanto, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Lip-Magh-Rh₂(H₂cit)₄ apresentam um enorme potencial para aplicação em sistemas de entrega de drogas e, NPM e ML poderiam ser consideradas plataformas para aumentar a eficiência de Rh₂(H₂cit)₄, especialmente em carcinoma mamário.

6.3 Ensaios in vivo

6.3.1 Considerações sobre a progressão e padrão de crescimento ortópico do tumor 4T1 e modelos experimentais

Em nosso estudo, todos os camundongos Balb/c desenvolveram tumor na mama após transplante ortópico das células 4T1. Nos tempos anteriores a doze dias do transplante a área do tumor foi inferior a 14 mm². Todavia, a partir do 12° dia observou-se um crescimento progressivo e abrupto a partir do 18° dia (Figura 15), demonstrando que esta linhagem celular é muito invasiva e tem replicação muito rápida após 18 dias do transplante.

Células da linhagem 4T1, transplantadas ortopicamente em camundongos Balb/c, proliferaram-se no tecido da mama (parênquima e estroma), indicando interação entre as células transplantadas e células da glândula mamária (Figura 16). Isto mostra que células do tumor 4T1 se proliferaram no tecido da mama de camundongos, o que indica que este modelo de carcinoma é adequado para testes de atividade biológica de compostos químicos (CARNEIRO *et al*, 2010).

Modelos de camundongos de laboratório têm revelado úteis contribuições para vários campos de pesquisa como na área da farmacologia, medicina, toxicologia e no estudo da biologia do câncer (MARONPOT, FLAKE e HUFF, 2004). De fato, muito do conhecimento atual relacionado ao desenvolvimento do tumor e aos efeitos de drogas anticancerígenas é atribuído à existência de modelos tumorais de camundongos (RANGARAJAN e WEINBERG, 2003). Além das semelhanças biológicas compartilhadas entre camundongos e seres humanos, a sua disponibilidade relativa e seu baixo custo são fatores que apoiam a sua ampla utilização na pesquisa do câncer (MARONPOT, FLAKE e HUFF, 2004).

Nas últimas décadas, vários modelos de camundongos foram estabelecidos tornando possível comparar o desenvolvimento e características histopatológicas de doenças humanas. Além disso, modelos de células transplantadas são de essencial importância para pesquisa de câncer porque podem ser usados para uma rápida triagem de diferentes drogas e/ou linhagens celulares de camundongos (PHILIPPA *et al*, 2008).

Para estudar a interação de células tumorais com componentes do microambiente, o uso de modelo transplantado ortópico é o mais adequado. Quando células tumorais estão em seu ambiente de origem elas respondem diferentemente ao suprimento de sangue, ao sistema imunológico, a hormônios e fatores de crescimento, o que torna possível a investigação de terapias que alvejam não somente o tumor, mas também os componentes do microambiente (GARBER, 2006).

6.3.2 Considerações sobre atividade antitumoral de $Rh_2(H_2cit)_4$ e de Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$

Em nosso estudo, os tratamentos com $Rh_2(H_2cit)_4$ e com Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ (dose de $Rh_2(H_2cit)_4$: 1050 pM) induziram inibição do volume tumoral da linhagem 4T1 (transplantada ortopicamente em camundongos Balb/c) de 74,5% e 52,2%, respectivamente em relação ao controle (Figura 19).

Outros tratamentos que inibem o tumor 4T1 também têm sido descritos na literatura. Shi e Tang (2009) utilizaram um plasmídeo recombinante (pVAX-MP) que continha informação genética para codificar a proteína de matriz do vírus da estomatite vesicular (capaz de induzir apoptose *in vitro* em células 4T1) associados com lipossomas catiônicos. No referido estudo, o complexo pVAX-MP:lipo provocaram uma redução do volume tumoral em até 70% quando comparado com o grupo controle com tumor. Em outro estudo, realizado por Rausch, Halm *et al*, (2009) com o mesmo modelo tumoral (4T1) os animais foram tratados com SM16, uma pequena molécula inibidora da quinase ALK5, e este tratamento reduziu o volume tumoral em 50%, em relação ao grupo controle.

Os estudos conduzidos por Shi e Tang (2009) e Rausch, Halm *et al*, (2009) utilizaram modelos de transplante ectópico, onde as vias de transplante foram o flanco e peritônio dos camundongos, respectivamente. Em nosso estudo, o modelo da linhagem 4T1 foi transplantado ortopicamente na glândula mamária de camundongos. Uma possível vantagem do nosso estudo é de que o transplante tumoral foi feito no mesmo sítio anatômico de onde o tumor se desenvolveu

originalmente e isto pode indicar resultados mais fidedignos do efeito de medicamentos aplicados *in vivo* (SHARMA, HABER e SETTLEMAN, 2010).

Os tumores dos animais foram caracterizados como pouco diferenciados e com pleiomorfismo moderado. Em relação às contagens de figuras mitóticas, observou-se, no grupo controle e Magh-v, maior ocorrência de mitoses principalmente no grupo Magh-v (Tabela 5), fato que, provavelmente, está relacionado à maior densidade tumoral e proliferação celular observada neste grupo.

Além disso, observou-se necrose isquêmica em todos os grupos experimentais, sendo que nos grupos dos animais tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$ e com Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ essa lesão tecidual foi mais intensa do que nos grupos controle e no grupo Magh-v (Figuras 24-27 e tabela 5). A necrose visualizada nestes tecidos foi caracterizada como moderada, visto que havia áreas adjacentes com células tumorais viáveis.

Células em proliferação intensa, como é o caso de células cancerígenas, demandam maior aporte de sangue para suprir o intenso crescimento tumoral. No entanto, o estroma vascular, nestes tecidos, é freqüentemente escasso e, por isso, ocorre hipóxia no tecido tumoral, o que origina vastas áreas centrais de necrose isquêmica (ROBBINS e COTRAN, 2005). Em nosso estudo, nós observamos necrose em células tumorais do grupo controle (animais sem tratamento), o que parece ser um processo normal, já que pode ocorrer hipóxia no tumor devido à elevada massa tumoral existente. Nós observamos necrose justamente nas áreas centrais do tumor, onde o aporte sanguíneo é escasso (Figuras 24 e 25 F; 26 E e 27 B).

Por muito tempo, a apoptose foi considerada a única forma de morte celular programada, enquanto necrose era considerada como um processo de morte descontrolada e desregulada. Por outro lado, evidências recentes revelam que a necrose pode também ocorrer de maneira regulada, resultando num processo denominado "necroptosis", tipo de morte iniciada por receptores de morte celular. A "necroptosis" pode estar envolvida em processos de injúria por isquemia em que a desintegração de membrana plasmática, de lisossomo e mitocôndria são características comuns (VANDENABEELE *et ai*, 2010). Em nosso estudo, verificamos, por meio das análises ultraestruturais do tumor, no grupo tratado com $Rh_2(H_2cit)_4$ e com Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$, rompimento de membranas plasmáticas e

conteúdos citoplasmáticos no meio extracelular, características de necrose (Figuras 31 C e 32 B).

Em relação aos tumores de animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (Figura 26 D) e com Rh₂(H₂cit)₄ (Figura 31 D) também foi observada fibrose, que pode estar relacionada a processos inflamatórios resultantes de cicatrização após destruição tecidual com substituição do tecido conjuntivo. O infiltrado inflamatório, mais intenso nos grupos de animais tratados com Rh₂(H₂cit)₄, indica uma resposta à lesão tecidual do tumor. Além disso, processos inflamatórios em tumores podem ser decorrentes da proliferação e migração de células teciduais parenquimatosas e conjuntivas (ROBBINS e COTRAN, 2005). Por outro lado, processos inflamatórios também podem estar associados à resposta do organismo a um determinado fármaco, como uma resposta à presença de substâncias exógenas (STEWART, 2009). Nos tumores de animais tratados com Rh₂(H₂cit)₄ e de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ observou-se intenso infiltrado inflamatório, provavelmente associado a estes fatores.

É interessante ressaltar que nos tumores de animais que receberam tratamentos com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-v notou-se áreas com material de coloração marrom-escuro nas células, revelando presença de nanopartículas no tumor, provenientes destas composições (Figura 26, 27 e 28). Nas micrografias eletrônicas isto pôde melhor bem observado, pois nanopartículas foram encontradas no interior do núcleo (Figura 32 D) e no citoplasma (Figuras 33 D) de células tumorais. Também se observou vesículas citoplasmáticas contendo agregados de nanopartículas próximas ao núcleo no grupo de animais tratados com Magh-v (Figuras 33 B e 33 C).

Através destes fatos é possível que NPM foram captadas pelas células por mecanismos que envolva formação de vesículas. O fato de observarmos NPM no núcleo talvez indique que a composição de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ tenha afinidade por esta região da célula. Estas duas composições apresentaram efeitos muito diferentes na redução do tumor e observou-se também que nos tumores tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ havia NPM no núcleo celular, enquanto que nos tumores tratados com Magh-v observou-se NPM no citoplasma. Provavelmente, a diferença de efeito entre estas composições esteja relacionada à presença ou não de Rh₂(H₂cit)₄, composto que apresentou atividade citotóxica e antitumoral em nosso estudo. Ainda, este composto talvez possa atuar também facilitando o transporte de NPM para o núcleo celular.

Acúmulo de agregados de NPs magnéticas, livre de vesículas, foi encontrado no citoplasma de células de tumor de mama (linhagem MDA-MB-435S) (ZHOU *et al.*, 2006). Em nosso estudo, verificamos tanto agregados de NPs em vesículas, como nanopartículas livres no citoplasma da célula tumoral (linhagem 4T1). O mecanismo de absorção de nanopartículas não foi investigado em nosso estudo, mas a literatura relata que, geralmente, esta absorção de NPs ocorre via pinocitose, endocitose mediada ou não por receptor e fagocitose (LORENZ *et al.*, 2006). (GE *et al.*, 2009) também demonstraram, por meio de análises de MET, NPs magnéticas no interior de células da linhagem KB (carcinoma oral escamoso). Estes autores verificaram, inclusive, que a absorção de NPs pelas células tumorais foi dependente do tamanho e característica de superfície das NPs utilizadas.

A respeito da influência da carga de superfície de NPs em relação à sua absorção por células tumorais, vários estudos têm relatado que NPs magnéticas geralmente encontram-se confinadas em vesículas intracitoplasmáticas de células de músculo liso (RIVIERE *et al.*, 2005), em macrófagos (RAW264.7) e em células tumorais de ovário (Hela) (WILHELM *et al.*, 2002).

6.3.3 Considerações sobre toxicidade de $Rh_2(H_2cit)_4$ e de $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$

O óbito espontâneo dos animais iniciou-se no 16° dia após o transplante tumoral e estendeu-se até o 18° e 21° dias, o que totalizou cinco óbitos até o 23° dia de experimento, sendo dois óbitos ocorridos no grupo $Rh_2(H_2cit)_4$, dois no grupo Magh-v e um no grupo controle. Ainda, verificou-se 100% de sobrevida entre animais do grupo sadio e do grupo tratado com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ ao longo dos 23 dias após o transplante tumoral (Figura 20). Assim, o tratamento com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ proporcionou sobrevida dos animais com tumores similar a dos animais sadios, porém, este fato não foi observado com o grupo de animais tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$ livre.

Em um estudo preliminar, Zyngier e Kimura *et al.* (1989) utilizaram citrato de ródio (II) livre, na concentração total de 6,9 pM (quatro doses) após a implantação de células de tumor de Ehrlich em camundongos Swiss. Com esta composição, os

pesquisadores observaram um percentual de 78,8% de sobrevivência em camundongos tratados com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, em um período experimental de 23 a 27 dias.

Neste estudo, foi utilizado um modelo tumoral diferente (4T1) em relação ao já descrito (Ehrlich) e, com uma dose total de 1050 μM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (sete aplicações), observou-se uma sobrevivência similar no período de 23 dias em relação ao estudo anterior (75%). Porém, observou-se que a sobrevivência dos animais tratados com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ livre foi inferior à do grupo controle (87,5%).

Em resumo, sugerimos que a composição de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ foi menos tóxica aos animais do que a composição do $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ livre, quando se relaciona o parâmetro sobrevivência. Outro aspecto interessante, observado em nosso estudo, é que obtivemos resultados similares ao de Zyngier e Kimura *et al* (1989) em relação a sobrevivência de camundongos tratados com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, apesar da dose que utilizamos (1,98 mg/kg) ter sido inferior à que eles usaram (260 mg/kg). Sabe-se que entre os modelos transplantados ortopicamente e ectopicamente pode haver diferenças de respostas ao tratamento (GARBER, 2006). Assim, é possível que as diferentes respostas observadas nos tratamentos com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, entre os diferentes modelos de transplante (Ehrlich e 4T1), seja resultado das interações entre componentes do microambiente em que as células tumorais se desenvolvem.

O fato de se ter observado sobrevivência total de camundongos tratados com $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ talvez seja indicativo de que o efeito desta composição tenha induzido menor toxicidade para células normais ou que esta composição tenha agido mais intensamente nas células 4T1. É conhecido que tecidos tumorais apresentam vasos dilatados e isto favorece a passagem de nanoestruturas no endotélio que se acumulam mais especificamente no tumor (MAEDA *et al.*, 2000).

Em relação aos parâmetros hematológicos, não observamos alterações significativas no número de hemácias e plaquetas, hematócrito e quantidade de hemoglobina entre os diferentes grupos de animais portadores de tumor (controle, $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e Magh-v) conforme os valores de referência (Tabela 6). Estas observações estão de acordo com os resultados de Shi e Tang (2009), em que não foi observada anemia ou eritropenia nos grupos de animais que apresentavam tumor 4T1. Alterações quantitativas nos parâmetros hematológicos como anemia e mielossupressão são observadas nos tratamentos quimioterápicos convencionais (Nabholtz *et al.*, 2003).

Em todos os grupos de animais portadores de tumor observou-se leucocitose intensa (Tabela 7). O aumento de leucócitos, detectado no sangue de animais portadores de tumor, pode ter sido causado devido à própria existência do tumor ou devido ao processo inflamatório envolvido nesta doença (GAW, 2004).

Alterações na contagem diferencial de leucócitos demonstraram redução do número de linfócitos e de eosinófilos e aumento do número de bastonetes, segmentados e monócitos. Por exemplo, não foram encontrados eosinófilos no sangue dos animais portadores de tumor, exceto no caso dos animais tratados com Magh-v em que o percentual destas células foi baixo (Tabela 7). Nos achados histopatológicos foram encontrados eosinófilos junto ao tumor. Estudos mostram que a elevação no número deste tipo de leucócito em tumores sólidos é um importante fator relacionado à inflamação inicial e à persistência do tumor (CORMIER *et al.*, 2006). Neste estudo, observamos focos inflamatórios em todos os tumores avaliados, conforme as análises histopatológicas (Figuras 24 F, 25 C, 26 B e 27 D).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, foram analisados os níveis de TGP e creatinina, além dos níveis de ferro sérico. A TGG, enzima também chamada de alanina transferase (ALT), está presente nos hepatócitos e em pouca quantidade na musculatura estriada e, altos níveis sérios indicam lesão do hepatócito (GAW, 2004), mas alterações nos níveis desta enzima não foram observadas em nosso estudo (Figura 34). Os níveis séricos de creatinina também não foram alterados (Figura 33). Apesar de este metabólico ser um marcador da função glomerular, somente as quedas dos níveis pela metade no desempenho renal é que estão correlacionadas com aumento desse metabólito no soro (GAW, 2004). Portanto, segundo estas análises, os tratamentos com $Rh_2(H_2Cit)_4$ e Magh- $Rh_2(H_2Cit)_4$ não foram hepatotóxicos nem nefrotóxicos.

O ferro é um íon que é transportado no plasma sanguíneo ligado a uma glicoproteína específica, a transferrina. Vários fatores podem reduzir os níveis de ferro no soro. Um desses fatores está relacionado às respostas advindas da fase aguda de infecção, trauma e de doença maligna como, por exemplo, do câncer (CALABRICH e KATZ, 2010). Por outro lado, elevações nos seus níveis sérios podem levar à lesão hepática. Em nosso estudo, não observamos alterações relacionados à redução ou aumento dos níveis séricos de ferro entre os animais portadores de tumor com ou sem tratamento (Figura 35).

Durante os estudos de criação e análise de uma nova droga, um ponto importante é predizer se o agente novo será clinicamente tóxico para a medula óssea e se a toxicidade é específica para uma dada linhagem celular. Sendo assim, a mielotoxicidade é um fator limitante para o uso das doses requeridas dos antineoplásicos no tratamento dos tumores (PARCHMENT, 2000). Além disso, o fato de o tecido hematopoiético apresentar alto índice mitótico torna-o alvo de efeitos tóxicos de drogas. Assim, a citotoxicidade na linhagem eritróide, após os tratamentos de $Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2Cit)_4$ em camundongos portadores de carcinoma, foi avaliada para verificar se estas composições induziam danos no DNA de células da medula óssea.

No presente trabalho, foi observada maior percentual de fragmentação de DNA, de células da medula óssea, após o tratamento com $Rh_2(H_2Cit)_4$ e com $Magh-v$ em relação ao grupo controle (Figura 37). Isto é uma evidência de que, nestes tratamentos, houve indução de toxicidade nas células proliferativas da medula óssea.

Por outro lado, não houve diferenças no perfil do ciclo celular de células da medula óssea (não fragmentadas) entre os animais transplantados sob os diferentes tratamentos e nos diferentes ciclos celulares (Figura 38). Este fato, associado à outros descritos nesta discussão, sugere que o tratamento dos animais com a composição de $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ tenha induzido menor toxicidade em relação à de $Rh_2(H_2cit)_4$.

Em sistemas biológicos *in vivo*, compostos como os antineoplásicos destroem rapidamente os progenitores da medula óssea em divisão, sendo que uma única dose aguda pode resultar em neutrocitose ou trombocitopenia 4 a 20 dias após a exposição (MALERBA *et al.*, 2002). Em nossos resultados observamos neutrocitose nos animais tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$ livre e com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$, em relação aos animais saudáveis, mas não em relação aos animais do grupo controle (portadores de tumor sem tratamento). Dessa forma, a composição de $Magh-Rh_2(H_2Cit)_4$ não induziu efeito mielotóxico, e os eventos de alteração celular na medula e no sangue podem estar mais associados com a presença do tumor do que com a administração desta composição.

Considerações gerais

Neste trabalho, foi demonstrado que as composições de $Rh_2(H_2Cit)_4$ e de $Magh-Rh_2(H_2Cit)_4$ induziram citotoxicidade em cultura de células (linhagens MCF-7, 4T1, MCF-10A) e atividade antitumoral em células de carcinoma mamário (4T1) transplantadas em camundongos Balb/c. Estas propriedades, citotóxica e antitumoral, indicam que estas composições apresentam potencial aplicação para tratamento de carcinoma mamário.

Particularmente, a composição $Magh-Rh_2(H_2Cit)_4$ mostrou-se ainda mais promissora porque apresentou maior especificidade para cultura de células tumorais do que normais. Além disso, esta composição apresentou-se mais efetiva do que a composição de $Rh_2(H_2Cit)_4$ livre em camundongos portadores de carcinoma, pois, além de ter se observado atividade antitumoral significativa também se observou menos efeitos tóxicos. Um exemplo disto está baseado no fato de que $Magh-Rh_2(H_2Cit)_4$ aumentou a sobrevivência de camundongos portadores de carcinoma em relação ao tratamento com o complexo de $Rh_2(H_2Cit)_4$ livre.

Em virtude do potencial terapêutico demonstrado com as composições de $Rh_2(H_2Cit)_4$ e de $Magh-Rh_2(H_2Cit)_4$ para o tratamento de carcinoma mamário, um pedido de patente de invenção foi depositado no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial, nº. 012110000013) sob orientação do NUPITEC (Núcleo de Produção Intelectual e Tecnologia, UnB) em Brasília. O referido pedido de patente intitulado “Composições antitumorais a base de ródio (II) e fluídos magnéticos, compostos antitumoral, seu processo de obtenção e suas aplicações na preparação de medicamentos para tratamento de neoplasias”, está relacionado ao trabalho executado nesta tese. Consideramos esta produção científica bastante relevante já que o ideal é que o conhecimento científico resulte no desenvolvimento de produtos tecnológicos de interesse para a sociedade.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- O tratamento com $Rh_2(H_2cit)_4$ induz citotoxicidade em cultura de células de carcinoma mamário (MCF-7 e 4T1) e em células normais da mama (MCF-10A) de maneira dependente da dose, tempo e tipo celular, sendo que esse efeito citotóxico foi mais intenso com doses elevadas, com o decorrer do tempo e em células normais (MCF-10A).
- $Rh_2(H_2cit)_4$ induz alterações morfológicas e estruturais em cultura de células de carcinoma, tais como condensação e fragmentação nuclear, desorganização de filamentos de actina, *blebbing* ou fragmentos na membrana plasmática, aumento da quantidade de lisossomas e de fosfatidilserina no exterior da membrana plasmática e condensação mitocondrial. Esses aspectos estão, provavelmente, associados a eventos de apoptose após 48 horas de tratamento.
- Os tratamentos com 50 pM de $Rh_2(H_2cit)_4$ associado a NPM (Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$) e a ML (Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$) são mais citotóxicos do que doses equimolares de $Rh_2(H_2cit)_4$ livre em cultura de células. Além disso, as composições Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Lip-Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ induzem maior efeito citotóxico em células de carcinoma mamário das linhagens MCF-7 e 4T1 do que em células normais da mama (linhagem MCF-10A).
- O modelo de células 4T1, transplantado ortopicamente na mama de camundongos Balb/c, mostrou-se adequado para testes de efeitos biológicos de composições à base de $Rh_2(H_2cit)_4$, já que células 4T1 apresentaram características histopatológicas associadas a neoplasias no tecido da mama desses animais. Também se pode concluir que este modelo de tumor apresenta crescimento progressivo e rápido após 18 dias do transplante de células 4T1.

- Os tratamentos com $Rh_2(H_2Cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ induzem redução do volume tumoral significativa (linhagem 4T1) em camundongos Balb/c portadores de carcinoma mamário. Este efeito biológico está associado a processos de necrose, fibrose e apoptose no tecido tumoral. Ainda, verificou-se presença de NPM livres no núcleo de células tumorais tratadas com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$, o que demonstra a absorção desta composição pelas células tumorais 4T1.
- Por meio das análises de toxicidade (clínicas, bioquímicas, hematológicas e genotóxicas) verificou-se que o tratamento com $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ não induz toxicidade relevante em camundongos Balb/c portadores de carcinoma mamário. Porém, observou-se que o tratamento com $Rh_2(H_2Cit)_4$ induz genotoxicidade em células da medula óssea.

Portanto, pode-se concluir que as composições de $Rh_2(H_2cit)_4$ e $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$ apresentam potencial para aplicação no tratamento do câncer. Além disso, as composições de NPM e ML, usadas neste estudo, também podem ser usadas como plataformas para aumentar a eficiência de $Rh_2(H_2cit)_4$ em células de carcinoma mamário.

PERSPECTIVAS

Estudos dos efeitos biológicos do tratamento sistêmico com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e com $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ em camundongos portadores de carcinoma mamário estão sendo realizados por um mestrando. Paralelamente, outra mestranda também está colaborando com o prosseguimento desta pesquisa por analisar o mecanismo de ação do $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ em cultura de células.

Em virtude de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ apresentar potencial terapêutico para carcinoma mamário, somado ao fato desta composição ter elevada estabilidade e potencial magnético, $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ apresenta-se adequada para ser usada, concomitantemente, com terapias coadjuvantes como, por exemplo, a magnetohipertermia (MHT). Assim, pretendemos prosseguir a pesquisa, investigando a eficácia antitumoral da MHT após aplicação de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ em camundongos portadores de carcinoma mamário.

Ainda, estudos de biodistribuição de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ associado a NPM ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) e a ML ($\text{Lip-Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) poderão verificar o potencial destas composições no diagnóstico de micrometástases. Portanto, há inúmeras perspectivas de continuidade ao estudo iniciado nesta tese.

8 REFERÊNCIAS

- ACS. American Cancer Society, p. What are the key statistics about breast cancer?, 2011. Disponível em: < <http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/DetailedGuide/breast-cancer-key-statistics> >. Acesso em: 15/01.
- AHMADIAN, S.; BARAR, J.; SAEI, A. A.; FAKHREE, M. A.; OMIDI, Y. Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. **J Vis Exp**, n. 26, 2009.
- ALBERTI, C. Cytoskeleton structure and dynamic behaviour: quick excursus from basic molecular mechanisms to some implications in cancer chemotherapy. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 13, n. 1, p. 13-21, 2009.
- ANGELES-BOZA, A. M.; CHIFOTIDES, H. T.; AGUIRRE, J. D.; CHOUAI, A.; FU, P. K.; DUNBAR, K. R.; TURRO, C. Dirhodium(II,II) complexes: molecular characteristics that affect in vitro activity. **J Med Chem**, v. 49, n. 23, p. 6841-7, 2006.
- ASADISHAD, B.; VOSSOUGH, M.; ALAMZADEH, I. In vitro release behavior and cytotoxicity of doxorubicin-loaded gold nanoparticles in cancerous cells. **Biotechnol Lett.**, 2010.
- BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 11, p. 1649-1659, 2004.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 5, p. 631-51, 2002.
- BRUGIN, A. **Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss**. 2007. 100 (Dissertação de mestrado). Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.
- BURGOS, A. E.; BELCHIOR, J. C.; SINISTERRA, R. D. Controlled release of rhodium (II) carboxylates and their association complexes with cyclodextrins from hydroxyapatite matrix. **Biomaterials**, v. 23, n. 12, p. 2519-26, 2002.
- CALABRICH, A. F. C.; KATZ, A. Deficiência de ferro no paciente com câncer. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, 2010.
- CARNEIRO, M. L. B.; JOANITTI, G. A.; LONGO, J. P. F.; PEIXOTO, R. C. A.; BAO, S. N. Microscopy features of mice cancer models induced by tumor cell transplantation and chemical agents. In: <http://WWW.FORMATEX.ORG/MICROSCOPY4/INDEX.HTML> (Ed.). **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**. Badajoz, Spanish: Formatex Research Center, v.4, 2010.
- CHAN, W. C. Bionanotechnology progress and advances. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 12, n. 1 Suppl 1, p. 87-91. 2006.

CHEN, H.; GAO, J.; LU, Y.; KOU, G.; ZHANG, H.; FAN, L.; SUN, Z.; GUO, Y.; ZHONG, Y. Preparation and characterization of PE38KDEL-loaded anti-HER2 nanoparticles for targeted cancer therapy. **J Control Release**, v. 128, n. 3, p. 209-16, 2008.

CHIFOTIDES, H. T.; DUNBAR, K. R. Interactions of metal-metal-bonded antitumor active complexes with DNA fragments and DNA. **Acc Chem Res**, v. 38, n. 2, p. 146-56, 2005.

CINTRA, E. R.; FERREIRA, F. S.; SANTOS JUNIOR, J. L.; CAMPELLO, J. C.; SOCOLOVSKY, L. M.; LIMA, E. M.; BAKUZIS, A. F. Nanoparticle agglomerates in magnetoliposomes. **Nanotechnology**, v. 20, n. 4, p. 45103, 2009.

CORMIER, S. A.; TARANOVA, A. G.; BEDIENT, C.; NGUYEN, T.; PROTHEROE, C.; PERO, R.; DIMINA, D.; OCHKUR, S. I.; O'NEILL, K.; COLBERT, D.; LOMBARI, T. R.; CONSTANT, S.; MCGARRY, M. P.; LEE, J. J.; LEE, N. A. Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 6, p. 1131-9, 2006.

COUGHLIN, S. S.; EKWUEME, D. U. Breast cancer as a global health concern. **Cancer Epidemiol**, v. 33, n. 5, p. 315-8, 2009.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharm Res**, v. 23, n. 7, p. 1417-50, 2006.

DE FREITAS, E. R.; SOARES, P. R.; SANTOS RDE, P.; DOS SANTOS, R. L.; DA SILVA, J. R.; PORFIRIO, E. P.; BAO, S. N.; LIMA, E. C.; MORAIS, P. C.; GUILLO, L. A. In vitro biological activities of anionic gamma-Fe²⁰³ nanoparticles on human melanoma cells. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 8, n. 5, p. 2385-91, 2008.

DE SOUZA, A. R.; COELHO, E. P.; ZYNGIER, S. B. Comparison of the anti-neoplastic effects of dirhodium(II) tetrapropionate and its adducts with nicotinate and isonicotinate anions in mice bearing Ehrlich tumors. **Eur J Med Chem**, v. 41, n. 10, p. 1214-6, 2006.

DE SOUZA, A. R.; NAJJAR, R.; GLIKMANAS, S.; ZYNGIER, S. B. Water-soluble rhodium(II) carboxylate adducts: cytotoxicity of the new compounds. **J Inorg Biochem**, v. 64, n. 1, p. 1-5, 1996.

DHANKHAR, R.; VYAS, S. P.; JAIN, A. K.; ARORA, S.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**, v. 38, n. 5, p. 230-49, 2010.

DOUZIECH-EYROLLES, L.; MARCHAIS, H.; HERVE, K.; MUNNIER, E.; SOUCE, M.; LINASSIER, C.; DUBOIS, P.; CHOURPA, I. Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 541-50, 2007.

DREADEN, E. C.; MWAKWARI, S. C.; SODJI, Q. H.; OYELERE, A. K.; EL-SAYED, M. A. Tamoxifen-poly(ethylene glycol)-thiol gold nanoparticle conjugates: enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment. **Bioconjug Chem**, v. 20, n. 12, p. 2247-53, 2009.

ERCK, A.; RAINEN, L.; WHILEYMAN, J.; CHANG, I. M.; KIMBALL, A. P.; BEAR, J. Studies of rhodium(II) carboxylates as potential antitumor agents. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 145, n. 4, p. 1278-83, 1974.

FENG, S. S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. **Expert Rev Med Devices**, v. 1, n. 1, p. 115-25, 2004.

FERLINI, C.; DI CESARE, S.; RAINALDI, G.; MALORNI, W.; SAMOGGIA, P.; BISELLI, R.; FATTOROSSO, A. Flow cytometric analysis of the early phases of apoptosis by cellular and nuclear techniques. **Cytometry**, v. 24, n. 2, p. 106-15, 1996.

GARBER, K. Realistic Rodents? Debate Grows Over New Mouse Models of Cancer. **JNCI J Natl Cancer Inst** v. 98 n. 17, p. 1176-1178, 2006.

GAW, A. **Clinical biochemistry : an illustrated colour text**. 3rd. Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone, 2004. vii, 171 p.

GE, Y.; ZHANG, Y.; XIA, J.; MA, M.; HE, S.; NIE, F.; GU, N. Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake in vitro. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 294-301, 2009.

GOTTLIEB, E.; ARMOUR, S. M.; HARRIS, M. H.; THOMPSON, C. B. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 10, n. 6, p. 709-17, 2003.

GRADISHAR, W. J.; TJULANDIN, S.; DAVIDSON, N.; SHAW, H.; DESAI, N.; BHAR, P.; HAWKINS, M.; O'SHAUGHNESSY, J. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 31, p. 7794-803, 2005.

GU, F. X.; KARNIK, R.; WANG, A. Z.; ALEXIS, F.; LEVY-NISSENBAUM, E.; HONG, S.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Targeted nanoparticles for cancer therapy. **Nano Today**, v. 2, n. 3, p. 14-21, 2007.

GUEDES, M. H. A.; GUEDES, M. E. A.; MORAIS, P. C.; DA SILVA, M. F.; S., S. T.; ALVES, J. R.; BERTTELI, J. R.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M. Proposal of magnetohyperthermia system: preliminary biological tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272-276, p. 2406-2407, 2004.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.

HARHAJI, L.; VUCKOVIC, O.; MILJKOVIC, D.; STOSIC-GRUJICIC, S.; TRAJKOVIC, V. Iron down-regulates macrophage anti-tumour activity by blocking nitric oxide production. **Clin Exp Immunol**, v. 137, n. 1, p. 109-16, 2004.

HA YON, T.; DVILANSKY, A.; SHPILBERG, O.; NATHAN, I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 44, n. 11, p. 1957-62, 2003.

HEO, D. S.; PARK, J. G.; HATA, K.; DAY, R.; HERBERMAN, R. B.; WHITESIDE, T. L. Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. **Cancer Res**, v. 50, n. 12, p. 3681-90, 1990.

HILGER, I.; HERGT, R.; KAISER, W. A. Use of magnetic nanoparticle heating in the treatment of breast cancer. **IEE Proc Nanobiotechnol**, v. 152, n. 1, p. 33-9, 2005.

HOWARD, R. A.; KIMBALL, A. P.; BEAR, J. L. Mechanism of action of tetra-mu-carboxylatodirhodium(II) in LI210 tumor suspension culture. **Cancer Res**, v. 39, n. 7 Pt 1, p. 2568-73, 1979.

HOWARD, R. A.; SPRING, T. G.; BEAR, J. L. The interaction of rhodium(II) carboxylates with enzymes. **Cancer Res**, v. 36, n. 12, p. 4402-5, 1976.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **J Immunol Methods**, v. 160, n. 1, p. 89-96, 1993.

IGNATOSKI, K. M.; LAPOINTE, A. J.; RADANY, E. H.; ETHIER, S. P. erbB-2 overexpression in human mammary epithelial cells confers growth factor independence. **Endocrinology**, v. 140, n. 8, p. 3615-22, 1999.

IM, E. O.; CHOI, Y. H.; PAIK, K. J.; SUH, H.; JIN, Y.; KIM, K. W.; YOO, Y. H.; KIM, N. D. Novel bile acid derivatives induce apoptosis via a p53-independent pathway in human breast carcinoma cells. **Cancer Lett**, v. 163, n. 1, p. 83-93, 2001.

INCA. Instituto Nacional de Câncer Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=336 >. Acesso em: 15/01/2011.

JOHANNSEN, M.; GNEVECKOW, U.; ECKELT, L.; FEUSSNER, A.; WALDOFNER, N.; SCHOLZ, R.; DEGER, S.; WUST, P.; LOENING, S. A.; JORDAN, A. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. **Int J Hyperthermia**, v. 21, n. 7, p. 637-47, 2005.

JORDAN. M. A.; WILSON, L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. **Curr Opin Cell Biol**, v. 10, n. 1, p. 123-30, 1998.

JUNICKE, H.; HART, J. R.; KISKO, J.; GLEBOV, O.; KIRSCH, I. R.; BARTON, J. K. A rhodium(III) complex for high-affinity DNA base-pair mismatch recognition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 7, p. 3737-42, 2003.

KATSAROS, N.; ANAGNOSTOPOULOU, A. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 42, n. 3, p. 297-308, 2002.

KOHLER, N.; SUN, C.; WANG, J.; ZHANG, M. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. **Langmuir**, v. 21, n. 19, p. 8858-64, 2005.

KUKOWSKA-LATALLO, J. F.; CÂNDIDO, K. A.; CAO, Z.; NIGAVEKAR, S. S.; MAJOROS, I. J.; THOMAS, T. P.; BALOGH, L. P.; KHAN, M. K.; BAKER, J. R., JR.

Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. **Cancer Res**, v. 65, n. 12, p. 5317-24, 2005.

KUREBAYASHI, J.; MCLESKEY, S. W.; JOHNSON, M. D.; LIPPMAN, M. E.; DICKSON, R. B.; KERN, F. G. Quantitative demonstration of spontaneous metastasis by MCF-7 human breast cancer cells cotransfected with fibroblast growth factor 4 and LacZ. **Cancer Res**, v. 53, n. 9, p. 2178-87, 1993.

KWOK, J. C.; RICHARDSON, D. R. The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation? **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 42, n. 1, p. 65-78, 2002.

LACAVAL, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MARTINS, E. V.; LAVAVA, L. M.; FREITAS, M. L. L.; GARCIA, V. A. P. Biological effect of magnetic fluids: toxicity studies. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 201, p. 431-434, 1999.

LACERDA, L.; RAFFA, S.; PRATO, M.; BIANCO, A.; KOSTARELOS, K. Cell-penetrating CNTs for delivery of therapeutics. **Nano Today**, v. 2, n. 6, p. 38-43, 2007.

LATORRE, M.; RINALDI, C. Applications of magnetic nanoparticles in medicine: magnetic fluid hyperthermia. **P R Health Sci J**, v. 28, n. 3, p. 227-38, 2009.

LEONARD, G. D.; SWAIN, S. M. Ductal carcinoma in situ, complexities and challenges. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, n. 12, p. 906-20, 2004.

LORENZ, M. R.; HOLZAPFEL, V.; MUSYANOVYCH, A.; NOTHELFER, K.; WALTHER, P.; FRANK, H.; LANDFESTER, K.; SCHREZENMEIER, H.; MAILANDER, V. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 14, p. 2820-8, 2006.

MA, G.; YANG, J.; ZHANG, L.; SONG, C. Effective antitumor activity of paclitaxel-loaded poly (varepsilon-caprolactone)/pluronic F68 nanoparticles after intratumoral delivery into the murine breast cancer model. **Anticancer Drugs**, 2010.

MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **J Control Release**, v. 65, n. 1-2, p. 271-84, 2000.

MAIER-HAUFF, K.; RÖTHER, R.; SCHOLZ, R.; GNEVECKOW, U.; WUST, P.; THIESEN, B.; FEUSSNER, A.; VON DEIMLING, A.; WALDOEFNER, N.; FELIX, R.; JORDAN, A. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. **J Neurooncol**, v. 81, n. 1, p. 53-60, 2007.

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 11, p. 592-599, 2009.

MALERBA, I.; CASTOLDI, A. F.; PARENT-MASSIN, D.; GRIBALDO, L. In vitro myelotoxicity of propanil and 3,4-dichloroaniline on murine and human CFU-E/BFU-E progenitors. **Toxicol Sei**, v. 69, n. 2, p. 433-8, 2002.

MARONPOT, R. R.; FLAKE, G.; HUFF, J. Relevance of animal carcinogenesis findings to human cancer predictions and prevention. **Toxicol Pathol**, v. 32 Suppl 1, p. 40-8, 2004.

MAZUR, A. J.; NOWAK, D.; MANNHERZ, H. G.; MALICKA-BLASZKIEWICZ, M. Methotrexate induces apoptosis in CaSki and NRK cells and influences the organization of their actin cytoskeleton. **Eur J Pharmacol**, v. 613, n. 1-3, p. 24-33, 2009.

MCBAIN, S. C.; YIU, H. H.; DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. **Int J Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 169-80, 2008.

MCCARTHY, J. R.; WEISSLEDER, R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 11, p. 1241-51, 2008.

MIYASHIRO, S. I.; MASSIRONI, S. M. G.; MORI, C. M. C.; MAIORKA, P. C. Caracterização fenotípica do camundongo Balb/c mutante anêmico. Anais da Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli, 2010. p. 149-150.

MIZUSHIMA, N. Methods for monitoring autophagy. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 12, p. 2491-502. 2004.

MORAIS, P. C.; SANTOS, R. L.; PIMENTA, A. C. M.; B., A. R.; D., L. E. C. Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles. **Thin solid films**, v. 515, p. 266-270, 2006.

MORSE, D. L.; GRAY, H.; PAYNE, C. M.; GILLIES, R. J. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. **Mol Cancer Ther**, v. 4, n. 10, p. 1495-504. 2005.

MOTTA, V. T. Creatinina. In: EDITORIAL, R. (Ed.). **Bioquímica Clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. cap. 15.2. p.266-9.

NAMDEO, M.; SAXENA, S.; TANKHIWALE, R.; BAJPAI, M.; MOHAN, Y. M.; BAJPAI, S. K. Magnetic nanoparticles for drug delivery applications. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 8, n. 7, p. 3247-71, 2008.

NIU, Q.; ZHAO, C.; JING, Z. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. **J Immunol Methods**, v. 251, n. 1-2, p. 11-9. 2001.

OLSVIK, O.; POPOVIC, T.; SKJERVE, E.; CUDJOE, K. S.; HORNES, E.; UGELSTAD, J.; UHLEN, M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. **Clin Microbiol Rev**, v. 7, n. 1, p. 43-54. 1994.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chem Rev**, v. 99, n. 9, p. 2201-4. 1999.

PARCHMENT, R. E. Oncology clinical trials and in vitro prediction models for xenobiotic toxicology. *Develop. Animal Vet. Sci.*, v. 31, p. 693-708. 2000.

PASETTO, L. M.; DANDREA, M. R.; BRANDES, A. A.; ROSSI, E.; MONFARDINI, S. The development of platinum compounds and their possible combination. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 60, n. 1, p. 59-75, 2006.

PENG, X. H.; QIAN, X.; MAO, H.; WANG, A. Y.; CHEN, Z. G.; NIE, S.; SHIN, D. M. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. **Int J Nanomedicine**, v. 3, n. 3, p. 311-21, 2008.

PERES, C. M. R. C. **Como cultivar células**. Guanabara Koogan (Grupo GEN), 2005.

PETRI-FINK, A.; CHASTELLAIN, M.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; FERRARI, A.; HOFMANN, H. Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2685-94, 2005.

PHILIPPA, N.; AUGUSTO, V.; SCOTT, L. F.; KAZUHIKO, K.; JOSEP, M. L. Experimental models of hepatocellular carcinoma. **Journal of hepatology**, v. 48, n. 5, p. 858-879, 2008.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. In: JOHN WILEY & SON, I. (Ed.). **Current Protocols in Immunology**, 2000. cap. 20.2,

RANGARAJAN, A.; WEINBERG, R. A. Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 12, p. 952-959, 2003.

RAUSCH, M. P.; HAHN, T.; RAMANATHAPURAM, L.; BRADLEY-DUNLOP, D.; MAHADEVAN, D.; MERCADO-PIMENTEL, M. E.; RUNYAN, R. B.; BESSELSSEN, D. G.; ZHANG, X.; CHEUNG, H. K.; LEE, W. C.; LING, L. E.; AKPORIAYE, E. T. An orally active small molecule TGF-beta receptor I antagonist inhibits the growth of metastatic murine breast cancer. **Anticancer Res**, v. 29, n. 6, p. 2099-109, 2009.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 9, p. 1790-8, 2006.

REIBSCHEID, E. M.; ZYNGIER, S.; MARIA, D. A.; MISTRONE, R. J.; SINISTERRA, R. D.; COUTO, L. G.; NAJJAR, R. Antitumor effects of rhodium (II) complexes on mice bearing Ehrlich tumors. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 1, p. 91-4, 1994.

RIVIERE, C.; BOUDGHENE, F. P.; GAZEAU, F.; ROGER, J.; PONS, J. N.; LAISSY, J. P.; ALLAIRE, E.; MICHEL, J. B.; LETOURNEUR, D.; DEUX, J. F. Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation. **Radiology**, v. 235, n. 3, p. 959-67, 2005.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7ª. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. 1592.

RONE, M. B.; FAN, J.; PAPADOPOULOS, V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. **Biochim Biophys Acta**, v. 1791, n. 7, p. 646-58.2009.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385-6, 1969.

ROSENBLUM, M. D.; SHIVERS, R. R. 'Rings' of F-actin form around the nucleus in cultured human MCF7 adenocarcinoma cells upon exposure to both taxol and taxotere. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 125, n. 1, p. 121-31, 2000.

ROSSIGNOL, R.; GILKERSON, R.; AGGELER, R.; YAMAGATA, K.; REMINGTON, S. J.; CAPALDI, R. A. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. **Cancer Res**, v. 64, n. 3, p. 985-93, 2004.

SAIYED, Z.; TELANG, S.; RAMCHAND, C. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. **Biomagn Res Technol**, v. 1, n. 1, p. 2, 2003.

SCHWENDENER, R. A. Liposomes in biology and medicine. **Adv Exp Med Biol**, v. 620, p. 117-28, 2007.

SHARMA, S. V.; HABER, D. A.; SETTLEMAN, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 4, p. 241-53, 2010.

SHI, W.; TANG, Q. Antitumor and antimetastatic activities of vesicular stomatitis virus matrix protein i a murine model of breast cancer. **J Mol Med**, v. 87, p. 493-506, 2009.

SINISTERRA, R. D.; SHASTRI, V. P.; NAJJAR, R.; LANGER, R. Encapsulation and release of rhodium(II) citrate and its association complex with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin from biodegradable polymer microspheres. **J Pharm Sci**, v. 88, n. 5, p. 574-6, 1999.

SOENEN, S. J.; HODENIUS, M.; DE CUYPER, M. Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine. **Nanomedicine (Lond)**, v. 4, n. 2, p. 177-91, 2009.

SOULE, H. D.; MALONEY, T. M.; WOLMAN, S. R.; PETERSON, W. D., JR.; BRENZ, R.; MCGRATH, C. M.; RUSSO, J.; PAULEY, R. J.; JONES, R. F.; BROOKS, S. C. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer Res**, v. 50, n. 18, p. 6075-86, 1990.

SOULE, H. D.; VAZGUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 51, n. 5, p. 1409-16, 1973.

STEWART, A. G. Mediators and receptors in the resolution of inflammation: drug targeting opportunities. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 4, p. 933-5, 2009.

TAVASSOELI, F. A.; DEVILEE, P. World health organization classification of tumors. In: (Ed.). **Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, v.4, 2003.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **AAPS J**, v. 9, n. 2, p. E128-47, 2007.

TURCOTTE, S.; GIACCIA, A. J. Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, n. 2, p. 246-51,

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; VANDEN BERGHE, T.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 10, p. 700-714, 2010.

VIANNA, F. A. B. **Guia Terapêutico Veterinário**. 2ª Edição. . Gráfica Editora Cem., 2007. 462.

WATANABE, N.; OKOCHI, E.; MOCHIZUKI, M.; SUGIMURA, T.; USHIJIMA, T. The presence of single nucleotide instability in human breast cancer cell lines. **Cancer Res**, v. 61, n. 21, p. 7739-42, 2001.

WIDDER, K. J.; MORRIS, R. M.; POORE, G. A.; HOWARD, D. P.; SENYEI, A. E. Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats. **Eur J Cancer Clin Oncol**, v. 19, n. 1, p. 135-9, 1983.

WILHELM, C.; GAZEAU, F.; ROGER, J.; PONS, J. N.; BACRI, J. C. Interaction of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles with Cells: Kinetic Analyses of Membrane Adsorption and Subsequent Internalization. **Langmuir**, v. 18, n. 21, p. 8148-8155, 2002.

XU, C.; SUN, S. Superparamagnetic nanoparticles as targeted probes for diagnostic and therapeutic applications. **Dalton Trans**, n. 29, p. 5583-91, 2009.

YIH, T. C.; AL-FANDI, M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. **J Cell Biochem**, v. 97, n. 6, p. 1184-90, 2006.

YOKOYAMA, M. Drug targeting with nano-sized carrier systems. **J Artif Organs**, v. 8, n. 2, p. 77-84, 2005.

YOON, D. S.; WERSTO, R. P.; ZHOU, W.; CHREST, F. J.; GARRETT, E. S.; KWON, T. K.; GABRIELSON, E. Variable levels of chromosomal instability and mitotic spindle checkpoint defects in breast cancer. **Am J Pathol**, v. 161, n. 2, p. 391-7, 2002.

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Curr Opin Chem Biol**, v. 7, n. 4, p. 481-9, 2003.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nano Today**, v. 4, n. 1, p. 66-80, 2009.

ZHAO, G.; LIN, H. Metal complexes with aromatic N-containing ligands as potential agents in cancer treatment. **Curr Med Chem Anticancer Agents**, v. 5, n. 2, p. 137-47, 2005.

ZHOU, J.; LEUSCHNER, C.; KUMAR, C.; HORMES, J. F.; SOBOYEJO, W. O. Sub-cellular accumulation of magnetic nanoparticles in breast tumors and métastasés. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2001-8, 2006.

ZYNGIER, S.; KIMURA, E.; NAJJAR, R. Antitumor effects of rhodium (II) citrate in mice bearing Ehrlich tumors. **Braz J Med Biol Res**, v. 22, n. 3, p. 397-401, 1989.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 23 de dezembro de 2008.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**Comparação dos efeitos biológicos de citrato de ródio e deste associado a nanopartículas magnéticas em adenocarcinoma mamário: estudos in vitro e in vivo.**", UnBDOC nº 104934/2008, sob responsabilidade da Profa. Sônia Nair Bão, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sabben
Coordenador do CEUA

ANEXO A

ANEXO B

Síntese e caracterização do citrato de ródio (II)

Soluções aquosas do trifluoroacetato de ródio (II) e ácido cítrico na proporção molar 1:14, respectivamente, foram misturadas e aquecidas a 70 °C. O volume da solução foi reduzido até quase desidratação total seguido de adição de água, e o processo foi repetido quatro vezes. O produto foi dissolvido em um pequeno volume de metanol e precipitado pela adição de solução de éter de petróleo e acetona a 50:50 (v/v). O sólido foi lavado com acetato de etila por cerca de vinte vezes, para retirada do excesso de ácido cítrico. No decorrer das lavagens, alíquotas do sólido foram dissolvidas em metanol e analisadas para a verificação da presença de ácido cítrico por meio de cromatografia em camada delgada (TLC) em sílica gel, tendo como fase móvel acetato de etila com 1 % de ácido acético. Depois de purificado, o $Rh_2(H_2cit)_4$ foi seco em estufa a 110 °C por 12 h. O composto apresentou-se solúvel em água, metanol e parcialmente solúvel em acetona e o rendimento obtido foi de 20%.

Para a caracterização, foram realizados ensaios de análise elementar, termogravimetria, titulação potenciométrica e espectros de ESI-MS (espectrometria de massa de ionização por eletropulverização), ^{13}C RMN (espectroscopia de ressonância magnética nuclear), IR (espectroscopia na região do Infravermelho) e UV/Visível (espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível), que confirmaram que o composto tem estrutura similar aos carboxilatos de ródio (II) já estudados (Cotton FA *et ai Oxford*, 1993, p. 431).

A análise elementar foi consistente com a fórmula molecular proposta $Rh_2(C_6H_7O_7)_4(H_2O)_2$, e sugere a presença de duas moléculas de água na posição axial. Resultados da análise térmica (Figura 1 A) confirmam a presença das moléculas de água na estrutura com a perda de massa de 4,1% (perda de massa calculada = 3,6%) entre 25-140°C. No intervalo de 150°C a 650°C observa-se uma abrupta perda de massa relacionada à decomposição dos ligantes orgânicos e colapso da estrutura de gaiola levando à formação de resíduo de ródio metálico

(Najjar R *et al*, *Anais da academia brasileira de ciências*: 1987, p. 13). A coordenação do ácido cítrico ao ródio, através de seus grupos carboxilatos, é evidenciada pela análise dos modos de estiramento C-O nos espectros do citrato de sódio e do complexo sintetizado. A banda associada ao estiramento do grupo carboxila ácido ($\nu_{\text{CO}_2\text{H}}$), em 1500 cm^{-1} , desdobra-se no espectro do complexo em modos de estiramento assimétricos ($\nu_{\text{as}}\text{COO} = 1598 \text{ cm}^{-1}$) e simétricos ($\nu_{\text{s}}\text{COO} = 1411 \text{ cm}^{-1}$) na análise por IR (Figura 1 B).

É descrito na literatura que carboxilatos metálicos cujos espectros exibem valores de Δ ($\nu_{\text{as}}\text{COO} - \nu_{\text{s}}\text{COO}$) menores, mas próximos de valores iônicos ($\Delta = 198 \text{ cm}^{-1}$), possuem coordenação em ponte (Deacon GB *et al*, *Coord Chem Ver*, 1980, 33(3):227-250). O valor de $\Delta = 187 \text{ cm}^{-1}$ observado no espectro do citrato de ródio (II) sugere a coordenação do tipo ponte ou quelato. O espectro de UV/visível do complexo (Figura 1 C) é similar aos de outros carboxilatos de ródio (II), com bandas em 587 nm e 432 nm na região do visível e 220 nm e 194 nm na região do ultravioleta, atribuídas, respectivamente, as transições $rc^*(\text{RhRh}) - \langle y^*(\text{RhRh}) \rangle rc^*(\text{RhRh}) \rightarrow cr^*(\text{RhO}) \rangle cT(\text{RhRh}) - \langle y^*(\text{RhRh}) \rangle cT(\text{RhRh})$ e $c7(\text{RhO}) \rightarrow cT(\text{RhRh})$. Experimentos de titulação potenciométrica (Figura 1 D) foram empregados para quantificar o número de grupos carboxílicos livre no $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, obtendo-se $7,4 \pm 0,4 : 1$ de grupos ácidos carboxílicos livres por mol de complexo; muito próximo da relação 8 : 1 predita pela estequiometria proposta.

Nos espectros de ESI-MS (Figura 2 A) os picos correspondentes às fragmentações são de intensidade desprezível, e o pico do íon molecular mais abundante corresponde a espécie $[\text{Rh}_2(\text{C}_6\text{H}_{7,07})_4]^+$, de m/z igual a 970,8 Da. O complexo também foi analisado por ^{13}C RMN (Figura 2 B) onde os sinais dos átomos de carbono α - e β -carboxilatos do complexo (195,3 e 192,9 ppm, respectivamente) aparecem deslocados em comparação aos grupos correspondentes ao ácido cítrico livre (179,8 e 176,4 ppm, respectivamente), mostrando que o ânion citrato é coordenado através desses grupos carboxilas. Para o átomo de carbono carbinólico (R-CH₂-OH) somente um pequeno deslocamento é observado, indicando que não existe participação deste grupo na coordenação.

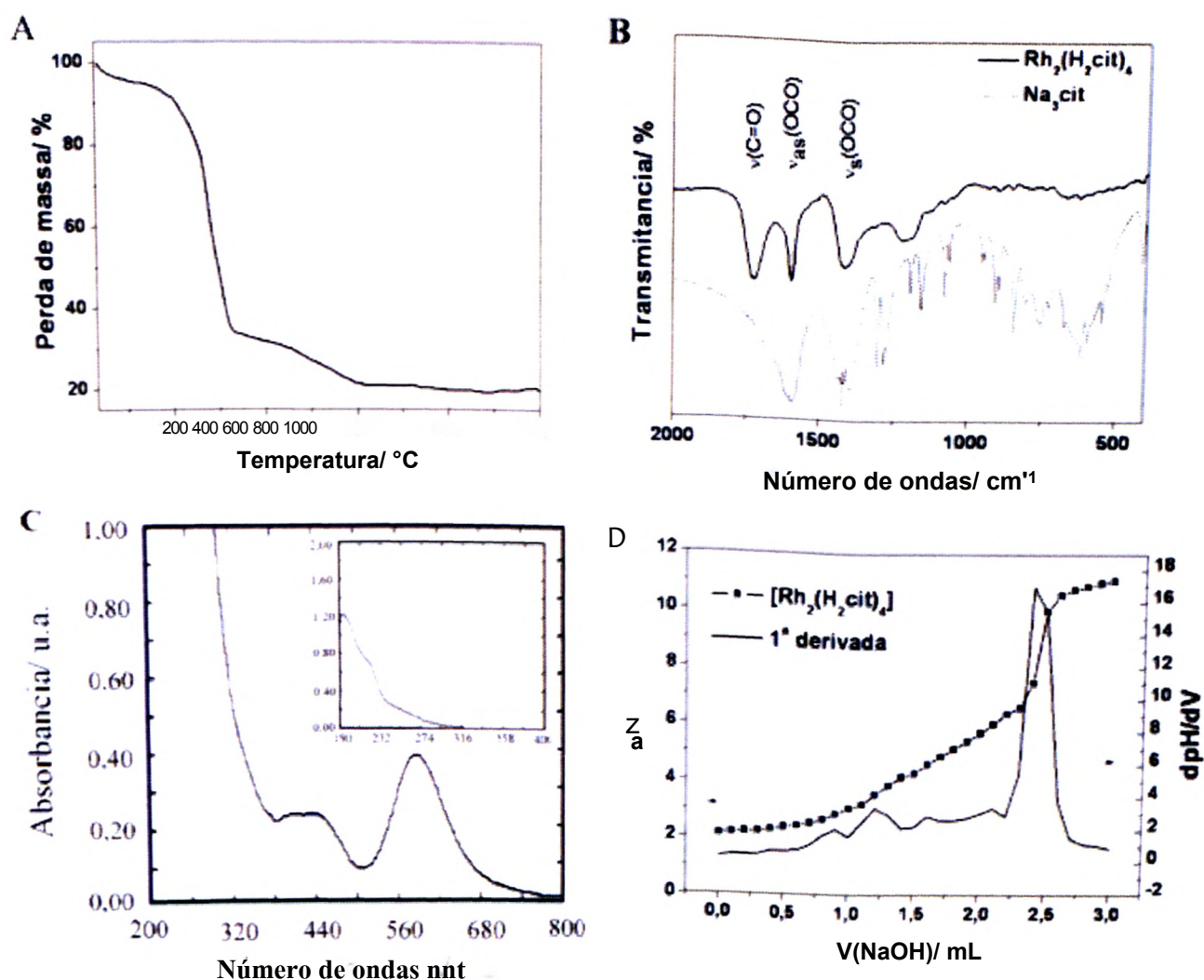


Figura 1: Resultados da caracterização de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ por diferentes técnicas:

A) representa as curvas termogravimétricas, obtidas em cadinho de alumina, com razão de aquecimento $10^\circ\text{C}/\text{min}$ sob gás N_2 (50 mL/min.). B) Espectros na região do IR do complexo de citrato de sódio - $\text{Na}_3(\text{cit})^-$, obtidos em pastilhas de KBr, na região de $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ com amostras secas a 110°C . As posições das bandas relativas aos modos de estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu_{\text{a}}(\text{OCO})$ e $\nu_{\text{s}}(\text{OCO})$ são destacadas por linhas pontilhadas. C) Espectros na região do UVA/visível, obtidos em solução aquosa concentração $2,17\text{ mmol L}^{-1}$, com detalhe na região do ultravioleta obtido pela diluição da solução para $6,4 \times 10^{-2}\text{ mmol L}^{-1}$. D) Curvas de titulação potenciométrica em concentração de ródio (Rh) $5,14\text{ mmol/L}$, volume de equivalência $2,45\text{ mL}$ de NaOH $46,2\text{ mmol/L}$.

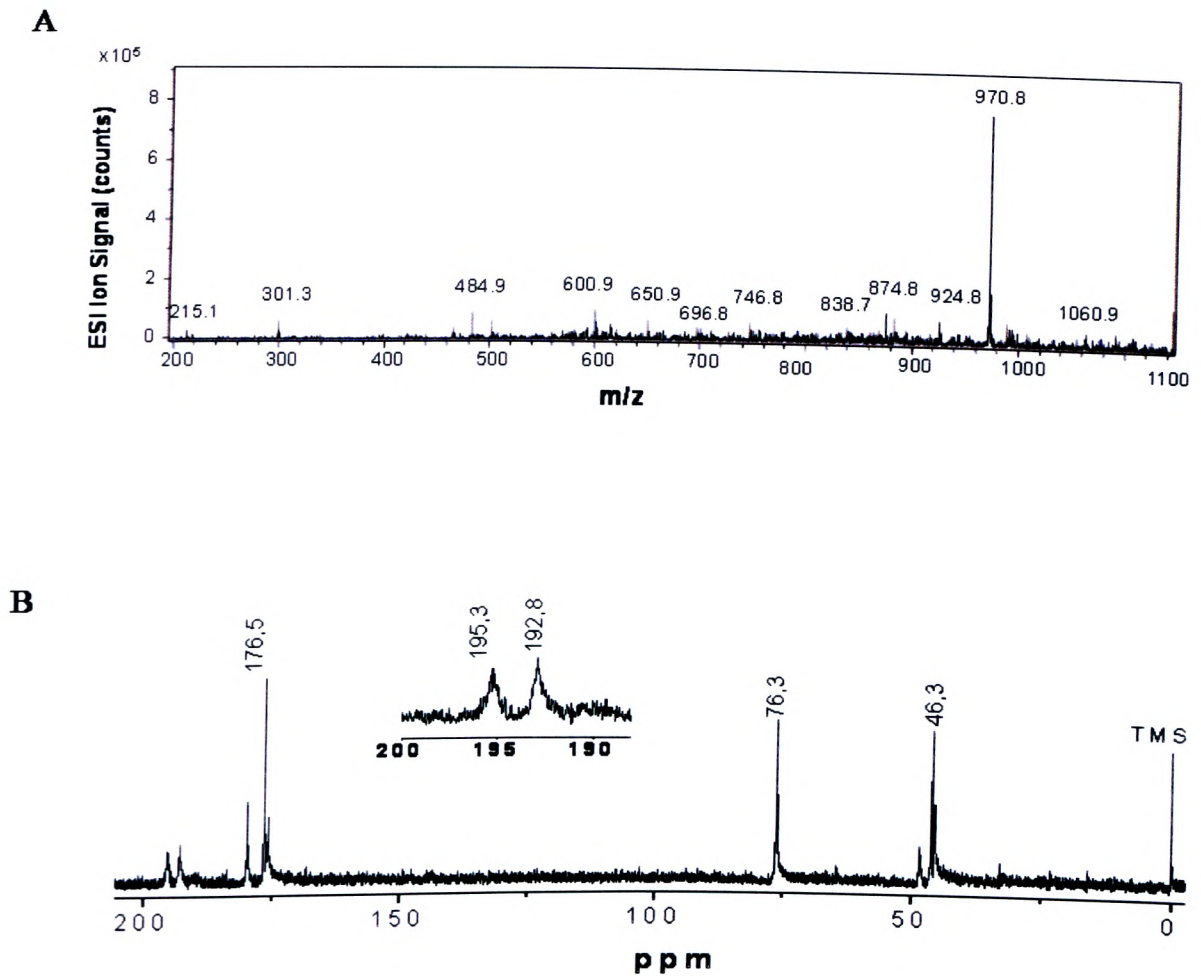


Figura 2: Caracterização do composto $Rh_2(H_2Cit)_4$ por diferentes técnicas: A) Espectros de massas do tipo ESI-MS, obtido com amostra dissolvida em metanol com voltagem do capilar de 4kV, temperatura de 280°C e fluxo de injeção de 180 μL h⁻¹. B) Espectros de RMN 13C, obtidos de amostras dissolvido em D₂O (60 g L⁻¹) em um Bruker DRX 400 de 9,4 T a 298 K usando sonda de detecção direta de 5 mm.

ANEXO C

Obtenção de fluido magnético estabilizado com citrato de ródio (II) e sua caracterização

Após a obtenção das nanopartículas pelo processo da coprecipitação alcalina de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} o precipitado consistindo de partículas de magnetita (Fe_3O_4) foi oxidado pelo borbulhamento de oxigênio em meio ácido, levando à obtenção de partículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). As partículas foram dispersas em água, obtendo-se um colóide magnético ácido com concentração de ferro de 0,54 mol/L.

A adsorção de citrato de ródio (II) em nanopartículas de maghemita foi realizada pela adição de quantidades determinadas de solução do complexo em suspensões diluídas de nanopartículas com concentração de ferro de 0,050 mol/L. Quantidades determinadas de solução de citrato de ródio (II) $5,4 \times 10^{-2}$ mol/L foram adicionadas as suspensões de nanopartículas de maghemita e, após ajuste para pH igual a 3, a mistura permaneceu sob agitação por 12 h. Em seguida as partículas foram separadas por centrifugação, lavadas e dispersadas em água. O pH da suspensão foi ajustado para 7, sendo observado a peptização das nanopartículas levando a obtenção do fluido magnético.

O sobrenadante obtido na etapa de centrifugação foi utilizado para determinar o teor de citrato de ródio (II) não adsorvido nas nanopartículas de maghemita. A quantidade adicionada foi expressa pela proporção molar em percentagem do número de moles de complexo adicionado pelo número de moles de ferro em suspensão. A proporção escolhida para preparação das amostras utilizadas em ensaios biológicos foi de R igual a 2%, para a obtenção de colóides magnéticos estáveis em pH e salinidade fisiológicos.

O diâmetro médio de cristalito obtido por difratometria de raios x foi de 5,3 nm e a magnetização de saturação de 48 emu/g. A Figura 1 mostra as curvas de magnetização para as nanopartículas antes e após funcionalização com o citrato de ródio (II), na qual pode ser observado o comportamento superparamagnético em

ambas as amostras e que a funcionalização das partículas não influencia na magnitude da magnetização de saturação.

A quantidade de espécies adsorvidas foi expressa como a razão molar entre os moles de citrato de ródio (II) adsorvido e de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) na suspensão, Q_{ads} . A Figura 2 mostra a isoterma de adsorção obtida com os dados experimentais de Q_{ads} contra a concentração de equilíbrio de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, C_e . Observa-se que em baixas concentrações a adsorção é bastante elevada tornando-se mais tênue à medida que a concentração aumenta, com saturação próxima de Q_{ads} de 30 mmol de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ por mol de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Os dados experimentais foram ajustados ao modelo de Langmuir sendo obtido um coeficiente de regressão linear, R^2 , igual a 0,998.

As nanopartículas funcionalizadas com o citrato de ródio (II) apresentaram drásticas modificações nas propriedades eletrocinéticas de superfície, como mostra a Figura 3. O ponto isoelétrico (IEP) das nanopartículas de maghemita puras ocorreu em pH igual a 7,6 e a curva de $p\zeta$ versus pH apresentou o perfil simétrico em torno do IEP, característico da interface óxido de ferro-água. Após adsorção do citrato de ródio, o ponto IEP é deslocado para valores de pH próximos do pK_a dos grupos ácidos do complexo.

Os fluidos magnéticos obtidos apresentaram $\text{pH}(\text{iep})$ de aproximadamente 3 e valores de $p\zeta$ em pH 7,4 de magnitude em torno de -38 mV. Os fluidos apresentaram elevada estabilidade coloidal quando diluídos em soluções de soro fisiológico, tampão PBS e soro fetal bovino (SFB), apresentando diâmetro hidrodinâmico da ordem de 60 nm nos dois primeiros meios de dispersão e de 140 nm no último, por um período de observação superior a dez dias.

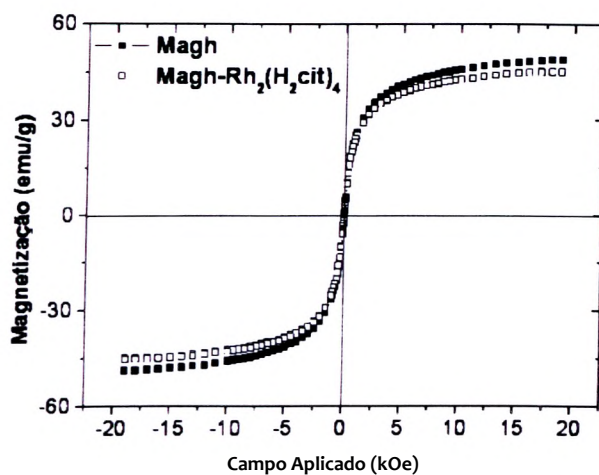


Figura 1: curvas de magnetização obtidas a 300 K para maghemita pura e modificada com citrato de ródio (II) - Magh-Rh₂(H₂cit)₄.

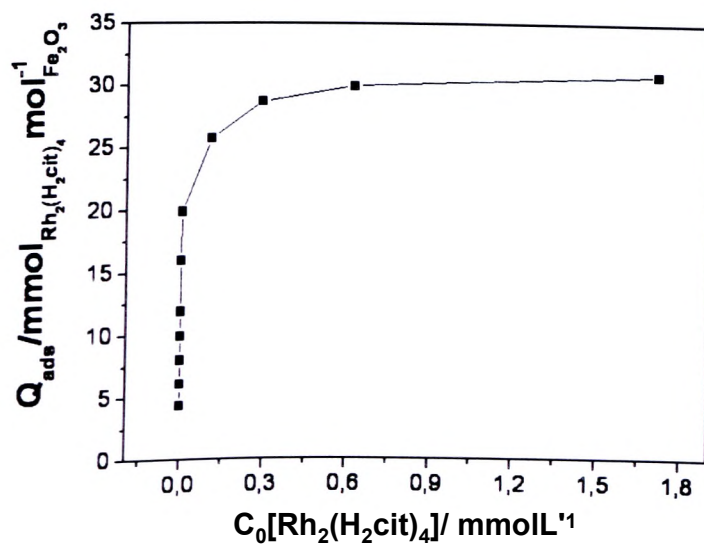


Figura 2: Isotherma de adsorção de Rh₂(H₂cit)₄ em nanopartículas de maghemita, convertido em concentração de complexo por concentração de Fe₂O₃.

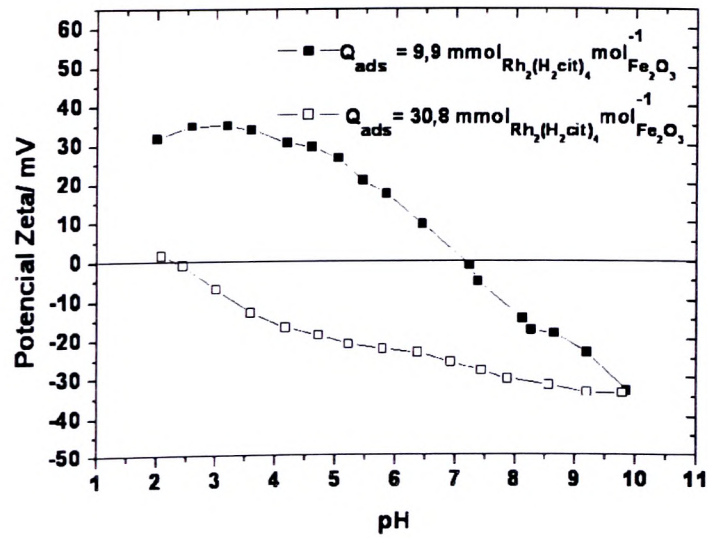


Figura 3: Variação do potencial zeta com o pH para amostra funcionalizada com teores de complexo $Q_{ads} = 9,9 \text{ mmol Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4 \text{ mol Fe}_2\text{O}_3$ e $Q_{ads} = 30,8$

$\text{mmol Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4 \text{ mol Fe}_2\text{O}_3$ •

-1

ANEXO D

Obtenção e caracterização de magnetolipossomas

A preparação dos magnetolipossomas se deu pelo método da injeção etanólica, na qual os fosfolipídios, dissolvidos em etanol, foram lentamente injetados em uma jaqueta termostaticada contendo solução tampão em pH 7,4 e temperatura de 56°C, com o auxílio de uma bomba de injeção peristáltica. A jaqueta foi termostaticada acima da temperatura crítica de transição de fase do lipídeo e com agitação magnética contínua.

A fase lipídica preparada foi preparada a partir de lipídios sintéticos ou naturais derivados da L- α -fosfatidilcolina ou da 1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina, na proporção entre 20 e 30% em peso (de concentração 0,686 mmol/L e 0,0127 mmol/L respectivamente), à qual foi previamente associado as nanopartículas funcionalizadas com o citrato de ródio (II). A fase lipídica possui composição que compreende de 5×10^{14} a 15×10^{15} partículas/mL de nanopartículas magnéticas e de 1,0 a 4,0 mg de fosfolipídio, sendo que as nanopartículas funcionalizadas com o citrato de ródio, previamente incorporados à fase lipídica, contêm uma proporção de 0,1 a 0,5% em peso na mistura lipídica total, com concentração final de $1,96 \times 10^{15}$ partículas/mL e 0,1 mmol/L de citrato de ródio (II), evitando a alteração ou a perda de estabilidade da mesma, quando estocada à temperatura ambiente.

O tamanho e a distribuição do tamanho dos magnetolipossomas (foram obtidos por espalhamento de luz a *laser* (raio X) usando um analisador de tamanho de partícula (Zetasizer, Malvern, UK). A suspensão de magnetolipossomas contendo as nanopartículas de maghemita, $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, foi analisada em uma célula de quartzo de 1,0 cm. A medição foi realizada em triplicata e todos os experimentos foram realizados a 25°C na faixa de 100-2000 Hz. Os magnetolipossomas apresentaram tamanho médio de $101,8 \pm 0,1$ nm, com índice de polidispersão menor do que 0,22, o que corresponde a 98% da distribuição de Gauss (Figura 1).

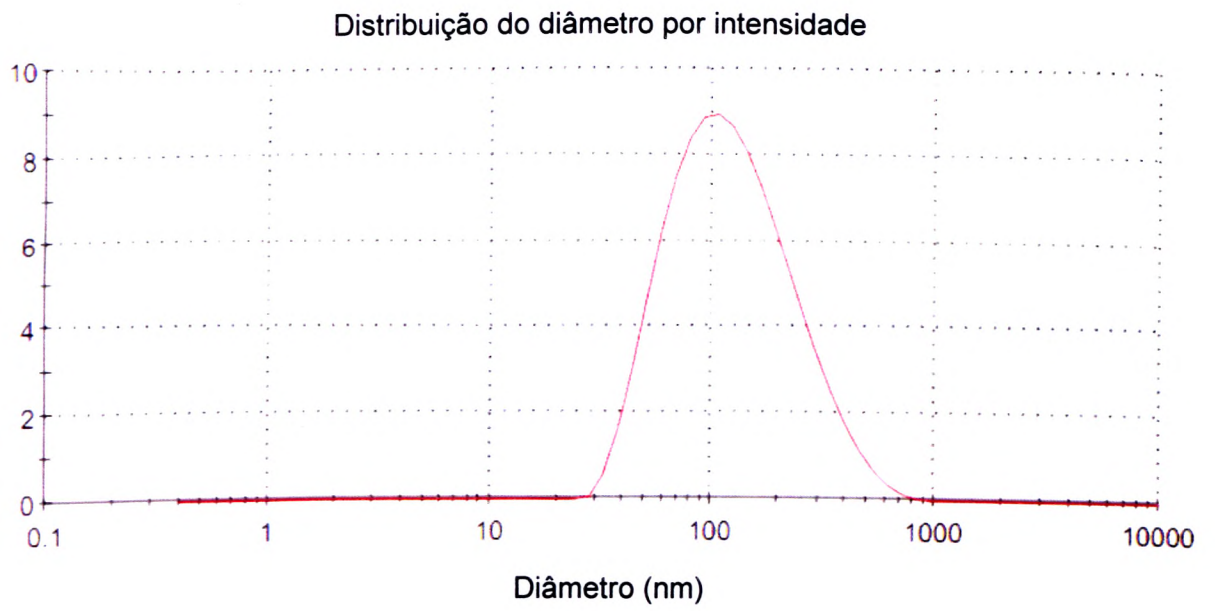


Figura 1: Análise do diâmetro de magnetolipossomas por espalhamento de luz a laser.