



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

DANIELLY STÉFANY BARBOSA DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA
ASSOCIAÇÃO DE ÓLEO DE PEQUI, NANOCÁPSULAS DE SELOL E
HIPERTERMIA MAGNÉTICA CONTRA O CÂNCER DE MAMA *IN VIVO*: ESTUDO
PILOTO**

BRASÍLIA
2022

DANIELLY STÉFANY BARBOSA DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA
ASSOCIAÇÃO DE ÓLEO DE PEQUI, NANOCÁPSULAS DE SELOL E
HIPERTERMIA MAGNÉTICA CONTRA O CÂNCER DE MAMA IN VIVO: ESTUDO
PILOTO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade de Brasília –
UnB – Faculdade de Ceilândia como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Laise Rodrigues
Andrade

Coorientador (a): Prof. Dr. Marcelo
Henrique Sousa

BRASÍLIA
2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sa Stéfany Barbosa de Castro, Danielly
Avaliação da biocompatibilidade e eficácia terapêutica da
associação de óleo de pequi, nanocápsulas de selol e
magnetohipertemia contra o câncer de mama in vivo: estudo
piloto / Danielly Stéfany Barbosa de Castro; orientador
Laise Rodrigues de Andrade; co-orientador Marcelo Henrique
Sousa. -- Brasília, 2022.
53 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2022.

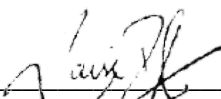
1. Câncer de Mama. 2. magnetohipertermia. 3. óleo de
pequi. 4. nanocápsulas de selol. I. Rodrigues de Andrade,
Laise, orient. II. Henrique Sousa, Marcelo , co-orient.
III. Título.

DANIELLY STÉFANY BARBOSA DE CASTRO

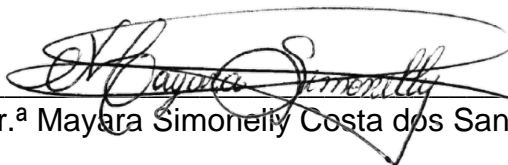
**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA
ASSOCIAÇÃO DE ÓLEO DE PEQUI, NANOCÁPSULAS DE SELOL E
HIPERTERMIA MAGNÉTICA CONTRA O CÂNCER DE MAMA IN VIVO: ESTUDO
PILOTO**

Brasília, 27/04/2022

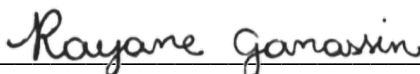
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Laise Rodrigues Andrade
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília
Orientadora



Dr.^a Mayara Simoneilly Costa dos Santos



Dr.^a Rayane Ganassin

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família, em especial meus pais, Arialdo e Edilene, que não mediram esforços para me ajudar a chegar até aqui e a realizar esse sonho. Ao meu esposo, Alex, pelo companheirismo, auxílio e apoio incondicional que me deu durante todo período da graduação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, meu Senhor, por cumprir o desejo do meu coração de entrar nessa universidade e me graduar no curso dos meus sonhos, devo toda honra e glória a Ele e ao meu Salvador Jesus Cristo. Graças te dou Senhor, tuas promessas nunca falharam em minha vida.

Agradeço infinitamente aos meus pais, que abdicaram de tanta coisa para que eu chegasse até aqui. Meu pai, Arialdo, que trabalhou incansavelmente nesses anos para me auxiliar em todo processo de formação acadêmica, desde a pré-escola até a conclusão da graduação, obrigada pai por ser minha maior inspiração pessoal e profissional. Minha mãe, Edilene, por me apoiar em todos os meus sonhos e escolhas, pelo auxílio em todas as tarefas de casa da escolinha, por me ajudar em tudo que eu precisei para chegar até aqui. Pai e mãe, obrigada pelo amor incondicional, sem vocês eu nunca teria conseguido, eu amo muito vocês.

As minhas irmãs Gabrielly e Grazielly, em especial a Gabi, obrigada minha irmã por me ajudar tanto, principalmente nessa reta final, sem dúvidas você foi um grande apoio na minha vida, obrigada por me ouvir sempre e ser minha melhor amiga.

Ao meu esposo, Alex Dias, que me apoiou desde a escolha do meu curso até esse momento tão especial. Obrigada meu bem, por cuidar tão bem de mim, da nossa casa, por ouvir meus desabafos, pela compreensão e paciência, por apoiar meus sonhos. Te agradeço por cada momento que segurou minha mão quando pensei em desistir. Deus foi muito bom para mim por ter me apresentado você. Eu te amo muito.

À Profa. Dra. Laise Rodrigues de Andrade, por me auxiliar em todas as etapas desse projeto com paciência, carinho e atenção. Obrigada pela oportunidade e por todos os ensinamentos.

Ao Dr. Willie Oliveira Pinheiro, por ceder uma parte de seu projeto de pesquisa para esse trabalho, pelos ensinamentos e pela confiança que depositou em mim. Agradeço imensamente por me ajudar nesse sonho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa, por me acolher ainda no começo da graduação e por me inserir no mundo científico. Obrigada por todas as oportunidades que me proporcionou.

Às Dra. Rayane Ganassin e Dra. Mayara Simonelly Costa dos Santos que gentilmente aceitaram participar da banca examinadora.

À Fundação Universidade de Brasília (FUB) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele, e ele tudo fará. E ele fará sobressair a tua justiça como a luz e o teu juízo como o meio-dia (Salmos 37:5-6).”

RESUMO

O câncer de mama (CM) vem crescendo exponencialmente em todo o mundo, sendo a principal causa de morte entre mulheres com câncer. Os tratamentos convencionais apresentam efeitos adversos consideráveis, sendo necessárias pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias. A hipertermia magnética (MHT) é uma alternativa para a indução de morte de células tumorais, afetando minimamente as células saudáveis ao redor. Consiste no aumento de temperatura local ocasionado pela exposição de nanopartículas magnéticas a um campo magnético alternado externo. Estudos sugerem que a associação da MHT a agentes antioxidantes pode aumentar a eficácia anticâncer. Nanocápsulas de selol (NcSel) e óleo de pequi (OP) se destacam por apresentar ações antioxidantes, cicatrizantes, anti-inflamatórias e antitumorais. Este trabalho trata-se de um recorte de um projeto de pesquisa que investiga o efeito combinatório de MHT + NcSel + OP no tratamento do CM em camundongos fêmeas Swiss. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade e a eficácia das nanoterapias MHT + NcSel associadas à suplementação com OP em animais com adenocarcinoma mamário de Ehrlich *in vivo*, por meio de (i) monitoramento clínico, (ii) avaliação do hemograma completo, (iii) testes de função hepática e renal a partir das dosagens séricas de ALT, AST, creatinina K e ureia, (iv) dosagem de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12 e (v) pela verificação do desenvolvimento tumoral ao longo do tratamento. 50% dos animais (n=6) tratados com a combinação de OP + MHT + NcSel sobreviveram durante a experimentação e não apresentaram alterações significativas no peso corporal, nem outros sinais clínicos de toxicidade. Além disso, os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais sobreviventes não apresentaram alterações significativas, descartando-se a ocorrência de danos ao estado de saúde geral. Com relação ao tumor, os animais tratados apresentaram cicatrização da área necrótica tumoral e diminuição do volume e peso do tumor primário ao longo do tempo. Os níveis de TNF- α e IL-12 reduziram, indicando uma diminuição do processo inflamatório. Portanto, sugere-se que há biocompatibilidade e eficiência na associação de OP + MHT + NcSel. No entanto, mais estudos são necessários para a complementação dos dados apresentados, antes da realização de ensaios clínicos e potencial uso deste tratamento em humanos.

Palavras-chave: Carcinoma mamário, Biocompatibilidade, Hipertermia magnética, Tumor de Ehrlich, Óleo de pequi, Nanocápsulas de Selol, Terapias combinadas.

ABSTRACT

Breast cancer (CM) has been growing exponentially worldwide, being the leading cause of death among women with cancer. Conventional treatments have considerable adverse effects, requiring more research to develop new therapies. Magnetic hyperthermia (MHT) is an alternative to induce tumor cell death, minimally affecting the surrounding healthy cells. It consists of the local increase in temperature caused by the exposure of magnetic nanoparticles to an alternating external magnetic field. Studies suggest that the association of MHT with antioxidant agents may increase anticancer efficacy. Selol (NcSel) and pequi oil (OP) nanocapsules stand out for having antioxidant, healing, anti-inflammatory and antitumor actions. This work is part of a research project that investigates the combinatorial effect of MHT + NcSel + OP in the treatment of CM in Swiss female mice. In particular, this study aimed to evaluate the biocompatibility and efficacy of MHT + NcSel nanotherapies associated with OP supplementation in animals with Ehrlich's mammary adenocarcinoma, through (i) clinical monitoring, (ii) complete blood count assessment, (iii) liver and kidney function tests based on serum levels of ALT, AST, creatinine K and urea, (iv) measurement of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12 and (v) checking tumor development during treatment. 50% of the animals (n=6) treated with the combination of OP + MHT + NcSel survived the experiment and did not show significant changes in body weight or other clinical signs of toxicity. In addition, the hematological and biochemical parameters of the surviving animals did not show significant changes, ruling out the occurrence of damage to the general state of health. Regarding the tumor, the treated animals showed healing of the tumor necrotic area and a decrease in the volume and weight of the primary tumor over time. The levels of TNF- α and IL-12 decreased, indicating a decrease in the inflammatory process. Therefore, it is suggested that there is biocompatibility and efficiency in the association of OP + MHT + NcSel. However, more studies are needed to complement the data presented, before conducting clinical trials and potential use of this treatment in humans.

Keywords: Breast Carcinoma, Biocompatibility, Magnetic Hyperthermia, Ehrlich Tumor, Pequi Oil, Selol Nanocapsules, Combination Therapies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Panorama da linha do tempo do desenho experimental	23
Figura 2. Peso corporal dos camundongos ao longo do período experimental.....	26
Figura 3. Comparação do peso dos órgãos entre os grupos.....	29
Figura 4. Comparação morfológica dos órgãos não-alvo e do tumor	30
Figura 5. Variações do volume tumoral.....	31
Figura 6. Imagens representativas do tumor de Ehrlich.....	32
Figura 7. Comparação do peso tumoral entre os grupos	32
Figura 8. Comparação entre os níveis de IL-12 entre os grupos	33
Figura 9. Comparação entre os níveis de TNF- α entre os grupos.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análises Bioquímicas	26
Tabela 2. Eritrograma.....	27
Tabela 3. Leucograma e Plaquetograma.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT- Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

CM - Câncer de Mama

HCT - Hematócrito

HGB - Hemoglobina

IL-12 - Interleucina 12

MCH - Hemoglobina corpuscular média

MCHC - Concentração de hemoglobina corpuscular média

MCV - Volume corpuscular médio

MHT - Hipertermia magnética

NcSel - Nanocápsulas de selol

NpCit - Nanopartículas de maguemita funcionalizadas com citrato

OP - Óleo de Pequi

PLT - Plaquetas

RBC - Contagem de células vermelhas

RDW - Amplitude de distribuição dos eritrócitos

TGF- β - Fator de crescimento transformante beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

WBC - Contagem de células brancas

W-LCR - Células brancas grandes (Neutrófilos)

W-MCR - Células brancas médias (monócitos, basófilos e eosinófilos)

W-SCR - Células brancas pequenas (linfócitos)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Câncer de mama	15
2.2. Óleo de pequi.....	16
2.3. Nanotecnologia	17
2.4. Hipertermia magnética.....	19
2.5. Nanocápsulas de selol.....	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivos gerais	21
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. METODOLOGIA	22
4.1. Animais	22
4.2. Modelo tumoral e tratamento com OP+MHT+NcSel	22
4.3. Monitoramento clínico	23
4.4. Parâmetros bioquímicos e hematológicos	24
4.5. Análise macroscópica dos órgãos.....	24
4.6. Mensuração tumoral.....	24
4.7. Dosagem de citocinas.....	25
4.8. Estatística.....	25

5. RESULTADOS	25
5.1. Avaliação clínica	25
5.2. Análises bioquímicas.....	26
5.3. Análises hematológicas.....	27
5.4. Análises macroscópicas e peso dos órgãos	28
5.5. Medidas tumorais	31
5.6. Dosagem de citocinas.....	33
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	41
8. REFERÊNCIAS.....	42
9. ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é o que apresenta maior incidência em mulheres no mundo, com cerca de 2,3 milhões de novos casos contabilizados em 2020, correspondendo a 24,5% dos novos casos de câncer em mulheres. Conjuntamente, é a causa mais frequente de óbitos por câncer nessa população, sendo estimadas 684.996 mortes para o ano de 2021 (15,5% dos óbitos por câncer em mulheres) (WHO, 2021).

Na última década, diversos estudos foram realizados sobre a utilização de compostos obtidos através de fontes naturais que auxiliam no tratamento do câncer (LI *et al.*, 2017; ANWAR *et al.*, 2020). Dentre esses elementos naturais, podemos citar o óleo do fruto *Caryocar brasiliense*, conhecido popularmente como pequi. O óleo extraído da polpa do pequi apresenta diversos benefícios para a saúde, como propriedades antioxidantes, cicatrizantes, anti-inflamatórias, antitumorais e antimicrobianas (CASTRO, 2007; MIRANDA-VILELA, 2009). Miranda-Vilela *et al.* (2011) demonstraram que a administração oral de 30 mg de óleo de pequi (OP) por 10 dias antes da transplantação de células tumorais mamárias de Ehrlich em camundongos saudáveis foi eficaz na inibição do crescimento tumoral. Também, outro estudo de Miranda-Vilela *et al.* (2013) sugere que a administração oral preventiva de OP (30 mg por 10 dias) seguido pelo uso da hipertermia magnética (MHT) para o tratamento do tumor de Ehrlich pode aumentar a eficiência do processo de controle do crescimento tumoral.

A MHT consiste na geração de calor local através da exposição de nanopartículas magnéticas a um campo magnético externo alternado, sendo uma técnica eficaz na indução da morte de células tumorais, afetando minimamente as células saudáveis ao redor (PRASAD *et al.*, 2007; TABOGA *et al.*, 2014). Recentemente, foi demonstrado que a combinação da MHT com a administração de nanocápsulas de Selol (NcSel) inibe o aumento do volume do tumor de Ehrlich e previne metástases regionais e distantes, com performance superior a um quimioterápico convencional (PINHEIRO *et al.*, 2020). O Selol é um composto orgânico obtido a partir de selenitotriglicerídeos de óleo da semente de girassol que atua como um doador de selênio e apresenta toxicidade inferior ao selênio IV. Assim como o OP, o Selol tem propriedades antioxidantes e antitumorais (SOCHACKA *et al.*,

2014). Até o momento, não existem informações sobre os efeitos da combinação de OP + MHT + NcSel sobre o desenvolvimento de carcinomas mamários, o que justifica a realização do nosso estudo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Câncer de mama

O termo “câncer” é utilizado para definir um conjunto de doenças que possuem em comum o crescimento desorganizado e anormal de células. Essas células podem alastrar-se para tecidos próximos à área tumoral ou invadir tecidos distantes da origem do tumor, desenvolvendo uma metástase (BRASIL, 2019). O desenvolvimento do câncer pode ser gerado por fatores extrínsecos, como a exposição à radiação, agentes químicos e biológicos e por fatores intrínsecos, como o estado imunológico do indivíduo, mutações genéticas e descontrole hormonal. Esses elementos podem atuar simultaneamente ou por etapas para o início da formação do câncer (INCA, 2021).

Existem diversos tipos de tumores malignos, dentre eles o CM que se destaca por sua alta incidência e letalidade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021), o CM é o câncer com maior número de diagnósticos no mundo, com uma estimativa de cerca de 2,3 milhões de casos no ano de 2020. Além disso, é a causa de morte mais frequente na população feminina, com uma estimativa de 684.996 mil casos em 2020. No Brasil, estima-se que no triênio 2020-2022, ocorrerão 66.280 casos novos da doença em cada ano (IARC, 2020).

O CM compreende um grupo de doenças heterogêneas, apresentando diferentes sinais clínicos e morfológicos, distintas bases genéticas e uma variedade de respostas terapêuticas. Os principais sinais e sintomas do CM são: o aparecimento de nódulos, edemas, hiperemia, dor, descamação na região da mama, inversão do mamilo, saída de líquido de um dos mamilos e pequenos nódulos nas axilas ou no pescoço (INCA, 2021).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de CM relacionam-se com idade avançada, características reprodutivas, história familiar e pessoal, hábitos de vida (como obesidade, alcoolismo e tabagismo) e influências ambientais (como exposição à radiação ionizante) (OLIVEIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2012). Atualmente, as principais formas de diagnosticar o CM são por meio do exame clínico

(palpação das mamas e linfonodos) e da mamografia, no entanto, diversos métodos podem ser utilizados como a ultrassonografia, exames de ressonância magnética, análises sanguíneas, radiografia, exames histopatológicos e por meio da pesquisa dos genes *BRCA1* e *BRCA2* (BERNARDES *et al.*, 2019).

O tratamento para o CM leva em consideração o tipo de câncer, o estadiamento da doença e o estado clínico do paciente. A radioterapia e a intervenção cirúrgica são os principais tratamentos locais e as principais modalidades de tratamento sistêmico são a quimioterapia e a hormonioterapia. Essas abordagens terapêuticas, podem ser utilizadas individualmente ou em combinação com outros tratamentos, no entanto, apesar de apresentarem alguns benefícios, possuem diversas limitações e efeitos nocivos para o organismo.

A radioterapia tem como propósito causar a morte do tumor através de danos produzidos pela radiação, todavia os tecidos adjacentes podem acabar recebendo parte dessa radiação, gerando danos às células saudáveis e até mesmo o crescimento de tumores secundários (BIGARANI, 2014). A intervenção cirúrgica também apresenta diversas limitações, em alguns casos, não é possível realizar a retirada total ou parcial do tumor. Além disso, há a possibilidade de existirem danos físicos e emocionais decorrentes dessas intervenções com resultado estético desagradável (XU *et al.*, 2015). Os quimioterápicos têm como objetivo destruir as células cancerosas, entretanto não são seletivos e ao ingressarem no sistema circulatório, também causam danos as células saudáveis (VIEIRA; GAMARRA, 2016; BRITO *et al.*, 2011; FREIRE, 2019). A hormonioterapia consiste na utilização de agentes que apresentam um efeito antagônico a síntese de hormônios ou que reduzam a concentração dos hormônios femininos, no entanto, também apresenta diversos efeitos colaterais como sintomas semelhantes aos da menopausa, enjojo, constipações, alterações menstruais, diarreia, alterações hepáticas, ressecamento da pele e boca entre outros (GABRIEL *et al.*, 2017).

2.2. Óleo de pequi

Devido às limitações que as terapias tradicionais apresentam, inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando o desenvolvimento de fármacos anticâncer. Nas últimas décadas, cerca de 60% dos medicamentos oncológicos foram originados a partir de um produto natural (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). Dentre esses produtos

naturais, os compostos antioxidantes fazem parte do grupo de maior interesse para estudo do desenvolvimento de novas terapias anticâncer (REDDY *et al.*, 2003). A carcinogênese gera um excesso de espécies reativas (ER) que danificam os tecidos. Dessa forma, os antioxidantes possuem um papel importante na proteção orgânica através da interceptação contra essas ER, inibindo as atividades destrutivas desses componentes. Além disso, a associação de antioxidantes com drogas antineoplásicas pode melhorar a eficácia do tratamento (ROHENKOHL *et al.*, 2011).

O *Caryocar brasiliense* é um fruto nativo do cerrado brasileiro, denominado popularmente como pequi, que integra o grupo dos compostos naturais antioxidantes. Esse fruto apresenta elevadas concentrações de carotenóides, grupos fenólicos e vitamina C em sua polpa, que atuam como agentes antitumorais, por inibir o estresse oxidativo (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2009). O óleo extraído da polpa do pequi (OP) apresenta essa propriedade inibitória ao estresse oxidativo que ocorre durante o período de proliferação. Além disso, o óleo também demonstra atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e cicatrizantes (NASCIMENTO-SILVA *et al.*, 2018).

Miranda-Vilela *et al.* (2011) demonstraram que o OP pode atuar como adjuvante na terapia do câncer. No estudo, observou-se que a suplementação com OP antes da indução tumoral e do tratamento, diminuiu significativamente o crescimento do tumor de Ehrlich, no entanto, as administrações de OP, após a indução tumoral e durante o tratamento acelerou o crescimento da massa e favoreceu a formação de metástases, mostrando que deve haver um limiar entre a dose terapêutica e a superdosagem.

Outro estudo de Miranda-Vilela *et al.* (2013) avaliou o efeito da suplementação com OP associada com a hipertermia magnética (MHT) para o tratamento do câncer de mama em camundongos. As análises mostraram que tanto a combinação terapêutica quanto a MHT individualmente foram eficazes em aumentar a necrose tumoral e em conter a expansão do tumor.

2.3. Nanotecnologia

A nanotecnologia é a ciência que estuda materiais que possuem dimensões físicas entre 1 e 100 nanômetros (nm), onde um nanômetro (1 nm) compreende à bilionésima parte de um metro (10^{-9} m). Essa ciência possui diversas aplicações no cotidiano, como nas áreas de desenvolvimento de materiais, meio ambiente,

tecnologias, medicina, entre outros (MCCLEMENTS, 2012). Algumas propriedades dos materiais, como a reatividade química e o comportamento magnético podem se alterar de acordo com o tamanho da partícula, dessa forma, o uso do escalonamento nanométrico pode oferecer diversos benefícios em relação aos sistemas macroscópicos (GAJEWICZ *et al.*, 2012).

Na área medicinal, a nanotecnologia vem atuando como uma importante ferramenta para contornar limitações e abrir novas possibilidades de tratamento para diversas doenças. Essa área está avançando rapidamente, principalmente na área de diagnósticos e entrega de fármacos. Os nanomateriais devem ser desenvolvidos de acordo com suas aplicações e características desejadas, podendo-se manipular o tamanho, morfologia, carga superficial e a toxicidade desses materiais (CANCINO *et al.*, 2014). Os sistemas nanoestruturados mais utilizados na área médica podem ser classificados em nanocápsulas, nanoesferas, nanopartículas magnéticas, nanotubos de carbono e lisossomos (HALEY; FRENKEL, 2008).

Os nanomateriais têm viabilizado o desenvolvimento de métodos para o diagnóstico rápido e preciso do câncer, ainda nos períodos de estágio iniciais, através de técnicas que permitem maior contraste em imagens de ressonância magnética. Na área terapêutica houve uma grande evolução na entrega específica de fármacos de forma não invasiva, por meio da vetorização de medicamentos e da utilização da hipertermia magnética (FALLEIROS *et al.*, 2011). Os mecanismos da vetorização de fármacos podem ser divididos em ativa e passiva.

A vetorização passiva consiste no acúmulo de nanopartículas em tumores solidificados, pois esses tumores apresentam fendas endoteliais de 100 a 780 nm, um diâmetro maior que as fenestrações endoteliais que possuem o tamanho entre 5 a 10 nm. Sendo assim, nanopartículas que possuem um tamanho médio de 250 nm conseguem permear pelos vasos tumorais e se acumular majoritariamente na massa tumoral. Esse fenômeno é denominado de permeabilidade e retenção aumentada (*enhanced permeability and retention - EPR*), que permite amplificar a concentração do fármaco em até 70 vezes (MOREIRA, 2013). A vetorização ativa consiste na utilização de ligantes na superfície das nanopartículas que se relacionam de forma específica com as células tumorais. Um exemplo de ligante são os anticorpos monoclonais que podem ser colocados estrategicamente na superfície dos nanocarreadores para promover um direcionamento para um tipo celular específico

de interesse terapêutico (DANHIER, 2010). Com isso, a vetorização de fármacos através de nanocarreadores oferece diversas vantagens como aumento da biodisponibilidade e diminuição dos efeitos adversos, que fazem com que o paciente tenha uma melhor adesão e um aumento da eficiência do tratamento (PINTO, 2014).

2.4. Hipertermia magnética

A hipertermia magnética (MHT) baseia-se no aumento da temperatura, geralmente próximo de 42 °C, de uma determinada região corporal afetada por algum tipo de crescimento não controlado. Associado a esse processo, as nanopartículas magnéticas (NPMs) atuam como agentes da MHT, fazendo com que a terapia seja direcionada, preservando as regiões que não apresentam atividade tumoral. Além disso, a MHT aumenta o fluxo sanguíneo e a entrega de fármacos no núcleo hipóxico do tumor que, normalmente, é resistente aos tratamentos com radioterapia. Também, as células presentes nos núcleos hipóxicos são mais acidóticas e sensíveis ao dano térmico (PINHEIRO, 2017; KAUR *et al.* 2016). As NPMs podem ser utilizadas na forma de fluidos magnéticos, suspensões coloidais ou dispersas em líquidos orgânicos ou inorgânicos, também podem ser classificadas de acordo com o seu elemento principal de composição, sendo desenvolvidas a partir de metais puros (como ouro, ferro, manganês, prata e cobalto) ou na forma de ligas entre óxidos metálicos.

O aquecimento das nanopartículas ocorre quando há uma exposição a um campo magnético alternado, pois quando os domínios magnéticos da nanopartícula se alinham com o campo existe uma mudança da orientação magnética que gera energia na forma de calor (LAURENT *et al.*, 2011; SIQUEIRA, 2019). Existem evidências de que a associação da MHT à quimioterapia ou à radioterapia apresenta uma vantagem sobre a administração isolada dessas modalidades terapêuticas, pois a absorção de fármacos pelas células tumorais é aperfeiçoada pelo aumento da permeabilidade celular (GOFRIT *et al.*, 2004).

Maier-Hauff *et al.* (2007) mostrou que a MHT apresenta segurança no tratamento de tumores cerebrais em humanos. Durante o estudo, nanopartículas de óxido de ferro revestidas com aminosilano foram administradas intratumoralmente e os pacientes se submeteram ao campo magnético alternado para que houvesse o aquecimento das partículas. Como resultado observou-se que as nanopartículas

magnéticas foram bem toleradas pelo organismo e houve efeitos adversos mínimos, além da diminuição significativa do volume tumoral.

Miranda-Vilela *et al.* (2013) avaliou a utilização de um fluido de maguemita funcionalizado com Dextran (DexMF) com nanopartículas de 5 -10 nm de diâmetro para realização da MHT no tratamento do câncer de mama em camundongos Swiss. Os resultados mostraram que a MHT aumentou o processo de necrose tumoral, controlou significativamente o crescimento tumoral, manteve a imunidade dependente de linfócitos e reduziu os danos ao DNA dos leucócitos periféricos do sangue.

Siqueira (2019) introduziu intratumoralmente um fluido magnético com nanopartículas de ouro de aproximadamente 17 nm em murinos portadores de adenocarcinoma mamário, que posteriormente foram submetidos a cinco exposições ao campo magnético alternado, 30 minutos por dia. Neste trabalho, constatou-se que a necrose tumoral apresentada pelos animais foi cerca de dez vezes maior em relação ao grupo dos animais que não receberam o tratamento com a MHT, além disso, observou-se que em todos os grupos que receberam a MHT houve uma redução significativa do diâmetro tumoral após dois dias de tratamento.

2.5. Nanocápsulas de selol

O elemento químico selênio (Se) é um composto presente nas selenoproteínas e é essencial para a para proteção celular contra o estresse oxidativo gerado pelas espécies reativas de oxigênio (DOMINIÁK *et al.*, 2017). Segundo Fritz *et al.* (2011), o selênio também possui atividade antitumoral, em seu estudo foi constatado que ele pode atuar como um antagonista competitivo de metais pesados indutores da carcinogênese. Entretanto, apesar de o consumo de produtos com baixas quantidades de selênio ser benéfica, grandes quantidades podem gerar reações tóxicas, podendo gerar, por exemplo, o desenvolvimento de catarata (OSTÁDALOVÁ, 2012). Dessa forma, o selênio na forma orgânica apresenta uma maior segurança terapêutica, pois consegue ser absorvido e eliminado do organismo rapidamente, gerando uma baixa toxicidade (TAPIERO *et al.*, 2003).

Os compostos à base de selênio (Se) têm se apresentado como uma alternativa durante o tratamento do câncer. Dentre esses compostos orgânicos, o Selol vem se destacando por estimular a morte celular e apresentar baixo efeito tóxico sistêmico, quando utilizado na dose adequada. O Selol é uma mistura complexa de

selenito triacilgliceróis, obtido do óleo das sementes de girassol e tem como propriedade ser um doador de selênio na forma aniônica (SOCHACKA *et al.*, 2014). Sochaka *et al.* (2014) demonstrou que a suplementação oral de Selol 5% (17 mg/kg) durante 28 dias apresentou uma inibição da enzima tioredoxina redutase, responsável por auxiliar no processo de indução da carcinogênese e da proliferação tumoral, mostrando sua importância na terapia anticâncer. Entretanto, o Selol, por ser derivado de triacilgliceróis, é um composto extremamente hidrofóbico e em altas doses apresenta toxicidade. Dessa forma, a nanotecnologia vem criando estratégias para contornar essas limitações. Uma dessas estratégias é a nanoencapsulação do Selol, que tem melhorado sua biocompatibilidade, biodisponibilidade e biodistribuição (PINHEIRO *et al.*, 2020).

De Souza *et al.* (2014) demonstraram que o uso de Selol em nanocápsulas apresentou atividade antitumoral, atuando como um agente citostático em células de adenocarcinoma de pulmão humano. Além disso, Estevanato *et al.* (2012) constatou que nanocápsulas magnéticas contendo Selol atuaram como um agente potencializador para a ação antineoplásica. A associação se mostrou uma plataforma de material magnético eficiente para promoção da MHT, contra o carcinoma mamário murino. Recentemente, Pinheiro *et al.* (2022) associou a administração de nanocápsulas de selol (NcSel) com a MHT no tratamento de adenocarcinoma mamário de Ehrlich, os resultados do estudo mostraram que a associação das duas terapias inibiu expressivamente o crescimento tumoral e preveniram metástases.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar um estudo piloto para avaliar a biocompatibilidade e a eficácia terapêutica da suplementação com OP associada à MHT e NcSel em camundongos fêmea Swiss portadoras de adenocarcinoma mamário de Ehrlich.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a biocompatibilidade das terapêuticas por meio de monitoramento clínico, análise do hemograma completo, testes bioquímicos de função hepática e renal e análise macroscópica de órgãos não-alvo;

- Avaliar a eficácia terapêutica mediante mensuração do volume tumoral durante a experimentação e do peso tumoral *ex vivo*;
- Avaliar o processo inflamatório relacionado às terapêuticas por meio de quantificação dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina 12 (IL-12).

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Camundongos fêmeas da linhagem Swiss, com idade entre 6 a 7 meses e massa corporal de 50 ± 9 g, foram submetidos a uma quarentena no alojamento de animais do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Em seguida, foram remanejados para mini isoladores com maravalha, para manutenção do bem-estar e das condições de higiene, ração e água filtrada *ad libitum* para manutenção das condições de saúde, e tubos de PVC para evitar o estresse dos animais. Posteriormente, foram transferidos para estantes ventiladas com controle de temperatura em torno de 24 ± 2 °C e com ciclo de luz de 12 horas, simulando dia e noite. Todos os procedimentos seguiram as diretrizes recomendadas pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA-UnB, nº do processo 130/2019).

Após o período de aclimação, os animais foram divididos em três grupos experimentais (n= 6 animais por grupo), sendo denominados da seguinte forma: CS - controle sem tumor; CT - controle com tumor tratado com tampão fosfato-salino (PBS) injetado intratumoralmente e Trat. - grupo com tumor que fez o uso da suplementação do OP + MHT + NcSel.

4.2. Modelo tumoral e tratamento com OP+MHT+NcSel

1×10^7 células de Ehrlich foram transplantadas ortotopicamente para a quinta glândula mamária esquerda dos camundongos para a obtenção do modelo de adenocarcinoma mamário. Esse procedimento contou com a colaboração do Dr. Willie Oliveira Pinheiro. O OP foi administrado por via oral (30 μ L/animal/dia) durante vinte e oito dias consecutivos, iniciando onze dias antes da transplantação tumoral, permanecendo por dez dias com a associação a MHT + NcSel e posteriormente por seis dias. Cerca de 92 h após a transplantação tumoral, a suplementação com OP foi

associada com MHT + NcSel. A MHT foi mediada por nanopartículas de maguemita funcionalizadas com citrato (NpCit). NpCit (80 mg.kg^{-1}) foram administradas por via intratumoral, em dias alternados até o quinto dia de tratamento, sendo 200 uL no primeiro dia e 50 uL nos demais dias. NcSel (75 mg.kg^{-1}) foram administradas em dias alternados, durante um período de 10 dias via intraperitoneal com 100 uL. O campo magnético alternado (330 kHz, 32 V e 7.8 A) foi aplicado diariamente por 10 dias em sessões de 30 minutos no equipamento nanoTherics magneTherm™. As vias de administração, as dosagens e regimes de tratamento foram estabelecidas com base nos trabalhos de MIRANDA-VILELA *et al.* (2011) e PINHEIRO *et al.* (2022).

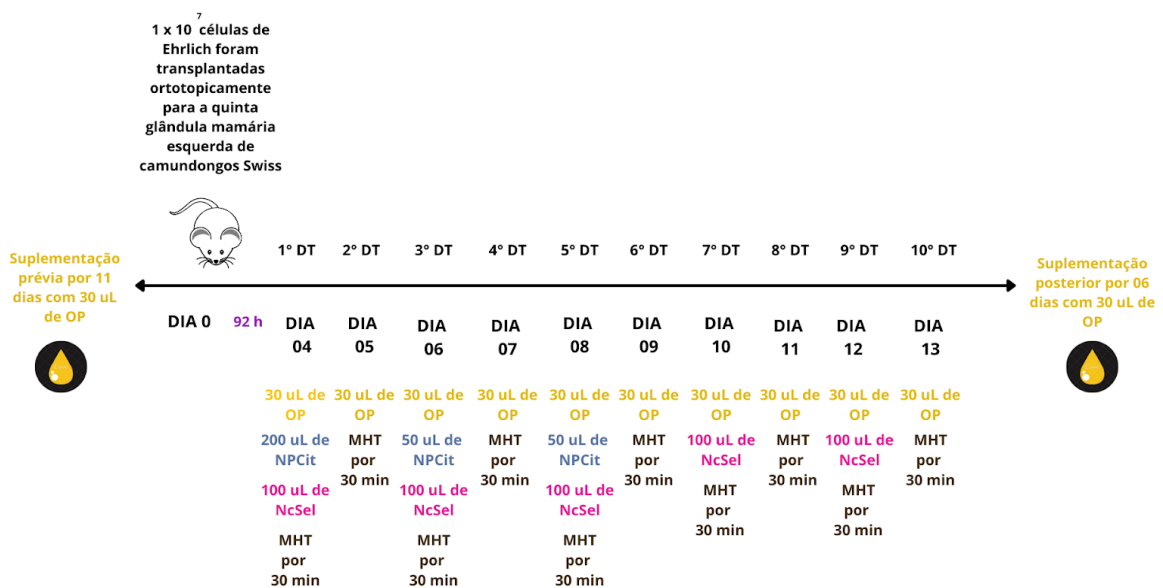


Figura 1. Panorama da linha do tempo do desenho experimental do grupo tratado montado para o estudo da biocompatibilidade e eficácia anticâncer da suplementação com óleo de pequi (OP) associada a hipertermia magnética (MHT) com nanocápsulas de selol (NcSel) em camundongos fêmeas com adenocarcinoma mamário. As doses correspondem a 80 mg.kg^{-1} de nanopartículas magnéticas revestidas com citrato (NpCit), 75 mg.kg^{-1} de nanocápsulas de selol (NcSel) e 30 uL/animal/dia de óleo de pequi (OP). DT: dia de tratamento.

Conforme mencionado anteriormente, esse trabalho é um estudo piloto e foi desenvolvido como uma extensão de um projeto maior que estava em andamento. Não idealmente, a transplantação tumoral e a coleta dos dados dos grupos controle e Trat. foram realizadas em dias distintos.

4.3. Monitoramento clínico

A avaliação clínica foi feita por meio do monitoramento do peso corporal dos animais usando balança semi-analítica. Ademais, parâmetros como modificação da

deambulação, alopecia, piloereção, inapetência, ocorrência de diarreia e de mortes foram avaliados diariamente.

4.4. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os animais foram eutanasiados quatro semanas após a última sessão de tratamentos, para isso cerca de 70 µL de cetamina e 50 µL de xilazina foram administradas intraperitonealmente. Após a verificação de ausência de reflexos, realizou-se uma toracotomia para punção cardíaca. O sangue foi aspirado e transferido para um microtubo com anticoagulante EDTA para análise do hemograma completo utilizando o equipamento Sysmex pochH-100iV DiffTM.

Para investigação do estado de saúde geral, especialmente das funções hepáticas e renais, foram feitas análises bioquímicas em amostras de soro usando o equipamento automatizado ChemWell-T® e kits diagnósticos padronizados (Labtest) conforme instruções do fabricante. Para isso, uma alíquota do sangue coletado foi transferida para um microtubo contendo gel separador e ativador de coágulo, onde posteriormente foi centrifugada a 3075 RCF por 5 minutos para a obtenção de soro. O soro foi armazenado a -80 °C até o momento de análise. Os analitos dosados foram: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina, creatinina K e ureia.

4.5. Análise macroscópica dos órgãos

A análise macroscópica do fígado, baço, pulmões e rins foi realizada por meio da comparação visual entre o grupo Trat. e os grupos controles (CT e CS) para verificação de possíveis alterações morfológicas. A análise foi registrada por meio de fotografias após a eutanásia. Os pesos dos órgãos foram mensurados utilizando-se uma balança semi-analítica.

4.6. Mensuração tumoral

O tamanho do tumor foi mensurado a cada dois dias até a eutanásia utilizando paquímetro digital. Para calcular o volume tumoral foi empregada a seguinte fórmula: $0.5 \times \text{comprimento} \times (\text{largura})^2$ (ITO *et al.*, 2003). Os pesos dos tumores *ex vivo* foram mensurados usando balança semi-analítica.

4.7. Dosagem de citocinas

A avaliação dos possíveis efeitos inflamatórios devido à presença do tumor e aos tratamentos foi realizada pela dosagem dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina 12 (IL-12) no soro pelo ensaio imunoabsorvente enzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience). As placas foram lidas após a adição da solução de interrupção a 450 nm, usando espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

4.8. Estatística

As análises dos dados foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6.0. A normalidade foi verificada empregando o teste Shapiro-Wilk. Diferenças entre os grupos foram avaliadas por ANOVA com pós-teste Tukey ou teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação clínica

Conforme evidenciado na Figura 2, o grupo CS não apresentou diferenças significativas de peso corporal ao longo do período de avaliação. O grupo CT mostrou uma tendência de aumento na média de peso nos dias 34, 37 e 40 se comparado ao 30º dia pós transplantação tumoral. O grupo Trat. apresentou uma diminuição no peso corporal até o 14º dia, no entanto, observou-se uma recuperação do peso após o 21º dia.

Durante o experimento, os animais de todos os grupos mostraram pelos brilhantes e brancos, ausência de alopecia, piloereção, inapetência e não houve a ocorrência de diarreia. Os animais 1, 3 e 6 do grupo Trat. (50% dos animais) não apresentaram anormalidades clínicas durante o tratamento. Os animais 3 e 6 mostraram sinais de cicatrização da área tumoral tratada ao 24º dia. O animal 2 foi a óbito ao 10º dia após o início das intervenções, sem sinais prévios de qualquer tipo de incômodo. O animal 4 apresentou um edema na pata direita após o 10º dia de tratamento e ao 12º dia foi a óbito após a aplicação da anestesia. Ao 7º, 8º e 13º dia não houve a realização da MHT no animal 5, pois ele apresentava intensa hemorragia no tumor e sinais de estresse; no 24º dia observou-se uma protuberância de tecido

mole na área tumoral; ao 35º dia o animal apresentou extrema lentidão ao se movimentar e ao 47º dia foi a óbito.

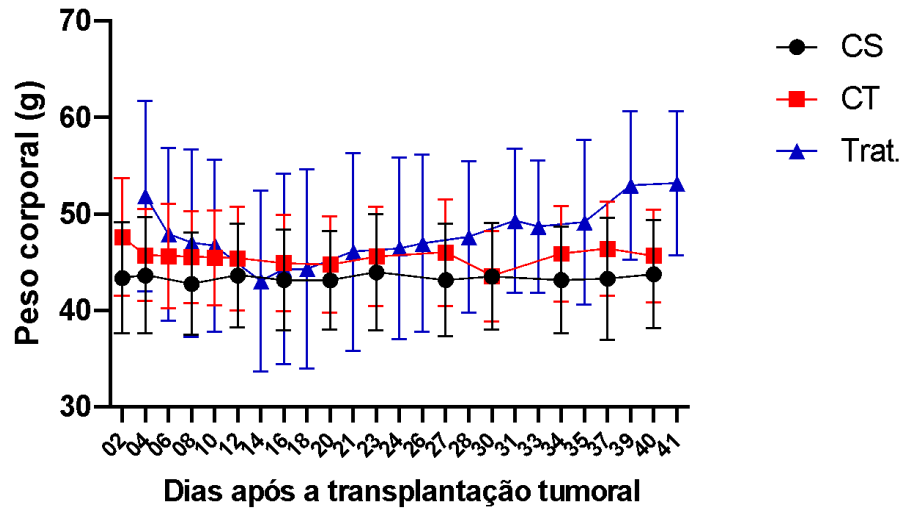


Figura 2. Peso corporal dos camundongos ao longo do período experimental. CS - Grupo sem tumor; CT - Grupo com tumor; Trat.- Grupo com tratamento. Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

5.2. Análises bioquímicas

As investigações bioquímicas (Tabela 1) demonstraram que os valores dos marcadores de funções hepática e renal no grupo Trat. não apresentaram diferenças significativas se comparadas ao CT e CS. O nível de AST foi quase 3 vezes maior no grupo CT em relação ao CS, já no grupo Trat. observa-se uma tendência do valor de AST se aproximar da referência saudável (CS). Apesar de não haver diferença estatística para os níveis de creatinina K, é possível observar uma tendência de diminuição para este analito para os grupos CT e Trat. em comparação com o CS.

Tabela 1. Análises Bioquímicas

	ALT (U/L)	AST (U/L)	Albumina (g/dL)	Creatinina K (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
CS	55,33 \pm 46,71	232,00 \pm 215,93	2,25 \pm 0,09	1,07 \pm 0,82	53,33 \pm 10,21
CT	43,17 \pm 9,77	608,33 \pm 242,49 ^{CS}	2,02 \pm 0,2	0,46 \pm 0,05	51,5 \pm 13,9
Trat.	79,33 \pm 27,01	391,33 \pm 174,71	2,33 \pm 0,78	0,52 \pm 0,08	59,33

P valor 0,1749 0,0296 0,2167 0,0601 0,6376

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; U/L: unidades por litro; g/dL: gramas por decilitro; mg/dL: miligramas por decilitro. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste one-way ANOVA e Tukey (para os dados da ureia) e o teste de Kruskal-Wallis e Dunn (para dos dados de ALT, AST, albumina e creatinina K). O asterisco indica diferença estatisticamente significativa, onde *P<0,05. Grupos: CS - Grupo sem tumor; CT - Grupo com tumor e sem intervenção; Trat. - Grupo com tumor e tratamento. Unidades de medida: mg/dL - miligramas por decilitro; g/dL - gramas por decilitro; U/L: unidade de massa atômica por litro.

5.3. Análises hematológicas

O eritrograma (Tabela 2) demonstrou um aumento significativo na contagem do parâmetro RDW-CV, referente a amplitude de distribuição de tamanho (diâmetro) dos eritrócitos do grupo Trat. em comparação ao CS. Os demais itens do eritrograma apresentaram valores de $P > 0,05$ e por isso não foram consideradas alterações significativas.

Tabela 2. Eritrograma

	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW-CV (%)
CS	7,70 \pm 1,64	11,60 \pm 2,37	31,65 \pm 6,14	41,38 \pm 1,98	15,17 \pm 1,03	36,67 \pm 1,17	15,33 \pm 1,58
CT	7,62 \pm 0,98	10,65 \pm 1,20	29,78 \pm 2,91	38,28 \pm 2,46	14,02 \pm 0,62	35,73 \pm 0,85	18,0 \pm 4,12
Trat.	8,38 \pm 0,97	12,27 \pm 1,56	33,47 \pm 3,95	39,97 \pm 0,38	14,63 \pm 0,15	36,60 \pm 0,75	19,10 \pm 0,75 ^{CS}
P valor	0,5726	0,4441	0,5307	0,0553	0,0727	0,2536	0,0234

RBC - Contagem de células vermelhas; HGB - hemoglobina; HCT - Hematócrito; MCV - Volume corpuscular médio; MCH - Hemoglobina corpuscular média; MCHC - Concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW - Amplitude de distribuição dos eritrócitos. Estatística: teste ANOVA de um fator comum e teste de comparações múltiplas de Tukey (para HGB, HCT, MCH, MCHC) e teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e Dunn (para RBC, MCV, RDW). O asterisco indica diferença estatisticamente significativa, onde *P<0,05. Todos os dados foram apresentados como média \pm DP (n= 3 por grupo). Grupos: CS - Grupo sem tumor; CT - Grupo com tumor e sem intervenção; Trat. - Grupo com tumor e tratamento. Unidades de medida: μL - microlitros; g/dL - gramas por decilitro; fL - femtolitros; pg-picogramas.

Com relação a série branca (leucograma), só houve diferença estatisticamente significativa no parâmetro W-SCR, referente ao número de células brancas pequenas (linfócitos) (Tabela 3). Nos grupos CT e Trat. os valores foram cerca de 46% e 61% menores que no CS. Além disso, observa-se uma tendência de aumento nos parâmetros WBC e W-MCR nos grupos portadores de tumor em relação ao CS.

Tabela 3. Leucograma e Plaquetograma

	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	W-SCR (%)	W-MCR (%)	W-LCR (fL)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
CS	4,00 \pm 1,37	58,97 \pm 12,94	37,63 \pm 1,42	3,40 \pm 2,29	440,33 \pm 441,86
CT	34,43 \pm 75,93	31,62 \pm 13,56**CS	64,98 \pm 10,93	3,40 \pm 3,58	1105,17 \pm 184,32
Trat.	12,70 \pm 15,14	23,03 \pm 13,99**CS	74,03 \pm 16,16	2,93 \pm 2,51	768,67 \pm 625,21
P valor	0,8733	0,0030	0,0103	0,7024	0,3168

WBC - Contagem de células brancas; W-SCR - Células brancas pequenas (linfócitos); W-MCR - Células Brancas Médias (monócitos, basófilos e eosinófilos); W-LCR - Células Brancas Grandes (Neutrófilos); PLT - Plaquetas. Estatística: teste ANOVA de um fator comum e teste de comparações múltiplas de Tukey (para W-SCR, PLT) e teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e Dunn (WBC, W-MCR, W-LCR). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas, onde **P<0,01. Todos os dados foram apresentados como média \pm DP (n= 3 por grupo). Grupos: CS - Grupo sem tumor; CT - Grupo com tumor e sem intervenção; Trat. - Grupo com tumor e tratamento. Unidades de medida: μL - microlitros; fL - femtolitros.

5.4. Análise macroscópica e peso de órgãos não-alvo

O peso do fígado, baço, pulmões e rins dos animais de todos os grupos foram mensurados. Conforme apresentado na Figura 3, o grupo Trat. apresentou aumento significativo no peso de todos os órgãos quando comparados ao grupo CS. Os pulmões do grupo Trat. também apresentaram um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo CT. A presença de metástase renal no animal 6 do grupo Trat., como mostra a Figura 4, justifica o aumento do peso renal. Além do peso e tamanho, não foram observadas outras diferenças quanto à morfologia macroscópica dos órgãos.

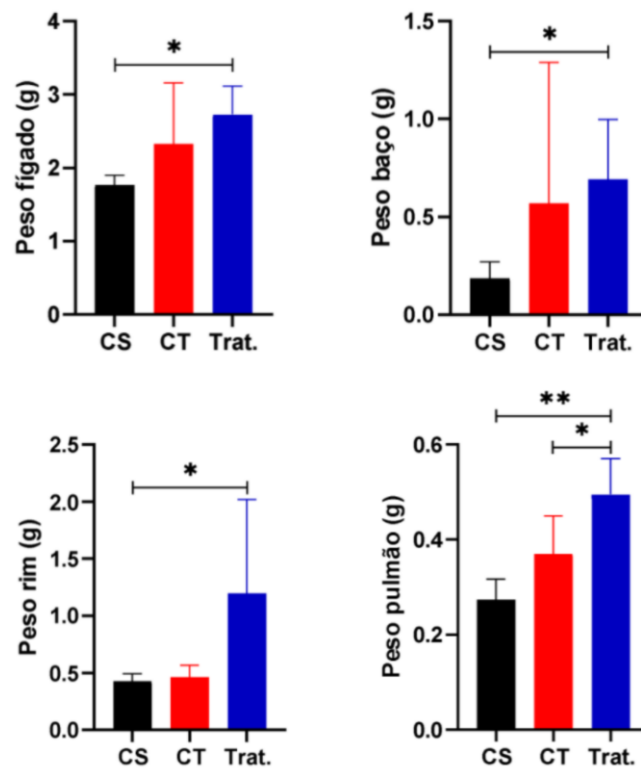


Figura 3. Comparação do peso dos órgãos entre os grupos controle saudável (CS), tumoral (CT) e o grupo tratado (Trat). Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão. Estatística: teste ANOVA de um fator comum e teste de comparações múltiplas de Tukey (pulmão) e teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e Dunn (fígado, baço, rim). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas, onde * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

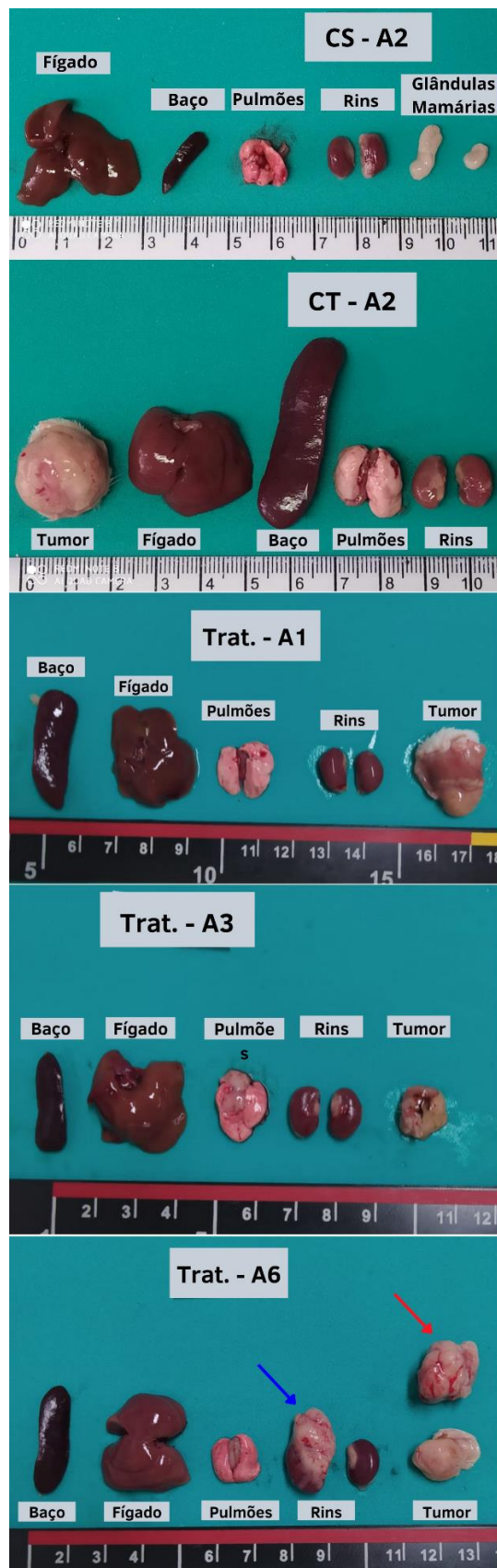


Figura 4. Comparação morfológica dos órgãos não-alvo e do tumor após a eutanásia dos animais. A seta azul indica metástase renal e a seta vermelha indica metástase de um tumor secundário encontrado na região do abdômen de um animal do grupo tratado (Trat.).

5.5. Medidas tumorais

A Figura 5 mostra o aumento progressivo do volume tumoral ao longo do tempo para o CT e Trat.. Ao 10º dia, o grupo Trat. apresentou um aumento significativo do volume tumoral se comparado ao 6º dia. No entanto, no decorrer do tempo, o grupo Trat. apresentou uma diminuição do volume tumoral, não havendo diferença significativa entre o início e final da experimentação. O grupo CT apresentou um aumento significativo ao 34º e 37º dia em comparação com o 6º dia. Além da redução do volume tumoral, também se observou que o grupo Trat. apresentou um processo de cicatrização efetivo na região do tumor primário, enquanto o grupo CT apresentou área de necrose central, conforme evidenciado pela Figura 6.

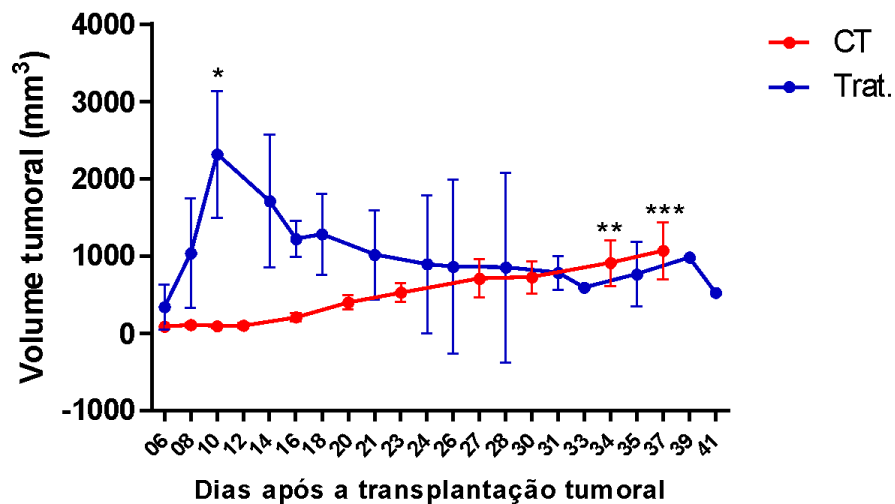


Figura 5. Variações do volume tumoral para o grupo controle com tumor (CT) e grupo tratado (Trat.). O volume tumoral foi calculado através da fórmula: $0.5 \times \text{comprimento} \times (\text{largura})^2$. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas, onde * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

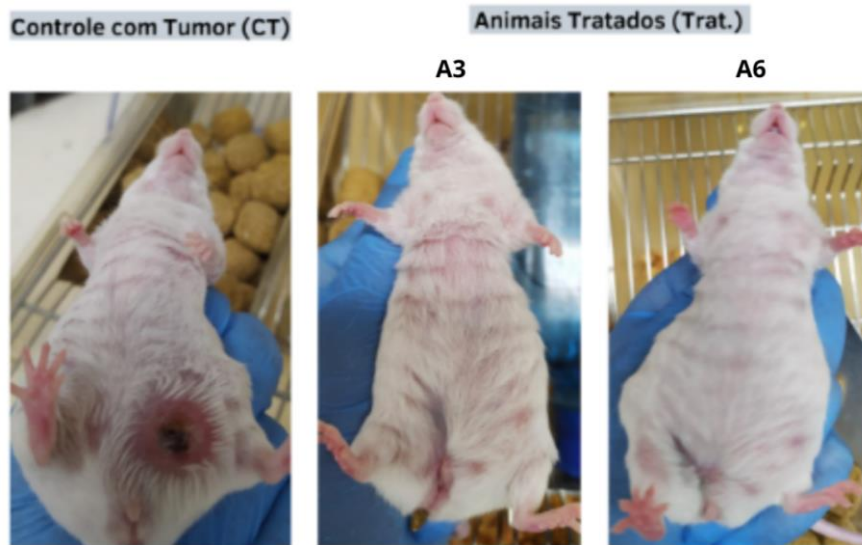


Figura 6. Imagens representativas do tumor de Ehrlich. (A) Animal do grupo controle tumoral (CT) com grande tumor e área de necrose central 37 dias após a transplantação tumoral. (B-C) Animais do grupo tratado (Trat.) evidenciando cicatrização na região do tumor primário 41 dias após a transplantação tumoral.

O peso tumoral dos animais sobreviventes ao tratamento foi mensurado após a realização da eutanásia, conforme apresentado na Figura 7. O grupo Trat. apresentou tumores aproximadamente 37% mais leves quando comparado ao CT, porém sem significância estatística. Na Figura 6 também é possível verificar a diferença de tamanho entre o tumor do grupo CT e o tumor do grupo Trat. É importante ressaltar que o animal 6 do grupo Trat. apresentou metástases que gerou dois tumores secundários, um no rim direito, o qual evidenciou um aumento visível no tamanho e peso do órgão, e outro na região do abdômen com cerca de 1,99 g.

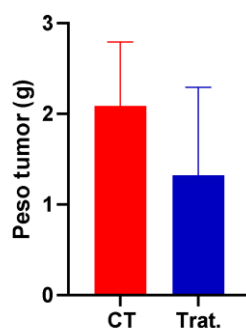


Figura 7. Comparação do peso tumoral entre os grupos controle tumoral (CT) e o tratado (Trat.). Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão. Estatística: Teste T não pareado, P valor = 0,3063.

5.6. Dosagem de citocinas

Não foi possível realizar a análise estatística dos níveis de citocinas inflamatórias do grupo Trat., pois obtivemos soro o suficiente apenas para análises de IL-12 e TNF de dois animais. Os dados são mostrados como média \pm desvio padrão dos valores obtidos (Figuras 8 e 9).

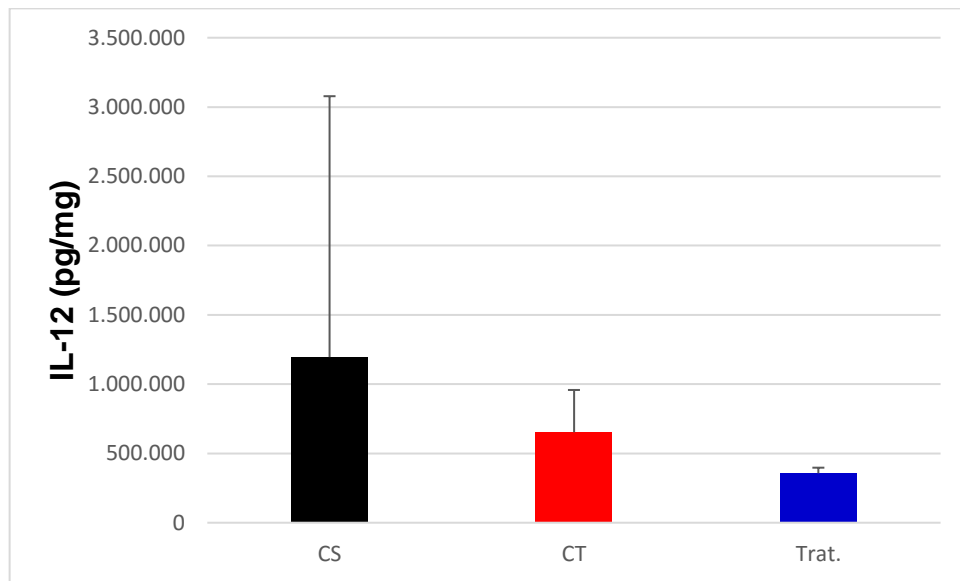


Figura 8. Comparação entre os níveis de interleucina 12 (IL-12) entre os grupos controle saudável (CS), tumoral (CT) e o grupo tratado (Trat). Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão.

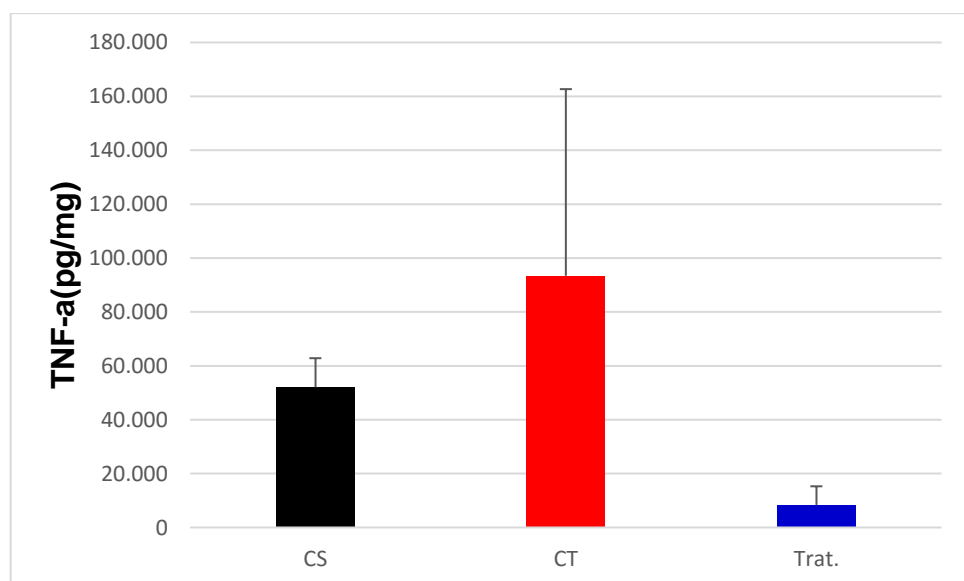


Figura 9. Comparação entre os níveis de TNF- α entre os grupos controle saudável (CS), tumoral (CT) e o grupo tratado (Trat). Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão.

6. DISCUSSÃO

A nanotecnologia vem mostrando um crescimento exponencial nos últimos anos e mostra uma grande aplicabilidade em diversas áreas de estudos, como na engenharia de materiais, ciência da computação, medicina e outros (Leopoldo *et al.*, 2020). Dentro da área da medicina, ela já está presente como uma grande adjuvante no diagnóstico e tratamento de diversas doenças (CANCINO *et al.*, 2014). Nas últimas décadas, outro campo que vem se desenvolvendo dentro da medicina é a utilização de compostos naturais, dentre eles o óleo de pequi vem ganhando notoriedade, por sua aplicabilidade no tratamento de diversas patologias, devido a sua capacidade anti-inflamatória e cicatrizante (BERTOLINO *et al.*, 2019).

Este trabalho foi desenvolvido como um estudo piloto visando avaliar os efeitos do óleo de pequi administrado previamente, durante e posteriormente ao uso nanoterapias combinadas para o tratamento do câncer mamário de Ehrlich. Esta avaliação foi realizada por meio do monitoramento clínico, das análises bioquímicas, hematológicas, mensuração do volume tumoral e da dosagem de citocinas pró-inflamatórias. O grupo CS foi utilizado como parâmetro de referência para os dados desse experimento, pois variáveis como estresse, ansiedade, temperatura, genótipo, dieta e ambiente podem influenciar nos dados obtidos para as análises clínicas e fisiológicas dos animais (SANTOS *et al.*, 2010).

Os sinais clínicos se mostram essenciais para avaliação da tolerância terapêutica, pois através deles é possível contornar possíveis problemas e oferecer alívio e conforto para os animais que estão sendo tratados (PEDROSA *et al.*, 2019). Além disso, os sinais clínicos também auxiliam na análise de possíveis reações adversas ao tratamento (VISACRI *et al.*, 2014). Durante o tratamento, os animais do grupo Trat. permaneceram com os pelos brancos e brilhantes e não apresentaram ocorrência de alopecia e diarreia. Entretanto, houve um desenvolvimento de uma úlcera necrótica na região do tumor em todos os animais do grupo Trat. decorrente do uso da MHT, que acaba gerando a morte por necrose da célula tumoral. Mas, com o avanço do tratamento, observou-se um intenso processo de cicatrização da ferida no local. A cicatrização pelo uso do óleo de pequi é um dos fatores evidenciado por Bezerra *et al.* (2015), que demonstra que o óleo é benéfico para o reparo tecidual. A atuação do óleo induz um aumento do recrutamento de fibroblastos, com isso há uma maior sintetização de colágeno e um processo de cicatrização mais veloz (RABBERS,

2016). O grupo CT, por sua vez, apresentou grandes tumores com áreas centrais de necrose isquêmica e/ou causadas pelo aumento do processo inflamatório. Diferente do grupo Trat., os tecidos necróticos não cicatrizaram.

O peso dos animais sofreu variações ao longo do tempo. Durante a experimentação, os animais do grupo Trat. demonstraram uma tendência a uma queda de peso até o 14º dia. Segundo Visacri *et al.* (2014) alguns dos principais eventos adversos relacionados a pacientes que estão em tratamento contra o câncer são: náuseas, fadiga, mal-estar e alterações do paladar. Esses fatores podem ter ocasionado essa perda de peso. Após o 21º dia houve a recuperação do peso dos animais.

Houve a ocorrência de 3 óbitos durante o experimento para o grupo Trat. Ao 7º dia o animal 5 mostrava intenso sangramento na área onde houve a inoculação tumoral. O processo de transplantação tumoral ocorreu com a inoculação intraperitoneal da forma ascítica do tumor de Erlich, sendo assim, uma das hipóteses para a ocorrência do sangramento evidenciado é que algum vaso sanguíneo pode ter sido afetado durante a transplantação. Por essa razão o tratamento precisou ser interrompido para recuperação do animal. Ademais, no 8º dia e 13º dia o animal se encontrava com sinais de estresse e debilitação, novamente foi interrompido qualquer tipo de manipulação. Ao 24º notou-se uma região com tecido mole no sítio tumoral, ao 35º dia se mostrava lento e com dificuldade de movimentação e ao 37º dia foi a óbito. Para esse caso, não foi possível relacionar se o óbito foi ocasionado pelo uso das nanoterapias com a suplementação com óleo de pequi, pois o tratamento precisou ser interrompido algumas vezes devido ao estado clínico do animal. O animal 2 foi a óbito sem quaisquer sinais prévios de debilitação ao 10º dia. O animal 4 apresentava um edema na pata direita. De acordo com Gradalski (2018), um dos sintomas mais comuns para pacientes com câncer é o edema, sendo assim, esse um possível efeito colateral causado pela presença tumoral. Ao 12º dia faleceu após a aplicação anestésica, podendo ser a própria anestesia a base de cetamina e xilasina um fator que o tenha levado ao óbito.

As análises bioquímicas são essenciais para avaliação da biocompatibilidade de qualquer tipo de tratamento, pois através dos resultados é possível avaliar informações fisiológicas e as possíveis alterações funcionais de órgãos essenciais (BARBOSA *et al.*, 2017). Para este trabalho analisou-se os valores de ALT, AST,

albumina, creatinina K e ureia. Os níveis de ALT e AST tem como objetivo verificar a funcionalidade metabólica de diversos órgãos e tecidos, principalmente do fígado (THRALL, 2014). A ALT é uma enzima localizada predominantemente no citosol dos hepatócitos e, por isso, é mais específica para confirmar danos hepáticos. A AST é uma enzima presente em diversos tecidos, embora seja mais abundante que a ALT no fígado, é menos específica. Em caso de lesão hepática, há um aumento da presença de ambas, pois elas são liberadas pelo processo de ruptura da membrana celular do hepatócito causada pela lesão (BARBOSA *et al.*, 2005). Em comparação com o CS, os níveis de ALT se mostraram aumentados para o grupo Trat., no entanto, segundo Schinoni (2008), os valores que indicam uma possível lesão hepática devem ser superiores em duas vezes ao valor de referência da ALT e, em comparação com o CS, o grupo Trat. apresentou um aumento de cerca de 40%. Os níveis de AST, para o CT, aumentaram em cerca de três vezes em comparação com o CS. O grupo Trat. também apresentou um aumento nos níveis de AST, mas o aumento foi 35% menor quando comparado ao grupo CT, demonstrando uma tendência de se aproximar dos valores do CS. Esse dado está em consonância com o estudo de Vale *et al.* (2018) que demonstra que o ÓP pode atuar na proteção das células hepáticas contra lesões resultantes do estresse oxidativo.

Além da dosagem de AST e ALT, também se verificou os níveis de albumina para uma possível confirmação de dano hepático. De acordo com Santos *et al.* (2004) a albumina é a proteína plasmática com maior concentração no sangue com diversas atribuições para manutenção da homeostase do organismo, como manter o volume plasmático, participar do equilíbrio ácido-base do sangue e transportar diversos componentes fisiológicos como hormônios, íons e ácidos graxos de cadeia longa. A albumina é produzida exclusivamente pelo fígado, que destina cerca de 15% de sua capacidade para esta síntese. Dessa forma, qualquer tipo de dano hepático impacta diretamente nos níveis de albumina no organismo (NAOUM, 2007). Além disso, segundo Barroso (2016), a albumina é uma proteína negativa de fase aguda, tendo sua concentração sérica diminuída com a inflamação. Assim, a albumina também pode ser utilizada como um marcador inflamatório. Neste trabalho, não foram encontradas alterações significativas nos níveis de albumina, sugerindo ausência de danos hepáticos, para esta análise em específico. Ademais, não houve relação com diminuição ou aumento de processos inflamatórios.

Os rins possuem funções essenciais para o funcionamento do organismo, pois através deles há a produção e eliminação de hormônios e enzimas e a excreção de produtos finais do metabolismo, sendo essencial para a eliminação de substâncias tóxicas (BEZERRA; SANTOS, 2008). Para avaliação da função renal analisou-se os níveis de creatinina K e ureia. A creatinina K é um metabólito formado a partir da desidratação da creatina, que acontece durante a conversão de creatina e fosfocreatina, sendo uma parte utilizada durante a contração muscular e a outra fração, convertida à creatinina, fica livre no plasma. Os níveis de creatinina avaliam a capacidade de filtração renal e elevações em sua concentração sanguínea sugere uma diminuição da taxa de filtração renal (RAMOS; MARINI, 2014). Os níveis de creatinina no sangue possuem uma relação proporcional à massa muscular, sendo assim, níveis diminuídos desse metabólito indicam perda de massa muscular e uma possível atrofia dos músculos (MOURÃO *et al.*, 2019). No presente estudo, observou-se que os níveis de creatinina K mostraram-se abaixo dos valores encontrados para o CS, dessa forma, como não houve elevação sanguínea, sugere-se que a função renal permaneceu adequada ao longo do tratamento. Os níveis diminuídos de creatinina não foram acompanhados de sinais de atrofia muscular como modificação da deambulação, dificuldade respiratória, limitações e paralisias em qualquer nível para os animais que sobreviveram ao tratamento.

A ureia também é um importante marcador da função renal e hepática. Esse analito é um metabólito do dióxido de carbono e da amônia, sendo produzido no fígado, filtrado pelos rins e excretado em maior parte pela urina (RAMOS; MARINI, 2014). A verificação desse analito individualmente não é tão específica para visualizações de alterações renais, sendo necessária a associação com a análise da creatinina como complemento. Níveis diminuídos de ureia podem indicar danos nos túbulos renais ou insuficiência hepática (MOURÃO *et al.*, 2019). Neste trabalho, não houve diferenças significativas entre os grupos em relação aos níveis de ureia, indicando ausência de danos renais e hepáticos para esta análise em específico.

Os exames hematológicos também fornecem dados importantes sobre o estado fisiológico do indivíduo, pois permitem a identificação de diversas patologias por meio das análises dos componentes do sangue (BARBOSA *et al.* 2017). No eritrograma, avaliou-se a contagem de células vermelhas (RBC), a hemoglobina (HGB), o hematócrito (HCT), o volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina

corpúscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpúscular média (MCHC) e a amplitude de distribuição de tamanho dos eritrócitos (RDW). Os resultados mostraram um aumento significativo apenas na contagem do parâmetro RDW-CV do grupo Trat. em comparação ao CS. Segundo Matos et al. (2008) o valor de RDW, demonstra a heterogeneidade de distribuição do tamanho das hemácias. A partir dessa análise é possível diferenciar diversos tipos de anemias, principalmente para diagnóstico de anemia ferropriva.

O MCV refere-se ao tamanho médio das hemácias, esse índice hematimétrico está diretamente relacionado ao valor de RDW que consiste no coeficiente de distribuição das hemácias, indicando o grau de anisocitose (variação de tamanho entre as hemácias) (LEAL *et al.* 2015). As anemias podem ser caracterizadas pelos valores de VCM e HCM, em que valores diminuídos desses dois índices hematimétricos indicam uma possível anemia microcítica e valores aumentados indicam anemia macrocítica (NAOUM, 2011). Segundo Leal *et al.* (2015), existe uma correlação negativa ou inversa entre o VCM e o RDW, onde valores menores de VCM indicam valores mais altos de RDW. O grupo Trat. apresentou valores de VCM diminuídos em relação ao CS, no entanto essa diminuição não foi acompanhada do valor HCM, descartando a hipótese de uma possível anemia microcítica. Os valores de RDW aumentaram consideravelmente, no entanto, o valor alterado do RDW pode ser relacionado à diminuição do valor de VCM (LEAL *et al.*, 2015).

O leucograma também se mostra essencial para a investigação de diversas patologias. Neste trabalho, verificou-se os valores de contagem de células brancas (WBC), células brancas pequenas, os linfócitos (W-SCR), células brancas médias, os monócitos, basófilos e eosinófilos (W-MCR) e células brancas grandes, os neutrófilos (W-LCR). O número de W-SCR do grupo Trat. e CT diminuiu com significância estatística em relação ao CS.

Os W-SCR, podem ser subdivididos em dois grupos, os linfócitos B que participam dos processos mediados pela imunidade humoral e os linfócitos T que participam dos processos mediados pela imunidade celular, em ambos os casos, os linfócitos atuam na defesa do organismo (COELHO NETO *et al.*, 2009). O grupo Trat. e CT apresentaram valores diminuídos em relação ao CS, de acordo com Laurino (2009), o estresse gerado por confinamento, solidão e doenças podem levar a diminuições nos níveis de linfócitos, o que pode ocasionar o quadro de linfopenia.

O W-MCR se refere a três tipos de células sanguíneas, cada uma dessas células tem características e funções distintas. O aparelho Sysmex poch-100iV DiffTM, utiliza como metodologia de contagem e detecção a impedância, separando as categorias celulares apenas pelo tamanho. Dessa forma, não foi possível averiguar a contribuição de cada tipo celular para a resposta ao tratamento.

O plaquetograma indica a contagem do número de plaquetas presentes na corrente sanguínea dos animais. As plaquetas, também chamadas de trombócitos, são fragmentos anucleados gerados na medula óssea a partir da lise de megacariócitos, que tem como objetivo evitar perda de sangue causadas por processos de lesão vascular, auxiliar na iniciação e amplificação do processo inflamatório e, dentro do processo neoplásico, ocasionar a angiogênese e metástase (CASTRO, 2006). Observou-se que os níveis de plaquetas do CT em relação ao CS aumentaram em cerca de 150%. Os níveis do grupo Trat. se mostraram aumentados em relação ao grupo CS, porém em comparação com o CT é nítido notar que o grupo Trat. apresentou uma redução dos níveis de plaquetas, sugerindo a eficácia das nanoterapias combinadas em reduzir processo inflamatório e/ou prevenir metástases.

O peso do fígado, baço, pulmões e rins dos animais de todos os grupos foram medidos e comparados. Todos os órgãos do grupo Trat. apresentaram um aumento significativo em relação ao CS. Segundo Zhang *et al.*, (2022) a presença de um crescimento tumoral pode ocasionar hepatomegalia e esplenomegalia em camundongos. Dessa forma, não é possível relacionar o aumento do peso dos órgãos com os tratamentos. Os pulmões apresentaram um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo CT e CS, o que é sugestivo de uma possível metástase, no entanto, estudos histológicos seriam necessários para confirmação dessa hipótese. O animal 6 apresentou metástase renal, gerando um aumento importante do peso dos rins desse animal, o que contribuiu com o aumento da média e desvio padrão do peso renal no grupo Trat..

Além disso, também verificou-se o crescimento tumoral ao longo do tempo. Durante as observações, o CT apresentou um crescimento progressivo e não houve nenhum animal em que os níveis de medição do volume tumoral ficaram indetectáveis. O grupo Trat. mostrou variações durante todo o tratamento, porém, nos últimos dias, os valores do diâmetro tumoral de dois animais diminuíram significativamente, até chegarem em níveis que não era possível apalpar o tumor para medição com

paquímetro. Em relação ao peso do tumor primário, o grupo Trat. apresentou uma redução de cerca de 37% quando comparado ao CT.

Entretanto, o animal 6 do grupo Trat. apresentou duas metástases, gerando tumores secundários macroscópicos no abdômen e no rim. Miranda Vilela *et al.* (2011) mostrou que administrações de OP por um tempo prolongado podem favorecer o aumento de metástases e o crescimento de massas tumorais. Em consonância com este dado, o animal 1 do grupo Trat. não apresentou uma diminuição significativa no tamanho do tumor em relação ao CT, sugerindo que a eficácia limitada dos tratamentos pode estar relacionada com o tempo de suplementação com o OP. O animal 3 do grupo Trat. foi o único que apresentou sucesso com associação de OP + MHT + NcSel, pois apresentou uma diminuição do diâmetro tumoral a níveis que não era possível realizar a mensuração por meio do paquímetro digital, além disso, esse animal não apresentou metástase.

Apesar de não ser possível a realização da análise estatística da dosagem de citocinas, os valores da média com os desvios-padrão indicaram uma redução nos níveis de IL-12 e de TNF- α . O ambiente de proliferação tumoral é um local inflamatório onde citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel importante para o crescimento do tumor. A inflamação possui uma grande capacidade de ativação tumoral, pois auxilia na proliferação e na promoção de angiogênese e de metástases (GALDIERO *et al.*, 2018; MANTOVANI *et al.*, 2008). A inflamação é mediada por citocinas que influenciam diretamente em sua atividade, proliferação e intensidade, que pode aumentar (mediada por citocinas pró-inflamatórias) ou diminuir (mediada por citocinas anti-inflamatórias) (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Neste trabalho analisamos as seguintes citocinas: IL-12 e de TNF- α .

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória que demonstra atividades antitumorais através do recrutamento de células T CD8⁺ e células NK. Além disso, é capaz de reverter a supressão imunológica induzida pelo tumor, bloqueando o processo de angiogênese e pelo aumento do número de linfócitos (NGUYEN *et al.*, 2020). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que participa de vários processos celulares e possui efeitos considerados contraditórios que vão desde a proliferação celular até a morte celular. Em elevadas concentrações, o TNF- α pode atuar como um agente antitumoral contra diversos tipos de tumores, em concentrações diminuídas pode atuar como pró-tumorigênica (MERCOGLIANO *et al.*, 2021). Com esse trabalho, constatou-se que o

grupo Trat. apresentou uma diminuição nos valores da média tanto para os valores de IL-12 quanto para os valores de TNF- α , essa diminuição pode estar em consonância com a ocorrência de metástases.

Apesar de alguns resultados não desejados, como a ocorrência de metástases, o grupo Trat. sugere que as nanoterapias combinadas com a suplementação do OP auxiliaram no processo de cicatrização da área tratada e demonstrou uma tendência de diminuição no volume e peso do tumor primário. É possível que ajustes na dosagem e tempo de administração de OP gerem resultados mais promissores.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o uso das nanoterapias combinadas (MHT + NcSel) associadas à suplementação com OP:

- a) não causou alterações significativas no peso corporal, nem em outro parâmetro clínico ao longo do período de avaliação;
- b) não causou danos renais e hepáticos;
- c) não causou alterações hematológicas consideráveis;
- d) não evitou metástases e gerou aumento no peso dos órgãos não-alvo;
- e) auxiliou no processo de cicatrização da área necrótica tumoral;
- f) gerou uma diminuição do volume e peso do tumor primário ao longo do tempo;
- g) atuou no processo de diminuição dos mediadores inflamatórios TNF- α e IL-12;

As lacunas deste estudo piloto impossibilitam embasar uma conclusão que pode ser generalizada. No entanto, as hipóteses aqui apresentadas poderão ser investigadas de forma sistematizada em trabalhos futuros. É possível que ajustes na dosagem e tempo de administração de OP gerem resultados mais promissores. Espera-se, portanto, que este estudo seja uma referência inicial para revisão e aprimoramento de pontos necessários, como o aumento do número de animais e grupos experimentais no estudo, para um maior controle das variáveis intervenientes, bem como o aprofundamento dos métodos de análise.

8. REFERÊNCIAS

ANWAR, S. *et al.* Natural Products: Implication in Cancer Prevention and Treatment through Modulating Various Biological Activities. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 1, n. 1, p. 2025-2040. 2020.

BARBOSA, B. S. *et al.* Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n. 1477, p. 1-5. 2017.

BARBOSA, K. V. *et al.* Abordagem de anormalidades laboratoriais das enzimas hepáticas em pacientes assintomáticos. **Revista Médica Oficial da Universidade Federal de Juiz de Fora**, v. 3, n. 31, p. 44-48, 2005.

BARROSO, R. M. V. **Determinação das principais proteínas de fase aguda e do índice prognóstico inflamatório nutricional (IPIN) em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous* - Linnaeus, 1766)**. 2016. 63 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

BERNARDES, N. B. *et al.* Câncer de Mama X Diagnóstico. **Id on line: Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, v. 13, n. 1, p. 877-886, 2019.

BERTOLINO, J. *et al.* Aplicabilidade do óleo de pequi na cicatrização. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 229-243, 2019.

BEZERRA, K. V.; SANTOS, J. L. F. Daily life of patients with chronic renal failure receiving hemodialysis treatment. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 16, n. 4, p. 686-691, 2008.

BEZERRA, N. K. *et al.* A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 42, p. 875-880, 2015.

BIGARANI, L. A. **Consequências bucais da radioterapia em pacientes com câncer de cabeça e pescoço**. 2014. 60 f. TCC (Graduação) - Curso de Odontologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Câncer: sintomas, causas, tipos e tratamentos**. 2019. Disponível em: <http://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer>. Acesso em: 17 out. 2021.

BRITO, L. G. O. *et al.* Hipóxia e câncer de mama: uma possibilidade futura como terapia-alvo. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 21, n. 1, p. 38-41, 2011.

CANCINO, J. *et al.* Nanotechnology in medicine: concepts and concerns. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.

CASTRO, A. J. S. **Atividade recombinogênica induzida pelo extrato aquoso de pequi (*Caryocar brasiliense*) em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado) em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

CASTRO, H. C. *et al.* Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 5, n. 42, p. 321-332, 2006.

COELHO NETO, Elizeu *et al.* Linfócitos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 1, n. 12, p. 1-8, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: studies carried out at the national experimental oncology laboratory from the federal university of ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

DANHIER, F. *et al.* To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.33, n. 4, p 135-46, 2010.

DE SOUZA, L. R. *et al.* PVM/MA-shelled selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 32, n.12, p.1-17. 2014.

DOMINIAK, A. *et al.* Selol, an organic selenium donor, prevents lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat brain. **Neurochemistry International**, v. 108, n. 1, p. 66–77, 2017.

ESTEVANATO, L. *et al.* Co-nanoencapsulation of magnetic nanoparticles and Selol for breast tumor treatment: In vitro evaluation of cytotoxicity and magnetohyperthermia efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 1. p. 5287–5299, 2012.

FALLEIROS, J. P. B. *et al.* Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. **Nucleus**, v. 8, n. 1, p. 151-169, 2011.

FREIRE, D. Imunoterapia: a virada do sistema imunológico contra o câncer. **Ciência e Cultura**, v. 71, n. 4, p. 13-15, 2019.

FRITZ, H. *et al.* Selenium and lung cancer: A systematic review and meta analysis. **PloS one**, v. 6, n.11, p. 1–8, 2011.

GABRIEL, G. H. *et al.* Quimioterapia, hormonioterapia e novas alternativas de tratamento do adenocarcinoma mamário. **Enciclopédia Biosfera**, v.14, n.26, p. 538, 2017.

GALDIERO, M. R. *et al.* Cancer Inflammation and Cytokines. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 10, n. 8, p. 1-17, 2018.

GAJEWICZ, A. *et al.* Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: application of computational approaches. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 15, p. 1663-1693, 2012.

GOFRIT, O. N. *et al.* Combined local bladder hyperthermia and intravesical chemotherapy for the treatment of high-grade superficial bladder cancer. **The Journal of Urology**, v. 63, n.3, p.3, 2004.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology**, v. 26, n. 1, p. 57-64, 2008.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer today**. Lyon: WHO, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home> Acesso em: 16 out. 2021.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. **Conceito e Magnitude do Câncer**. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude> Acesso em: 17 out. 2021.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. **O que causa o câncer?** 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-cao-cancer>. Acesso em: 17 out. 2021.

ITO, A. *et al.* Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 52, n. 2, p. 80-88, 2003.

KAUR, P. *et al.* Hyperthermia using nanoparticles - Promises and pitfalls. **International Journal of Hyperthermia**, v. 32, n. 1, p. 76–88, 2016.

LAURENT, S. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 2, n. 4, p. 367-390, 2011.

LAURINO, F. **Alterações hematológicas em cães e gatos sob estresse**. 2009. 21f. TCC (Graduação) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

LEAL, K. S. T. *et al.* Relação entre os valores do VCM e do RDW em hemogramas de pacientes atendidos no laboratório de análises clínicas do Hospital das Clínicas em Itaperuna. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 2, n. 6, p. 59-67, 2015.

LEOPOLDO, C. *et al.* Nanotecnologia e suas aplicações. **Revista Interface Tecnológica**, v. 17, n. 2, p. 144-154, 2020.

LI, Y. *et al.* Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Breast Cancer. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 1-38, 2017.

MAIER-HAUFF, K. *et al.* Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. **Journal of neuro-oncology** v. 81, n.1, p. 53-60, 2007.

MANTOVANI, A. *et al.* Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 24, p. 436-444, 2008.

MATOS, J. F. *et al.* Índice de anisocitose eritrocitária (RDW): diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 2, p. 120-123, 2008.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MERCOGLIANO, M. F. *et al.* Harnessing Tumor Necrosis Factor Alpha to Achieve Effective Cancer Immunotherapy. **Cancers**, v. 13, n. 1, p. 1-33, 2021.

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Dextran-Functionalized Magnetic Fluid Mediating Magnetohyperthermia Combined with Preventive Antioxidant Pequi-Oil Supplementation: Potential Use Against Cancer. **Journal Of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 7, p. 1261-1271, 2013.

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutrition Research**, v. 29, n.12, p. 850-858, 2009.

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor-bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n.12, p. 1091-1098, 2011.

MOREIRA, J. R. L. **A nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no tratamento do câncer de mama**. 2013. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MOURÃO, B. C. L. *et al.* Alterações renais relacionadas com desequilíbrios dos exames bioquímicos. **Revista Saúde em Foco**, v. 1, n. 11, p. 1441-1447, 2019.

NAOUM, P. C. Diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 2, p. 160-162, 2011.

NAOUM, P. C. **Doenças que alteram os exames bioquímicos**. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, 2007. 161 p.

NASCIMENTO-SILVA, N. R. R do *et al.* Potential of Whole Pequi (*Caryocar* spp.) Fruit—Pulp, Almond, Oil, and Shell—as a Medicinal Food. **Journal Of Medicinal Food**, v. 22, n. 9, p. 952-962, 2019.

NGUYEN, K. G, *et al.* Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. **Frontiers in immunology**, v. 11, n.1, p.575-597, 2020.

OLIVEIRA, A. L. R. *et al.* Fatores de risco e prevenção do Câncer De Mama. **Revista Cadernos de Medicina**, v. 2, n. 3, p. 135-145, 2019.

OLIVEIRA, C.M.B. *et al.* Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n.2, p. 255-265, 2011.

OSTÁDALOVÁ, I. *et al.* Biological Effects of Selenium Compounds With a Particular Attention to the Ontogenetic Development. **Physiological Research**, vol. 61, n. 1, p. 19-34, 2012.

PEDROSA, T. M. *et al.* Avaliação clínica dos sintomas de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Avances En Enfermería**, v. 37, n. 2, p. 158-168, 2019.

PINHEIRO, W. O. **Biodistribuição e eficácia terapêutica de nanopartículas magnéticas recobertas com citrato e nanocápsulas de selol no tratamento do adenocarcinoma mamário em camundongos idosos**. 2017. 97 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

PINHEIRO, W. O. *et al.* Synergistic Antitumor Efficacy of Magnetohyperthermia and Poly(lactic-co-glycolic acid)-Encapsulated Selol in Ehrlich Breast Adenocarcinoma Treatment in Elderly Swiss Mice. **Journal Of Biomedical Nanotechnology**. v. 16, n. 2, p. 179-192, 2020.

PINHEIRO, W. O. *et al.* Combination of selol nanocapsules and magnetic hyperthermia hinders breast tumor growth in aged mice after a short-time treatment. **Nanotechnology**. v. 33, n. 1, p. 1-15, 2022.

PINTO, T. L. **A Utilização de Lipossomas como Vetores de Fármacos Anticancerígenos**. 2014. 30 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade de Coimbra.

PRASAD, N. K. *et al.* Mechanism of cell death induced by magnetic hyperthermia with nanoparticles of c-MnxFe₂₂xO₃ synthesized by a single step process. **Journal Of Materials Chemistry**, v. 17, n. 48, p. 5042-5051, 2007.

RABBERS, A.S. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de compósito a base de colágeno e óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado) em Biologia Animal. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

RAMOS, G.; MARINI, D. C. Exames bioquímicos relacionados a alterações renais. **Revista Foco**, v. 6, n. 5, p. 11-26, 2014.

REDDY, L. *et al.* Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 1, p. 1-13, 2003.

ROHENKOHL, C. C. *et al.* Consumo de antioxidantes durante o tratamento quimioterápico. Abcd. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 2, p. 107-112, 2011.

SANTOS, M. R. V. *et al.* Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 6, n. 10, p. 1-6, 2010.

SANTOS, N. S. J. *et al.* Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Revista de Nutrição**, v. 3, n. 17, p. 339-349, 2004.

SCHINONI, Maria Isabel. Hepatic Physiology. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 140, n. 2, p. 5-9, 2008.

SILVA, P. A. *et al.* Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 6, n. 64, p. 1016-1021, 2012.

SIQUEIRA, E. R. L. **Nanoestruturas magnéticas revestidas com ouro como agente indutor de magneto-hipertermia para tratamento de câncer de mama**. 2019. 80 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

SOCHACKA, M. *et al.* Effects of Selol 5% supplementation on the activity or concentration of antioxidants and malondialdehyde level in the blood of healthy mice. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 2, p. 301-310, 2014.

TABOGA, S. *et al.* High Efficacy in Hyperthermia-associated with Polyphosphate Magnetic Nanoparticles for Oral Cancer Treatment. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 1-11, 2014.

TAPIERO, H. *et al.* The antioxidant role of selenium and selenocompounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 1, p. 134–144, 2003.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. 582 p.

VALE, A. F. *et al.* Antioxidant effect of the pequi oil (*Caryocar brasiliense*) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 79, n. 2, p. 257-262, 2019.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 99-103, 2016.

VISACRI, M. B. *et al.* Pharmacovigilance in oncology: pattern of spontaneous notifications, incidence of adverse drug reactions and under-reporting. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 2, p. 411-422, 2014.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **International Agency for Research on Cancer**. Globocan. Lyon: WHO, 2021.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Câncer de mama agora forma mais comum de câncer: OMS tomando medidas**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/pt/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action>. Acesso em: 16 out. 2021.

XU, X. *et al.* Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. **Trends In Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 223-232, 2015.

ZHANG, L. *et al.* Excipient-free prodrug-based three-in-one nanoparticles co-deliver diversified agents to amplify tumor therapy. **Chemical Engineering Journal**, v. 435, p. 1-19, 2022.


ANEXOS

1. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Brasília, 9 de junho de 2021.

DECLARAÇÃO – Prorrogação de Prazo

Declaramos que a prorrogação de prazo do projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DO EFEITO SINERGÉTICO ANTITUMORAL DA MAGNETOHIPERTERMIA COM NANOCÁPSULAS DE PLGA-SELOL ASSOCIADO À SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NO TRATAMENTO DO TUMOR DE MAMA INDUZIDO ORTOTOPICAMENTE POR CÉLULAS DE EHRlich EMCAMUNDONGOS SWISS**”, SEI 23106.148875/2019-27, sob responsabilidade do Professor Marcelo Henrique Sousa, foi avaliada e aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 155ª reunião ordinária, realizada em 8/6/2021. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* -Swiss, sendo 66 fêmeas, com procedência do biotério do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas ou do Biotério da Universidade Católica de Brasília. A presente declaração é válida pelo período de: 20/1/2020 a 31/12/2021.



Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.