



**Universidade de Brasília / Instituto de Ciências Biológicas / Programa de  
Pós Graduação em Biologia Animal.**

**ESTUDO DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS  
MCF-7 TRATADAS COM CITRATO DE RÓDIO  
ASSOCIADO A  
NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA**

**NATALIA LEMOS CHAVES**

**Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal, UnB.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sônia Nair Bão.**

**Brasília, 2013.**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me oferecer as ferramentas, os ingredientes e o espaço para eu desenvolver esse trabalho. Agradeço também, por colocar no meu caminho as pessoas certas como as que citarei.

Meus pais e meu irmão, meus torcedores fiéis, que sempre estão ao meu lado me apoiando, confiando na minha capacidade e nas minhas escolhas e rezando sempre por mim. Estes que são motivadores de minhas conquistas visto que todas elas são alcançadas acompanhadas de um propósito de tornar minha família mais orgulhosa de mim.

Ao meu querido namorado, amor da minha vida, amigo e colega de trabalho, Cláudio, por todos os conselhos, pelo companheirismo e, principalmente, por toda a paciência. Obrigado por querer de mim o meu melhor resultado em todos os desafios acreditando que eu posso, por me oferecer carinho, atenção, disciplina e firmeza na medida certa e no momento certo. Por me inspirar e por ser o exemplo de admirável dedicação e disciplina.

À professora doutora, vice-reitora, Sônia Nair Bão, pela orientação, credibilidade e oportunidade. Por todas as experiências obtidas com a vivência que, somadas, totalizaram no meu crescimento pessoal e profissional. Pelo exemplo de liderança, administração, dedicação, comprometimento e seu envolvimento com cada um de seus inúmeros trabalhos e compromissos, apesar das adversidades.

Ao professor José Raimundo não somente por sua colaboração, mas pelas discussões científicas e opiniões relevantes.

À professora doutora Marcella Lemos por seu apoio, reconhecimento, e contribuição.

Aos meus colegas de laboratório, Ingrid, Mariana, Márcia, Rachel, Felipe, Lauro, Mayara, Ludmilla e Raphael, por toda ajuda, pela agradável companhia, amizade e pelos conselhos. Agradeço especialmente a Ludmilla, pela imensurável ajuda, prontidão, disponibilidade, acessibilidade, apoio e amizade. Por não medir esforços em compartilhar seus conhecimentos sempre que a busquei. Por ser um exemplo, de acordo com meu conceito, de pesquisadora que atua a favor do grupo.

Aos membros da banca que aceitaram prontamente o convite.

À professora Sônia Freitas e ao professor Ricardo Bentes pelos espaços concedidos em seus laboratórios de onde foram gerados alguns dos dados que foram somados nesse trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Animal.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq, FINEP, FINATEC e FAP-DF.

## EPÍGRAFE

### *"Perseverança*

*Jogo a minha rede no mar da vida e às vezes, quando a recolho, descubro que ela retorna vazia. Não há como não me entristecer e não há como desistir. Deixo a lágrima correr, vinda das ondas que me renovam, por dentro, em silêncio: dor que não verte, envenena. O coração marejado, arrumo, como posso, os meus sentimentos. Passo a limpo os meus sonhos. Ajeito, da melhor forma que sei, a força que me move. Guardo a minha rede e deixo o dia dormir.*

*Com toda a tristeza pelas redes que voltam vazias, sou corajosa o bastante para não me acostumar com essa ideia. Se gente não fosse feita pra ser feliz, Deus não teria caprichado tanto nos detalhes. Perseverança não é somente acreditar na própria rede. Perseverança é não deixar de crer na capacidade de renovação das águas.*

*Hoje, o dia pode não ter sido bom, mas amanhã será outro mar. E eu estarei lá na beira da praia de novo."*

*Ana Jácomo*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
2.1 CÂNCER DE MAMA.....	13
2.1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	13
2.1.2 PATOLOGIA.....	14
2.1.3 TRATAMENTO.....	14
2.1.4 LIMITAÇÕES NO TRATAMENTO .....	15
2.2 ALTERNATIVAS PARA TRATAMENTO DE CÂNCER.....	17
2.2.1 COMPOSTOS DE METÁLICOS .....	17
2.2.2 COMPLEXOS DE RÓDIO (II) .....	18
2.2.3 NANOTECNOLOGIA .....	19
2.2.4 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS .....	19
2.3 INDUÇÃO DE APOPTOSE EM CÉLULAS TUMORAIS .....	22
2.3.1 VIAS DA APOPTOSE .....	22
2.3.2 ATIVAÇÃO DE CASPASES.....	24
2.3.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO DA APOPTOSE MEDIADA POR METAIS.....	26
2.3.4 APOPTOSE E CASPASE- 3 .....	27
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 CÉLULAS UTILIZADAS .....	30
4.2 FÁRMACO .....	30
4.3 CULTURA DE CÉLULA .....	31
4.4 TRATAMENTO DAS CÉLULAS.....	31
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS .....	32
4.6 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE .....	33
4.7 ANÁLISE DE CITOCROMO C .....	34
4.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA .....	35
4.9 ANÁLISE QUALITATIVA DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA .....	36

4.10	ESTUDO DA ATIVIDADE DE CASPASE 6 E 7.....	37
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	37
5.2	ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE .....	41
5.3	ANÁLISE DE CITOCROMO C POR IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	43
5.4	ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA .....	46
5.5	ESTUDO DA ATIVIDADE DE CASPASES 6 E 7.....	48
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da ligação química do citrato de ródio (II) com nanopartículas de maghemita..	21
Figura 2: Morte celular por apoptose .....	23
Figura 3: Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas (Magh-cit) em nanômetros..	38
Figura 4: Distribuição do potencial zeta das nanopartículas (Magh-cit)..	38
Figura 5 Micrografia de aglomerados de nanopartículas visualizados por microscopia eletrônica de transmissão. ....	39
Figura 6: Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas [Magh-Rh <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> cit) <sub>4</sub> ] em nanômetros..	40
Figura 7: Distribuição do potencial zeta das nanopartículas (Magh-cit)..	40
Figura 8: Viabilidade celular em células epiteliais (MCF-10A ) e células tumorais (MCF-7) da mama após 24 horas de tratamento .....	42
Figura 9: Viabilidade celular em células epiteliais (MCF-10A) e células tumorais (MCF-7) da mama após 48 horas de tratamento..	43
Figura 10: Localização do citocromo c em células MCF-7. ....	45
Figura 11: Fragmentação de DNA por citometria de fluxo em células MCF-7. ....	47
Figura 12: Fragmentação de DNA por TUNEL em células MCF-7. ....	48
Figura 13: Ativação de caspases.....	49
Figura 14: Identificação de caspases efetoras simultaneamente. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIF: *Apoptosis Inducing Factor*

APAF-1: *Apoptotic protease activating factor 1*

BAK: *Bcl-2 Homologous Antagonist/killer*

BAX: *Bcl-2-associated X Protein.*

BCL-2: *B cell/ lymphoma 2*

BCL-XL: *B-cell leukemia/lymphoma x*

BSA: *Bovine serum albumin*

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

DLS: *Dynamic light scattering*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

EROs: Espécies reativas do oxigênio

FAC: Fluorouracil, Doxorrubicina, Ciclofosfamida

FADD : *Fas Adaptor Death Domain*

FASL: *Fas ligand*

FAs: *Focal adhesions*

FEC: Fluorouracil, Epirubicina e Ciclofosfamida

FLICA: *Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases*

ICAD: *Inhibitor of the Caspase-Activated DNase*

INCA: Instituto Nacional de Câncer

JNK: *Jun N-terminal kinase*

Magh-cit: Nanopartículas de maghemita associadas a ácido cítrico

Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>: Nanopartículas de maghemita associadas a citrato de ródio (II).



MAP-QUINASE: *Mitogen Activated Protein Kinases*

MCF-7: *Michigan cancer foundation - 7*

MCF-10A: *Michigan cancer foundation-10A*

MRP: *Multidrug resistance protein*

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

PBS: *Phosphate buffered saline*

PdI: *Polydispersity index*

P-GLICOPROTEÍNA: Proteína expressa na superfície celular

PI: Iodeto de Propídio

Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>: citrato de ródio

SFB: Soro Fetal Bovino

SMAC: *Second Mitochondrial-derived Activator of Caspase*

TNF: *Tumor necrosis factor*

TRADD: *Tumor Associated Death Domain*

TRITON-X: 1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol

RHO: pequenas GTPases

ROCK-1: *Rho-associated protein kinase member*

TUNEL: *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-mediated dUDP-biotin nick-end labeling*

ZP : *Zeta Potential*

## RESUMO

O câncer de mama é um dos mais frequente entre as mulheres em todo o mundo. Em busca de drogas mais eficientes para o tratamento de câncer, complexos metálicos estão sendo amplamente estudados. A intercalação destes complexos em bases de DNA pode inibir eventos como transcrição e replicação, causando morte celular. No entanto, a utilização destes compostos é limitada devido à sua toxicidade sistêmica. Nesse contexto, o uso de citrato de ródio  $[Rh_2(H_2cit)_4]$  associado com nanopartículas magnéticas (NPs) pode reduzir a toxicidade sistêmica no tratamento do câncer. Neste estudo, foram comparados os efeitos do citrato de ródio livre  $[Rh_2(H_2cit)_4]$ ,  $[Rh_2(H_2cit)_4]$  carregado por nanopartículas (NPs)  $[Magh-Rh_2(H_2cit)_4]$  e NPs de maguemita funcionalizadas com ácido-cítrico (Magh-cit) em células MCF-7 de câncer de mama e células epiteliais de mama não tumorais (MCF-10A). Foram também realizados estudos para verificar a indução de apoptose por esses fármacos, em células MCF-7. As concentrações estudadas de citrato de ródio livre foram menos citotóxicas do que as outras formulações do fármaco avaliadas em ambas as linhagens celular. Além disso, os resultados obtidos por citometria de fluxo, mostraram aumento estatisticamente significativo de fragmentação de DNA em 36 horas de tratamento com  $Magh-Rh_2(H_2cit)_4$  NPs (300  $\mu$ M) e com a mesma concentração de ferro de Magh-cit NPs. Os mesmos tratamentos analisados por imagens confocais mostraram a fragmentação nuclear, em células MCF-7 depois de (48 horas). Após 24 horas, os tratamentos induziram translocação de citocromo C das mitocôndrias. Após pelo menos 12 horas de tratamento com as nanopartículas, foi possível identificar caspases efetoras ativas. Portanto, foi demonstrado que o citrato de ródio associado com nanopartículas de maguemita e nanopartículas de maghemita ligada ao citrato induziram citotoxicidade em células tumorais e podem representar uma alternativa para o tratamento do câncer de mama. Também foi demonstrado que as nanopartículas podem induzir, em células MCF-7, alterações celulares características de morte celular por apoptose, mesmo na ausência de caspases 3.

**Palavras-chave:** Nanopartículas. Apoptose. MCF-7. Caspases

## SUMMARY

Breast cancer is a of the most frequent cancer among women worldwide. In search of more efficient drugs against cancer, metal complexes are being widely studied. The intercalation of these compounds in DNA bases impairs transcription and replication events causing cell death. Nevertheless, the use of these compounds is limited because of their systemic toxicity. In this regard, the use of dirhodium citrate [ $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ] associated with magnetic nanoparticles (NPs), should work reducing systemic toxicity in cancer treatment. In this study, we compared the effects of  $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ,  $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ -loaded maghemite NPs [ $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ] and citrate-loaded maghemite NPs (Magh-cit) on MCF-7 breast cancer cells and MCF-10A non-tumor and nontumorigenic epithelial breast cells. Events of apoptosis stimulated by nanoparticles were also checked. The concentrations rhodium citrate was less cytotoxic than other forms of drugs evaluated. Moreover, the results obtained by flow cytometry showed statistically significant increase in DNA fragmentation 36 hours of treatment with Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$  NPs (300  $\mu\text{M}$ ) and with the same iron concentration of Magh-cit NPs. The same treatments analyzed by confocal images showed nuclear fragmentation in MCF-7 cells after (48 hours). Treatment with 300  $\mu\text{M}$  rhodium citrate Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$  NPs and Magh-cit NPs after 24 hours, caused release of cytochrome c from mitochondria, indicating alteration of mitochondrial membrane permeability. After at least 12 hours of treatment with nanoparticles, it was possible to identify active effector caspases. We showed that dirhodium citrate associated with maghemite nanoparticles and citrate-loaded maghemite NPs induced cytotoxicity in tumor cells and should represent a great alternative for breast cancer treatment. It has been shown that nanoparticles can induce changes that characterize apoptotic cell death in MCF-7 cells, even in the absence of caspase 3.

**Keywords:** Nanoparticles. Apoptose. MCF-7. Caspases.

# 1. INTRODUÇÃO

O uso de compostos inorgânicos e suas aplicações biológicas vêm sendo cada vez mais explorados. Os compostos metálicos têm apresentado propriedades antibacterianas, antidepressivas, anti-hipertensivas e antitumorais (Chifotides & Dunbar, 2005). O foco na atividade antitumoral dos metais iniciou-se com os resultados de inibição de tumores pela cisplatina  $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{C}_2]$  ou  $cis\text{-DDP1-3}$  e compostos relacionados utilizados no tratamento de câncer de testículo, cabeça, pescoço, esôfago e carcinoma de pulmão. Investigações acerca desse potente agente antitumoral têm sugerido que sua atividade intracelular esteja focada na ligação com o DNA, levando a uma série de eventos como inibição da transcrição e reparo, causando morte celular (Zhang & Lippard, 2003).

A atividade antitumoral dos carboxilatos de ródio (II) foi descoberta em 1972 por Hughes e colaboradores. Os carboxilatos mais estudados (acetato, propionato e butirato), induziram redução tumoral *in vivo* em testes em células leucêmicas L1210 (Hughes *et al.*, 1972), ascite de Ehrlich (Erck *et al.*, 1974), sarcoma 180 e linhagem de tumor P388 (Bear *et al.*, 1986). Com o objetivo de conferir aos complexos de ródio maior solubilidade em água e menor toxicidade sistêmica, novos complexos foram sintetizados, substituindo carboxilatos usuais por ácidos policarboxílicos ou hidrocarbonetos. Um dos resultados dessas novas combinações de compostos foi o citrato de ródio  $[\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4]$ . Esse complexo aumentou a sobrevivência de camundongos portadores de ascite de Erlich para 75%, contra 21% do grupo controle, mostrou-se ainda bastante hidrossolúvel e com menor toxicidade sistêmica, comparada a outros carboxilatos de ródio (Zyngier *et al.*, 1989).

A síntese do citrato de ródio e sua combinação com nanopartículas reduziu a toxicidade característica dos compostos de ródio (*in vivo* e *in vitro*). Nosso grupo tem

investigado a atividade antitumoral do citrato de ródio associado com a nanopartícula de maghemita ( $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ) em células MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation – 7*) de câncer de mama (Carneiro *et al.*, 2011). Apesar das perspectivas do citrato de ródio como agente antitumoral, baseados nos trabalhos existentes (Zyngier *et al.*, 1989) e em nossos resultados (Carneiro, 2011), existem poucos trabalhos relacionados com esse composto, principalmente em relação ao seu mecanismo de ação.

A indução de morte de células tumorais pelo citrato de ródio, pode estar relacionada com alguma forma de ativação da apoptose. Este é um processo natural de morte celular que é caracterizado por uma grande variedade de vias de transdução de sinais que leva a degradação de DNA e alteração da permeabilidade da membrana plasmática e mitocondrial, sendo acompanhado por várias vias de degeneração (Ghobrial *et al.*, 2005; Grivicich *et al.*, 2007).

A apoptose é um processo fundamental, essencial para a homeostase e desenvolvimento do tecido normal e está intimamente associada com a ativação de caspases, que levam à morte da célula por meio de proteólise de uma multiplicidade de substratos celulares (Fischer *et al.*, 2003).

Células MCF-7 de adenocarcinoma mamário são amplamente utilizadas como modelo de estudo de câncer de mama. Estas células são resistentes a uma variedade de drogas e não expressam caspases-3 (Simstein *et al.*, 2003; Jänicke, 2009). Caspases são proteases de cisteína que formam um sistema proteolítico central para a execução da maquinaria da apoptose. Estas enzimas participam de uma cascata, que é desencadeada em resposta a sinais proapoptóticos e culmina em clivagem de um conjunto de proteínas, resultando na desmontagem da célula (Thornberry & Lazebnik, 1998). No entanto, alguns

trabalhos demonstraram a fragmentação de DNA em MCF-7, que ocorreria através de mecanismos independente de caspases ou executada por outras caspases, que podem ser as responsáveis por essa alteração morfológica, na ausência de caspase 3 (Mc gee *et al.*, 2002; Semenov, *et al.*, 2004; Guan, *et al.*, 2012; Özgür *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a proposta desse trabalho é analisar a morte celular por apoptose induzida pela [Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>] e nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato (Magh-cit), estudando os eventos celulares característicos desse tipo de morte, como a fragmentação de DNA, em células MCF-7.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 CÂNCER DE MAMA**

#### **2.1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS**

O câncer de mama destaca-se entre outros tipos de neoplasias por ser o mais comum entre as mulheres e por representar o segundo mais frequente no mundo. Na população mundial, a sobrevivência após cinco anos da doença é de 61% (WHO, 2008).

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em mulheres. Para o ano de 2011, foram estimados 49.240 casos novos, que representam uma incidência de 49 casos para cada grupo de 100.000 mulheres, sendo o responsável pelo óbito de 12 mil mulheres por ano no país (INCA 2011). Segundo o INCA eram esperados 52 casos para 100.000 mulheres em 2012. O câncer de mama é o tumor que mais mata a população feminina em todo o Brasil (INCA, 2012).

### **2.1.2 PATOLOGIA**

A maioria dos cânceres de mama são carcinomas, o que significa que são derivados de células epiteliais. Os carcinomas podem ainda ser invasivos ou *in situ*. Os carcinomas *in situ* podem surgir tanto em ductos como em lóbulos. Porém, estes permanecem localizados em sua região de origem sem comprometer estruturas adjacentes, ou seja, com baixo potencial metastático. Ao contrário dos carcinomas malignos invasivos que tem alto potencial metastático (Richie & Swanson, 2003).

Um fator importante no mecanismo tumorigênico do câncer de mama é a alteração na regulação de apoptose que pode ser resultante de acúmulos de danos genéticos levando a alterações em genes tais como ativação de proto-oncogênes e inativação de genes supressores de tumor. Esses danos genéticos podem ser herdados como mutações em células germinativas ou adquiridos como mutações em células somáticas. Fatores ambientais (físicos, químicos e biológicos) podem estar relacionados com esses danos nos genes (Pasqualini, 2002).

### **2.1.3 TRATAMENTO**

Um importante parâmetro utilizado para escolha do melhor tipo de tratamento é o nível de estadiamento do câncer de mama. Essa avaliação tem como objetivo proporcionar um bom prognóstico às pacientes de câncer de mama. O estadiamento clínico do câncer de mama envolve o cálculo aproximado do tamanho do tumor e a estimativa do envolvimento dos linfonodos axilares, pelo exame físico e a mamografia. Os tumores podem ser classificados em: estágio I (tumores < 2 cm e confinados à mama), estágio II (tumores < 5 cm

com envolvimento ou não dos linfonodos axilares móveis), estágio IIIa (tumores > 5 cm, acompanhados ou não por envolvimento de linfonodos axilares), estágio IIIb (lesões mais avançadas) e estágio IV (todos os tumores com metástase à distância (Singletary *et al.*, 2008).

As modalidades terapêuticas para o câncer de mama são a cirurgia e a radioterapia, para o tratamento loco-regional, e quimioterapia e hormonioterapia, para tratamento sistêmico (Barros *et al.*, 2001).

No câncer de mama inicial com o tumor detectado somente na mama ou no caso de mulheres com nódulo-positivo, o nódulo ou mama podem ser removidos cirurgicamente. No entanto, resíduos não detectados de tecido tumoral podem permanecer e se não tratados, podem se desenvolver. Apesar de este fato ser incomum em cânceres de mama, o risco de recorrência é maior durante a primeira década e pode ser substancial durante a segunda década após o diagnóstico (CTSUS, RI, 2005).

#### **2.1.4 LIMITAÇÕES NO TRATAMENTO**

Apenas uma pequena proporção de indivíduos com reincidência de câncer de mama é elegível para a intervenção cirúrgica. Felizmente, a doença, mesmo quando metastática, continua a responder a uma grande variedade de formulações paliativas. Estas formulações são empregadas na tentativa de prolongar a sobrevida ou para aliviar os sintomas, embora não induzam a reversão do processo tumoral. Isto conduziu a uma grande quantidade de pesquisas clínicas que exploraram os papéis da quimioterapia e hormonioterapia como modalidades de tratamento primário para controlar a doença metastática (Fossati, 1998).



Alguns dos mais antigos tratamentos combinados são seis meses de FAC (fluorouracil, doxorubicina e ciclofosfamida) ou FEC (fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida), ou cinco anos de tamoxifeno, como recomendado pelo instituto nacional de saúde dos EUA publicado em uma conferência em 2001 (NIH, 2000). Essas combinações podem reduzir pela metade, aproximadamente, a taxa de mortalidade por câncer-ER positivo (com receptor de estrógeno). No entanto, riscos significativos de recorrência e de morte permanecem, principalmente se forem considerados tanto a primeira como a segunda década após o início da doença (CTSU, RI, 2005).

Além disso, muitos fármacos utilizados atualmente para o tratamento de câncer de mama não se acumulam seletivamente no tecido tumoral, assim como a maioria dos agentes farmacológicos administrados pela via intravenosa, que são uniformemente distribuídos para todos os órgãos e tecidos do corpo, principalmente que apresentam alta permeabilidade. Devida á alta pressão intersticial no ambiente tumoral, o acúmulo de agentes citotóxicos nas lesões neoplásicas é desfavorecido (Jain, 1987; Bosslet *et al.*, 1998).

Os tumores geralmente consistem em populações mistas de células malignas, algumas das quais são sensíveis às drogas, enquanto outras são resistentes. A quimioterapia mata as células sensíveis à droga, mas uma proporção maior de células resistentes permanece. À medida que o tumor começa a crescer novamente, a quimioterapia pode falhar, porque as células tumorais remanescentes são agora resistentes. Resistência à terapia tem sido correlacionada com a presença de pelo menos duas "bombas" moleculares, que ativamente expulsam as drogas quimioterápicas das células do tumor. As duas bombas comumente encontradas para conferir quimiorresistência no câncer são a P-glicoproteína e a chamada proteína associada com a resistência a multidrogas (MRP). Assim, esta ação impede os

efeitos da droga nas células tumorais, que é tentar atuar no interior da célula, no núcleo ou no citoplasma. (Persidis, 1999).

Obstáculos adicionais associados à quimioterapia convencional com apenas uma droga incluem a acessibilidade limitada do fármaco ao tecido tumoral, induzindo a elevação da dose, que pode levar a citotoxicidade intolerável e não específica (Das *et al.*, 2009).

Considerando tais fatores limitantes para o tratamento do câncer de mama, observa-se a necessidade de novas formas terapêuticas que sejam mais específicas para células tumorais e que possam assim, eliminar ou reduzir as chances de reincidência da doença.

## **2.2 ALTERNATIVAS PARA TRATAMENTO DE CÂNCER**

### **2.2.1 COMPOSTOS METÁLICOS**

A cisplatina foi um dos primeiros complexos metálicos a ser avaliado em relação à atividade antitumoral (Rosenberg & Vancamp, 1969). Baseados nas perspectivas estabelecidas pelos resultados dos testes com a cisplatina como agente antitumoral, estudos posteriores foram realizados com compostos metálicos análogos (Boven *et al.*, 1985) ou outros compostos metálicos (Keppler, 1993), para avaliação dessas propriedades. Estudos subsequentes visavam identificar o mecanismo de ação, para aprimorar as características farmacológicas desses complexos, incluindo a redução da toxicidade (Ries & Klastersky, 1986). Os metais pesados foram cogitados como candidatos a novos complexos metálicos antitumorais. Porém, eles são geralmente tóxicos, possivelmente devido a ligações de enxofre e nitrogênio em sítios de proteínas, que podem interferir em reações metabólicas. Além disso, vários metais apresentam ação por meio da atividade *redox* (reação de redução-oxidação). Outro metal que apresenta

colateralidade é o gálio, que parece sequestrar o ferro do metabolismo ou dos ossos no seu funcionamento (Clarke, 1996).

No grupo dos metais de transição, o uso da cisplatina apresentou limitações para seu uso no tratamento anti-tumoral (toxicidade e resistência ao fármaco). Assim, outros metais desse grupo foram estudados para a busca de uma melhor alternativa para o uso na terapia do câncer (Rafique *et al.*, 2010).

### **2.2.2 COMPLEXOS DE RÓDIO (II)**

Baseados nos resultados que mostravam o aumento da sobrevivência de camundongos portadores de ascite de Ehrlich e leucemia P388, após o tratamento com o acetato de ródio (Hughes *et al.*, 1972), os carboxilatos de ródio tornaram-se mais uma opção de composto metálico com potencial de atividade antitumoral. No entanto, eram necessários estudos para melhor compreensão dessa propriedade. Ensaios com tal finalidade demonstraram que a maioria desses compostos apresentavam alta toxicidade e baixa solubilidade. Uma das exceções foi o citrato de ródio (II) (Bear *et al.*, 1986). Outra observação importante foi que a maioria das drogas antitumorais induz dano cromossômico nas células tratadas (por exemplo, cisplatina), resultando na formação de lesões cromossômicas (Zwelling, *et al.*, 1979). O butirato de ródio (II) apenas aumenta ligeiramente a incidência de alterações cromossômicas dos tipos falhas e quebras (Rao *et al.*, 1980).

O propionato de ródio (II) e o acetato de ródio (II) inibiram a síntese de DNA em células tumorais. Acredita-se que o modo de inibição da síntese de DNA dos carboxilatos de ródio (II) pode ser por meio da inibição de enzima (s) essenciais para a síntese de DNA, tal

como DNA-polimerase I, em vez de quelação de DNA (Erck *et al.*, 1974). No entanto, devido à elevada solubilidade em água do citrato de ródio (II), elevadas doses sistêmicas do fármaco seriam necessárias para alcançar as concentrações eficazes em locais do tumor. Portanto, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, em que o ródio (II) esteja protegido do meio extracelular para minimizar locais de toxicidade e prolongar sua ação é um objetivo desejável (Sinisterra *et al.*, 1999).

### **2.2.3 NANOBIOTECNOLOGIA**

Nanotecnologia é o estudo de manipulação da matéria numa escala atômica e molecular. Um dos seus principais objetivos é o desenvolvimento de formas de diagnóstico e de terapia ainda mais seguros e eficazes para o câncer. Desenvolvimento tecnológico de fármacos carregados por nanossistemas são uma promissora classe terapêutica com o potencial de melhorar a eficácia e a segurança dos fármacos utilizados atualmente. Há também a oportunidade de criar compostos terapêuticos novos, utilizando a nanotecnologia. Cada vez mais arsenais de plataformas nanotecnológicas estão sendo estudados incluindo nanopartículas poliméricas, lipossomos, nanocápsulas, dendrímeros, nanopartículas de polinucleotídeos, nanopartículas metálicas e nanopartículas magnéticas (Alexis *et al.*, 2008).

### **2.2.4 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

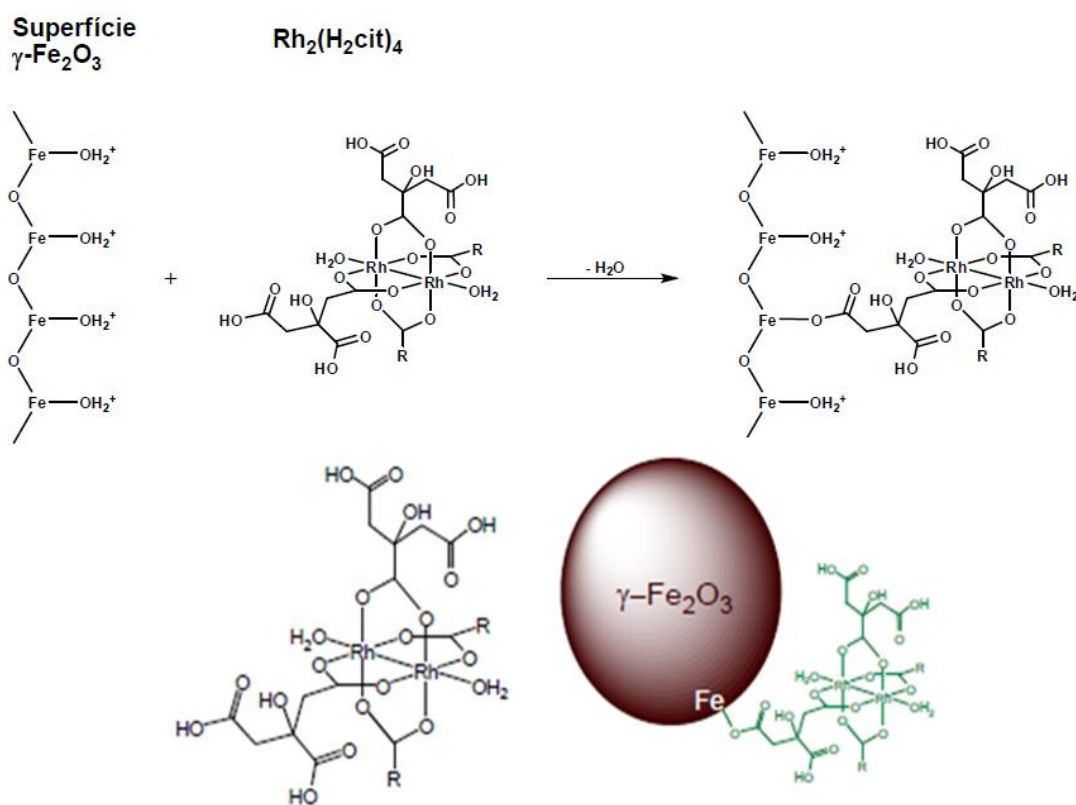
Nanopartículas magnéticas oferecem algumas possibilidades atraentes na biomedicina. Em primeiro lugar, elas têm tamanhos controláveis que vão desde alguns nanômetros até dezenas de nanômetros, o que as coloca em dimensões que são menores ou

comparáveis aos tamanhos de uma célula, um vírus, uma proteína ou um gene. Isto significa que elas podem interagir com um alvo biológico de interesse. Elas podem ser revestidas com moléculas biológicas para fazer interação ou ligação específica, assim proporcionam meios controláveis de “marcação” ou interação. Além disso, as nanopartículas magnéticas obedecem à lei de Coulomb, e assim, podem ser manipuladas por um gradiente de um campo externo. Esta "ação à distância", combinada com a penetrabilidade intrínseca de campos magnéticos em tecido humano, possibilitam muitas aplicações, que envolvem transporte e/ou imobilização de nanopartículas magnéticas, além de marcação magnética de componentes biológicos. Dessa forma, elas podem ser sintetizadas para entrega de fármacos como, por exemplo, um composto anticancerígeno (Arruebo *et al.*, 2007).

As NPs magnéticas também podem conter um grupo de átomos radionuclídeos (átomos com núcleos instáveis, que emitem radiação, podendo ligar-se quimicamente a outras moléculas que apresentam uma afinidade particular para determinado processo fisiológico) destinados a uma região alvo do corpo, como por exemplo, um tumor (Pankhurst *et al.*, 2003).

Além disso, essas nanopartículas podem ser utilizadas para responderem ressonantemente a uma variação de campo, ou seja, com transferência de energia do campo excitante para a nanopartícula. Esse processo pode ter aplicações úteis. Por exemplo, as partículas podem ser aquecidas através dessa variação de campo magnético, o que leva à sua utilização como agentes de hipertermia, proporcionando quantidades tóxicas de energia térmica em tecidos-alvo, tais como tumores. Estas e muitas outras potenciais aplicações são disponibilizadas para a medicina, como resultado das propriedades físicas especiais das nanopartículas magnéticas (Laurent *et al.*, 2011).

Visando a melhoria da disponibilização do citrato de ródio (II), estudos foram feitos para testar os efeitos do citrato de ródio (II) carregados por nanopartículas magnéticas de maghemita (**figura 1**) comparando-os com o citrato de ródio (II) livre em células de câncer de mama (4T1 e MCF-7). Os resultados apresentaram uma ação mais específica do fármaco associado a nanopartícula em células tumorais (Carneiro *et al.*, 2011; Carneiro, 2012). Apesar disso, não se tem informações sobre a atividade biológica tais como via de morte celular induzida pelo conjunto.



**Figura 1:** Representação da ligação química do citrato de ródio (II) com nanopartículas de maghemita (Adaptado de Carneiro, 2011; Peixoto, 2012).

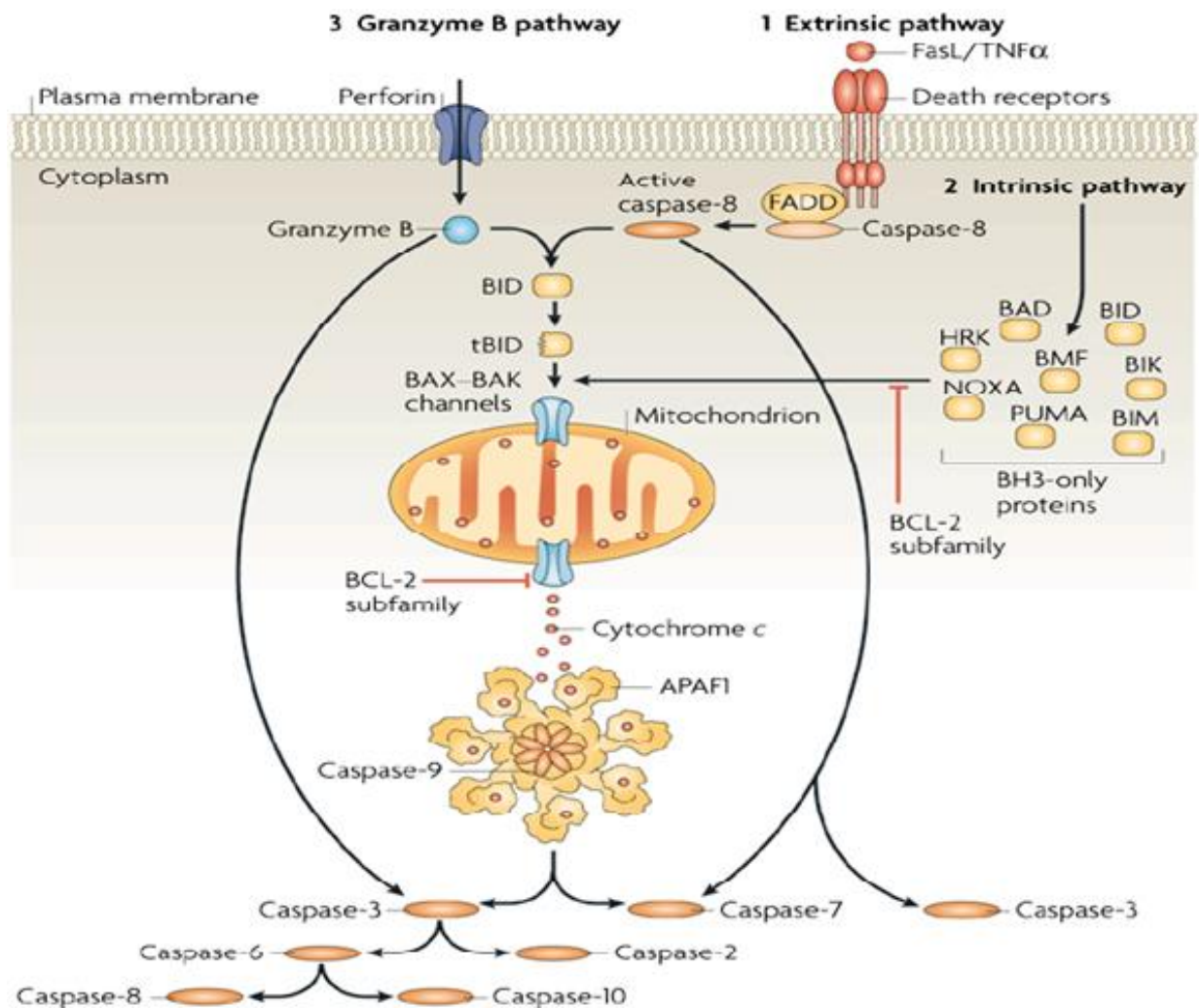
## 2.3 INDUÇÃO DE APOPTOSE EM CÉLULAS TUMORAIS

### 2.3.1 VIAS DA APOPTOSE

A investigação sobre as origens do câncer tem sido tradicionalmente centrada na proliferação celular, no entanto, recentemente se tornou evidente que a morte celular programada (denominada "apoptose"), é talvez, mais crítica para a compreensão da tumorigênese e progressão da doença. A apoptose está intimamente envolvida no desenvolvimento e homeostasia dos tecidos normais (Rudin & Thompson, 1997).

As células malignas frequentemente portam mutações em componentes essenciais da via apoptótica que podem estar relacionadas com prognósticos ruins da doença. Os tumores sólidos devem contornar as vias de apoptose para formarem metástases e se estabelecerem em locais secundários de tumor. A quimioterapia tem sido aplicada no intuito de eliminar células cancerígenas, pela inativação de vias metabólicas importantes. No entanto, atualmente reconhece-se que muitas vias quimioterapêuticas eficientes envolvem a ativação de alguma via de apoptose. É, portanto, de primordial importância, para o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes, o profundo entendimento dos fundamentos moleculares da maquinaria da apoptose (McGill & Fisher, 1997)

A apoptose ocorre por meio de duas vias principais. A primeira é designada via extrínseca ou citoplasmática, a qual é acionada por meio do receptor de morte Fas (*Focal adhesions*), um membro da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (TNF) (Zapata *et al.*, 2001). O segundo caminho é a via intrínseca ou mitocondrial que, quando estimulada, conduz à liberação de citocromo-c, a partir da mitocôndria, e ativação de sinais de morte (**figura 2**) (Jemmerson & Wang, 1996).



**Figura 2:** Morte celular por Apoptose. A apoptose é ativada por três formas principais. A via extrínseca é ativada por receptores de morte Fas. A outra via é a intrínseca ou mitocondrial, que quando ativada, leva a ativação de citocromo c da mitocôndria e de sinais de morte. A via da granzima B via dependente de ativação de caspases ocorre mediante a entrega destas proteases para a célula alvo através de grânulos especializados que são liberados a partir dos linfócitos T citotóxicos (CTL) ou natural killer (NK). Grânulos de CTL e NK contêm numerosas granzimas, bem como uma proteína de formação de poros, perforina, que oligomerizam nas membranas das células alvo para permitir a entrada das granzimas. A granzima B, semelhante aos caspases, também cliva seus substratos após resíduos Asp e pode processar BID, bem como a caspase-3 e -7 para iniciar a apoptose. Ambas as vias convergem em um único caminho que envolve ativação de caspases que clivam moléculas regulatórias e estruturais culminando em morte celular (Taylor *et al.*, 2008).



Os mecanismos de apoptose são altamente complexos e sofisticados, envolvendo uma cascata de eventos moleculares. Atuais evidências mostram que as duas principais vias de apoptose estão ligadas e que as moléculas de um percurso pode influenciar no outro (Igney & Krammer, 2002). Além dessas, há uma via suplementar que envolve citotoxicidade mediada por células T e morte celular dependente de perforina e granzima. A via da perforina e granzima pode ainda induzir a apoptose, quer por meio de granzima B ou granzima A (**figura 2**). As vias extrínsecas, intrínseca e granzima B convergem no fim ou no caminho de execução. Esta via é iniciada pela clivagem de caspase 3 e resulta na fragmentação do DNA, degradação de proteínas do citoesqueleto e nucleares, reticulação de proteínas, formação de corpos apoptóticos, expressão de receptores de ligantes (ex: fosfatidilserina) para a célula fagocítica e, finalmente, captação pelas células fagocíticas. A via da granzima A ativa um caminho paralelo de morte celular, independente de caspases, causada por danos no DNA de cadeia simples (Martinvalet *et al.*, 2008).

### **2.3.2 ATIVAÇÃO DE CASPASES**

As caspases possuem similaridades na sequência de aminoácidos, estrutura e especificidade de substrato (Nicholson & Thornberry, 1997). Elas são expressas como pró-enzimas (30 a 50 kDa) que contém três domínios: um domínio NH<sub>2</sub>-terminal, uma subunidade grande (20 kDa), e uma subunidade pequena (10 kDa).

A ativação da apoptose envolve processamento proteolítico entre domínios, seguido por associação das subunidades pequenas e grandes, de modo a formar um heterodímero. Duas características da estrutura das proenzimas são centrais para o mecanismo de ativação destas enzimas. Em primeiro lugar, o domínio terminal NH<sub>2</sub>, que é

altamente variável na sequência e no comprimento e está envolvido na regulação de ativação. Em segundo lugar, todos os domínios são derivados de pró-enzimas de clivagem em locais de consenso da caspase, implicando que estas enzimas podem ser ativadas tanto autocataliticamente como em uma cascata por enzimas com especificidade semelhante (Thornberry & Lazebnik, 1998).

As caspases 3, 6 e 7 são conhecidas como caspases executoras. Elas estão posicionadas em locais posteriores às caspase-8 ou caspase-9 na cascata de ativação, e representam um ponto em que as vias de apoptose intrínseca e extrínseca convergem. Uma vez ativadas, as caspases executoras são responsáveis pela clivagem proteolítica de uma ampla gama de proteínas celulares (**figura 2**) (Fischer *et al.*, 2003).

### 2.3.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO DA APOPTOSE MEDIADA POR METAIS

Metais ou EROs (espécies reativas de oxigênio) geradas por metais iniciam diretamente a via intrínseca de apoptose. Esses também podem iniciar esta via indiretamente, ativando a p53 como resultado de danos no DNA. A ativação de p53 provoca a expressão do Bax (*Bcl-2-associated X Protein*) e Noxa, duas proteínas apoptóticas que induzem um aumento na permeabilidade mitocondrial. Nessa circunstância, citocromo c é liberado para o citosol a partir de mitocôndrias danificadas e se liga a Apaf1, resultando na ativação da caspase-9. A mitocôndria danificada, também pode liberar AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), que induz a apoptose de uma maneira independente de caspase, e Smac (*Second Mitochondrial-derived Activator of Caspase*) que antagoniza o efeito anti-apoptótico de proteínas IAP (inibidores de apoptose). Metais ou EROs podem também potencializar a via extrínseca de apoptose por meio de MAP-quinase (*Mitogen Activated Protein Kinases*), em particular de *Jun N-terminal kinase* (JNK) mediada por indução de expressão de FasL (*Fas ligand*) ou Fas. O recrutamento de proteínas contendo domínio de morte, como *Fas adaptord death domain* (FADD) e *Tumor associated death domain* (TRADD), para estes complexos de receptores ativa a caspase-8. A ativação de caspase-8 e caspase-9, leva à ativação de caspases efetoras, incluindo caspase-3 e caspase-7 (Chen *et al.*, 2001).

### 2.3.4 APOPTOSE E CASPASE- 3

A caspase-3 tem sido considerada criticamente importante para a execução da via apoptótica mitocondrial (Porter & Janicke, 1999; Zhivotovsky *et al.*, 1999). Esta, encontra-se entre as caspases (incluindo também as caspases 6 e 7) que são ativadas após a ruptura da função de barreira da membrana mitocondrial (Marzo *et al.*, 1998). Assim, são diferente das chamadas caspases do citoplasma, as quais desempenham um papel na permeabilização da membrana mitocondrial (Susin *et al.*, 1997; Medema *et al.*, 1997; Marzo *et al.*, 1998). A ativação da caspase 3 depende da anterior ruptura da membrana mitocondrial e ocorre concomitantemente com a liberação da proteína intermembranar, citocromo c (Scaffidi *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1997). Uma vez ativadas, caspases 3 e 7 agem na mitocôndria para intensificar a perda da integridade da membrana (Chandler *et al.*, 1998), assim, exerce um *loop de feed back* auto-amplificador em que a permeabilização da membrana mitocondrial causa ativação de caspases e vice versa. Além disso, esta via é regulada por proteínas da família Bcl-2 (*B cell/ lymphoma 2*), incluindo proteínas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2 e Bcl-XL (*B-cell leukemia/lymphoma x*), e proteínas pró-apoptóticas, tais como Bax e Bak (*Bcl-2 Homologous Antagonist/killer*) (Merry & Korsmeyer, 1997). Evidências atuais sugerem que a Bcl-2 atua na ativação da caspase-3 ao nível de liberação do citocromo c para prevenir a apoptose (Shimizu *et al.*, 1996; Chinnaiyan *et al.*, 1996; Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997).

Com a proteólise de substratos, a caspase-3 evoca algumas das típicas alterações bioquímicas e morfológicas associadas com a apoptose. Por exemplo, caspase-3 medeia a clivagem de a-fodrina, gelsolina, quinase-1 associada à rho (ROCK-1) e quinase 2 ativada por p21(PAK2) que contribuem para *blebbing* da membrana, clivagem do inibidor de

DNase ativada por caspase (ICAD) e conduz ao padrão de fragmentação de DNA tipicamente observado na apoptose (Fischer *et al.*, 2003).

As células MCF-7 de carcinoma de mama humano não expressam caspase-3 (Jänicke *et al.*, 1998). Apesar disto, células MCF-7 apresentam várias alterações morfológicas compatíveis com apoptose após o tratamento com uma variedade de agentes e condições (Oberhammer *et al.*, 1993; Eck-Enriquez *et al.*, 2000). Alguns dos indutores (fator de necrose tumoral- TNF e estaurosporina) capazes de induzirem a apoptose nesse tipo celular, a executa na ausência de fragmentação de DNA ou outros marcadores morfológicos desse tipo de morte (Jänicke *et al.*, 1998). No entanto, outros estudos demonstraram a possibilidade dessas células serem induzidas a apoptose acompanhada dessas alterações morfológicas típicas, incluindo a fragmentação de DNA, sugerindo assim, a possibilidade de que a caspase-3, pode não ser essencial para a fragmentação de DNA durante a apoptose (Mc gee *et al.*, 2002).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Investigar os mecanismos de morte celular pela ação do citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita em células de carcinoma mamário.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar as nanopartículas.
- Comparar o efeito citotóxico das nanopartículas associada ao citrato de ródio, das nanopartículas apenas funcionalizadas com citrato, e do citrato de ródio livre em células de carcinoma mamário e células normais da mama.
- Avaliar a apoptose na ausência de caspase 3, promovida pelo citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita por via mitocondrial através do processo de ativação de caspases, ativação e translocação do citocromo c e de fragmentação de DNA.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CÉLULAS UTILIZADAS

- Linhagem de células tumorais mamárias, MCF-7. As células adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC® HTB-22TM) foram inicialmente estabelecidas na década de 70, a partir de células tumorais provenientes de efusão pleural são originadas de tumor metastático de câncer de mama. Estas apresentam receptor para estrógeno e são tumorigênicas quando implantadas em camundongos nude, porém, pouco invasivas (Zajchowski *et al.*, 2001).
- As células epiteliais mamárias não tumorais e não tumorigênicas MCF-10A (*Michigan cancer foundation-10A*) foram cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Mitzi Brentani (Departamento de Radiologia, Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – Brasil (ATCC® CRL 1037TM)).

### 4.2 FÁRMACO

- Citrato de ródio [ $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ] e citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita [ $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ] nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$  de citrato de ródio e nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato (Magh-cit) nas concentrações de 3 mM, 12 mM e 19 mM de Ferro (concentrações de Ferro nas soluções finais de [ $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ] em 50  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$  de citrato de ródio, respectivamente). O complexo de  $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ , os fluidos magnéticos composto por  $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$  e  $\text{Magh-cit}$  obtidos pelo processo de coprecipitação alcalina de íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  foram sintetizados e caracterizados inicialmente sob supervisão do

Prof. Dr. Aparecido Ribeiro de Souza. As sínteses e caracterizações foram realizadas no Instituto de Química da UFG, em Goiânia (GO).

### 4.3 CULTURA DE CÉLULA

As células MCF-7 foram mantidas em cultura em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e para MCF-10A o meio usado foi o HAM'S F12 suplementado com 5% de soro fetal equino, 1% de antibiótico, hidrocortisona (0,5 µg/ml), insulina (10 ng/ml) e fator de crescimento (20 ng/ml). Ambos os tipos celulares foram mantidos em estufa umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### 4.4 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

Uma quantidade inicial de células ( $4 \times 10^3/\text{cm}^2$ ) foi semeada em placas de poliestireno de 6, 24 ou 96 poços (TPP, EUA) e mantida sob condições de cultura celular. Transcorridas 24 ou 48 horas, as células foram tratadas com: (1)  $[\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4]$  livre e (2)  $(\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4)$  associado a nanopartículas de maghemita  $[\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4]$ , nas concentrações de 50, 200 e 300 µM de citrato de ródio ou (3) Magh-cit (nanopartículas de maghemita ativadas com citrato com  $2,3 \times 10^{16}$  partículas de ferro/mL), nas concentrações de 3 mM, 12 mM e 19 mM de Ferro.



## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS

Para a caracterização quanto à distribuição de diâmetro e de carga superficial das nanopartículas, utilizou-se o aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern). Este aparelho utiliza uma tecnologia denominada *Dynamic light scattering* (DLS), que permite estimar o diâmetro médio das partículas e a sua distribuição. Estas partículas suspensas no líquido estão em movimento browniano constante, como resultado da repulsão das moléculas do fluido. O movimento de partículas em concentrações muito baixas depende da viscosidade do líquido, da temperatura e do tamanho das partículas. Conhecendo a viscosidade e a temperatura, o tamanho das partículas pode ser calculado a partir de uma medição do movimento das partículas. Ao incidir um feixe de luz monocromática, como um laser, em uma solução com partículas esféricas em movimento browniano é provocado um deslocamento nas partículas, quando a luz as atinge, mudando o comprimento de onda da luz recebida e a posição com o tempo. A intensidade, em um determinado ponto do padrão de difração, varia com o tempo, devido à mudança de posição das partículas. Deste modo, as variações podem ser analisadas no domínio do tempo, através de uma função de correlação, e, medindo o coeficiente de difusão das partículas, é possível calcular a distribuição de tamanhos (Lucas *et al.*, 2001). Potencial Zeta é uma alteração que uma partícula adquire em um determinado meio. É dependente do pH, força iônica e concentração de um determinado componente. A mobilidade das partículas submetidas à eletroforese foi medida pela técnica de eletroforese de laser Doppler. Esta mobilidade eletroforética é então medida e convertida em potencial zeta (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK). O ensaio foi realizado na temperatura de 25°C. Foram utilizadas, nas análises, soluções de nanopartículas na concentração de 1:1000, em água ultrapura.

A caracterização morfológica e a mensuração das partículas foram obtidas a partir de MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão). As amostras dos compostos foram preparadas com a adição de 10 µL de 0,2% de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (0,153 mol/L 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).

#### 4.6 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE

O método utilizado para avaliar a viabilidade celular foi o método colorimétrico do brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), que é baseado 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 roxo de formazan, formados pela redução do MTT, são quantificados por técnicas de espectrofotometria (Husasain *et al.*, 1993). Após os períodos de tratamento (24 e 48 horas) das células, nas concentrações de 50, 200, 300 µM de citrato de ródio, o conteúdo dos poços - Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> , Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit (3 mM, 12 mM e 19 mM de Ferro) em meio de cultura, foi substituído por uma solução de meio contendo 0,5 mg/mL de MTT (5 mg/mL em 0,15 M de PBS (*Phosphate buffered saline*: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM; pH 7,4). Foram realizados tratamentos com os fármacos em poços vazios (sem células), seguindo as demais etapas do protocolo. Estes tratamentos em poços sem células teve como objetivo eliminar a interferência da coloração dos fármacos e meio na reação colorimétrica analisada no espectrofotômetro. Os valores destas análises foram utilizados como os “brancos” correspondente a cada tratamento e concentração, para posterior normalização dos resultados. As células foram incubadas por 2,5 horas em estufa

umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Em seguida, o meio de cultura com MTT foi removido e, logo, adicionados 200 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan formados. Estes cristais foram quantificados em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices) utilizando comprimento de onda de 595 nm. Para avaliar a viabilidade celular entre os grupos de células MCF-7 e MCF-10A tratadas [Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>], Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit] em relação ao controle não tratado foi realizada a análise de variância simples, ANOVA *one way*. Já para as análises entre as células ou entre as concentrações, o teste escolhido foi o *two way*. As diferenças significativas foram consideradas quando a probabilidade foi menor que 5% (p<0,05).

#### 4.7 ANÁLISE DE CITOCROMO C

As células (1 x 10<sup>4</sup>) foram plaqueadas em lamínulas estéreis previamente depositadas no fundo de cada poço da placa de 12 poços. Depois de receberem tratamentos [300 µM de citrato de ródio em Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>, 19 mM de Ferro de Magh-cit] por 24 horas ou 2 horas de 10 nM de paclitaxel (medicamento utilizado no tratamento de câncer que interfere no crescimento normal do microtúbulo) por para o grupo controle positivo, as células foram lavadas com PBS duas vezes, fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos, e permeabilizadas com 1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol (Triton-X 100) (0.1%) em PBS por 10 minutos. Reações inespecíficas foram bloqueadas com 3% de soro fetal bovino (SFB) em PBS por 30 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo, anti-citocromo c (1:200), em 3% de SFB por 2 horas a temperatura ambiente (TA), lavadas com PBS (3 vezes) e incubadas com 1:300 de anticorpo secundário IgG, IgA e IgM, conjugado com alexa-fluor 488 (emissão 488/excitação 535) em PBS por 40 minutos a

temperatura ambiente. Após lavagem, as células também foram incubadas com 0,5 g/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e red mitotracker (50 nm). As lâminas foram então montadas e visualizadas por microscopia confocal (Leica TCS SP5).

#### **4.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA**

A análise do ciclo celular foi realizada por marcação com iodeto de propídio. Essa marcação permite quantificar a fluorescência (citometria de fluxo) emitida pela intercalação com o DNA, que é variável em cada fase do ciclo celular. Esta metodologia também permite analisar as células que perderam DNA por fragmentação. Após a permeabilização da membrana, os fragmentos menores que 182 bp (pares de base) de DNA, saem da célula e o resultado é uma população de células com quantidade de DNA reduzida que é identificada no pico denominado sub G0/G1 a esquerda deste. As células ( $\sim 2 \times 10^5$ ) foram plaqueadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$ ) e tratadas com 300  $\mu$ M de citrato de ródio [Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>] e 19 mM de Magh-cit por 24, 36 e 48 horas. Posteriormente foram recolhidas através da tripsinização, colocadas em eppendorfs e centrifugadas (5 min à 3000 rpm) para remoção da tripsina e meio de cultura usado para neutralizar a enzima. Posteriormente foram resuspendidas em 1 ml de PBS gelado (pH 7,4). Foram novamente centrifugadas e incubadas com 200  $\mu$ L de RNase (50  $\mu$ g/mL em PBS) a 37°C por 30 minutos. Após centrifugação as células foram incubadas com 100  $\mu$ L de tampão de lise (10  $\mu$ g/mL 0,1% de citrato, 1% de triton X em PBS) por 10 minutos e posteriormente com 100  $\mu$ L de PI (50  $\mu$ g/mL) por 30 minutos a temperatura ambiente. O conteúdo de DNA (emissão em FL2 > 600 nm) celular foi

analisado no *Windows™ Flow Max* por citômetro de fluxo *CyFlow® space cytometer* (Partec). Para avaliar as possíveis diferenças de fragmentação de DNA entre os grupos tratados (Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit) em relação ao controle não tratado, foi realizada a análise de variância simples, ANOVA *one way*. Para a avaliar as diferenças estatística entre os dois grupos tratados (Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit) foi realizada a análise ANOVA, *two way*. Foram consideradas diferenças significativas, quando valores de p foram <0,05.

#### **4.9 ANÁLISE QUALITATIVA DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA**

TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-mediated dUDP-biotin nick-end labeling*) é usado em associação com uma enzima, para marcar DNA fragmentado. As células MCF-7, plaqueadas ( $1 \times 10^4$ ) em lamínulas previamente depositadas no fundo de cada poço da placa de 12 poços, foram tratadas por 48 horas com Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (300 µM de citrato de ródio) e Magh-cit (19 mM de Ferro). Posteriormente as células foram coletadas, fixadas em paraformaldeído a 4% por 1 hora, lavadas com PBS, permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 em citrato de sódio a 0,1% por 2 minutos no gelo, em seguida, incubadas com fluoresceína dUTP na presença de terminal deoxynucleotidyl transferase (Roche). Para os controles positivos, os grupos de células MCF-7 foram tratados com 10 U/mL de DNase (Invitrogen) em 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e 1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) por 10 minutos e para o controle negativo as células foram fixadas permeabilizadas e tratadas apenas com 50 µL por poço da solução de marcação TUNEL, sem a enzima terminal tranferase. A análise qualitativa da marcação do DNA fragmentado das células (fluorescência verde) foi realizada por microscopia confocal (excitação 488 nm e detecção 560 nm).

#### **4.10 ESTUDO DA ATIVIDADE DE CASPASE 6 E 7**

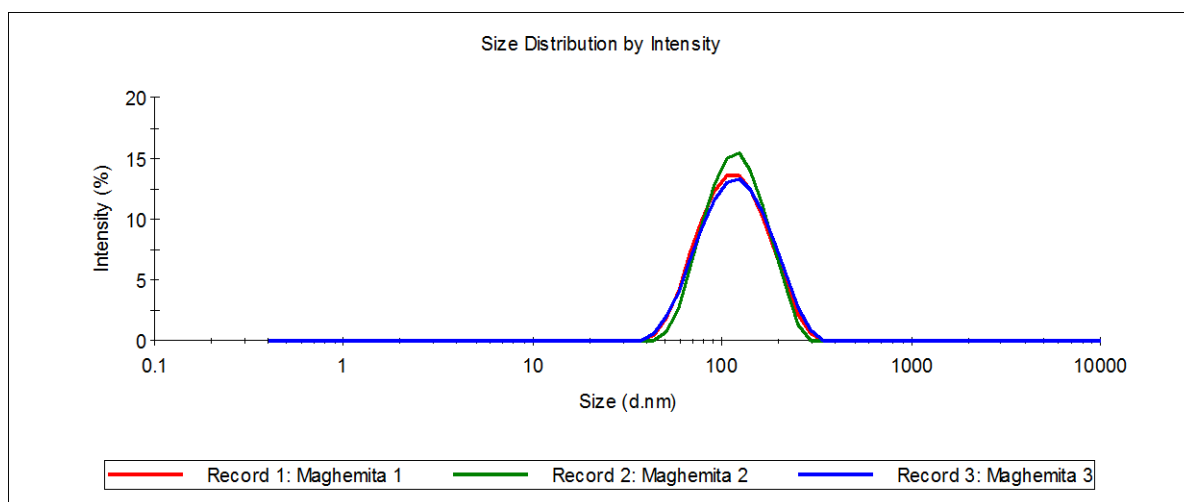
A atividade de caspases intracelulares em células MCF-7 foi avaliada utilizando kits de detecção de caspases (SR-DEVD-FMK para Caspase 3 e 7 e FAM-VEID-FMK para Caspase 6) após 24 horas de tratamento com 300  $\mu\text{M}$  de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit (19 mM) em células plaqueadas em lâminulas previamente depositadas no fundo de cada poço da placa de 12 poços. Foram removidos o meio e o fármaco das células ( $1 \times 10^5$ ) plaqueadas em placas de 12 poços. As células aderidas foram marcadas com FLICA 30 X (caspase 6 ou 7) em meio (1:30) por 1 hora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente o meio e o reagente residual foram removidos e foi feita a marcação do núcleo celular com 1,5  $\mu\text{L}$  Hoechst (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para 300  $\mu\text{L}$  de meio por 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com 1:10 da solução de limpeza contendo *PBS* do próprio kit por duas vezes e fixadas com 1:10 do fixador a base de formaldeído e metanol, que acompanha o reagente, em solução de limpeza. As lâminas foram montadas e analisadas em microscópio confocal em até 24 horas, sob excitação e emissão 490 e 520 nm respectivamente para a marcação de caspase 6 e excitação de 550 nm e emissão de 580 para a marcação de caspase 7.

### **5. RESULTADOS**

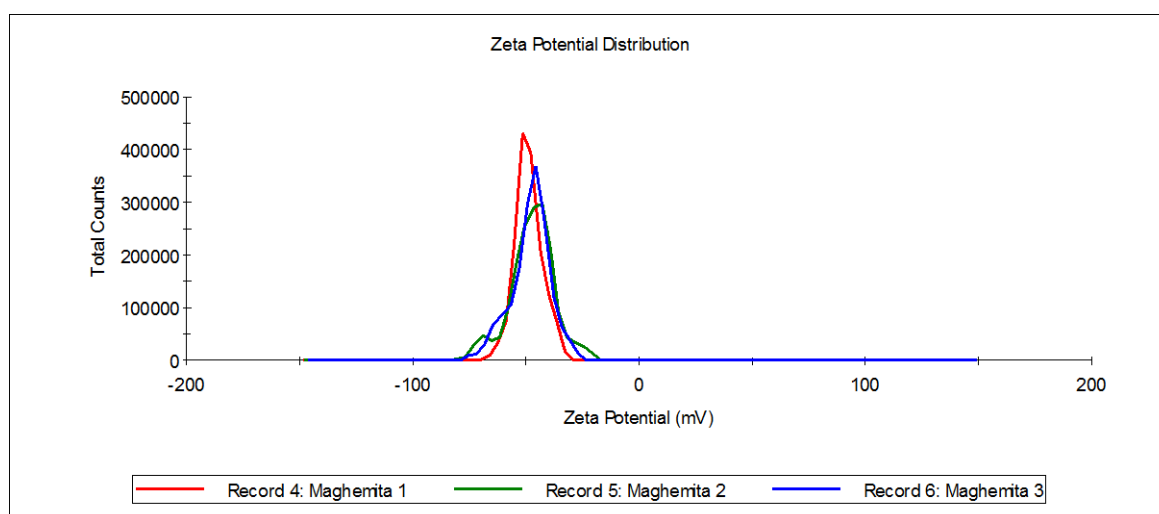
#### **5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS**

A diluição das soluções de nanopartículas em água deionizada para caracterização das composições foi de 1:100 e o pH da solução contendo nanopartícula de maghemita foi 6,7 e da Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>, 6,0.

O composto de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com ácido cítrico apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de  $107 \text{ nm} \pm 0,602$  (**Figura 3**), potencial zeta de superfície, ZP – 48 mV (**Figura 4**), com característica monodispersa com PDI (Índice de Polidispersão)  $0,137 \pm 0,011$  (**Figura 3**).

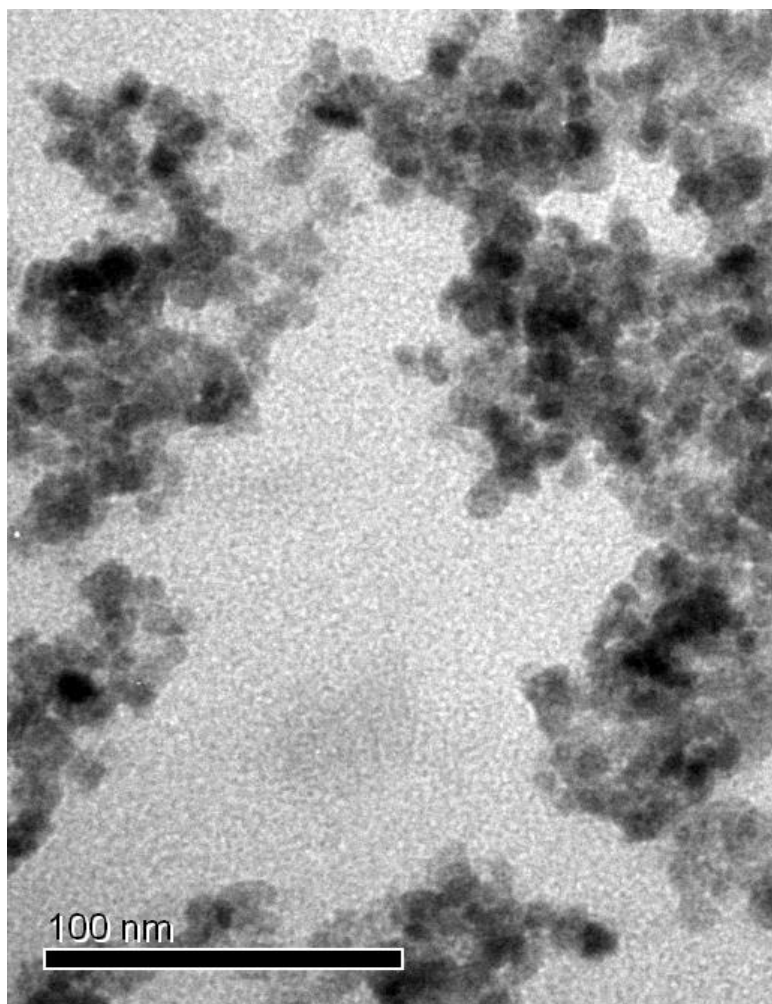


**Figura 3:** Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas (Magh-cit) em nanômetros, por intensidade. Os complexos apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de  $\sim 107 \text{ nm}$ . Cada experimento da triplicata foi identificado com uma cor (vermelho - maghemita 1, verde – maghemita 2 e azul – maghemita 3).



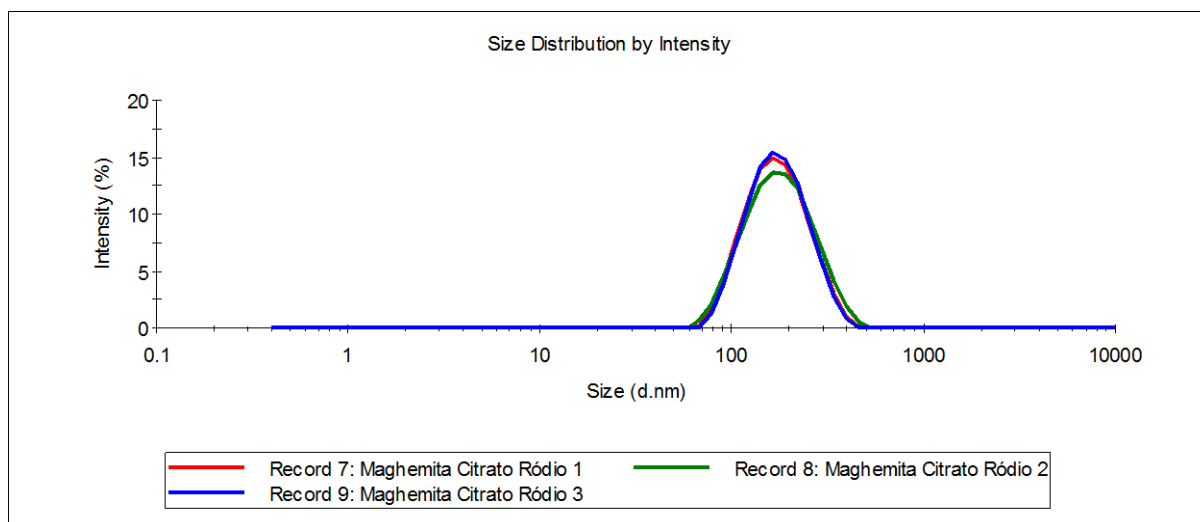
**Figura 4:** Distribuição do potencial zeta das nanopartículas (Magh-cit). A carga das superfícies das nanopartículas é negativa com potencial zeta de -48 mV. Cada experimento da triplicata foi identificado com uma cor (vermelho - maghemita 1, verde – maghemita 2 e azul – maghemita 3).

O composto de nanopartículas de maghemita associadas ao citrato de ródio apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de  $160,8 \text{ nm} \pm 0,1$  (**Figura 6**), potencial zeta de superfície, ZP –  $57,6 \text{ mV}$  (**Figura 7**), com característica monodispersa com PDI (Índice de Polidispersão)  $0,118 \pm 0,013$  (**Figura 6**). Agregados de nanopartículas apresentaram diâmetro modal de  $9 \text{ nm}$ , com morfologia esférica (**Figura 5**).

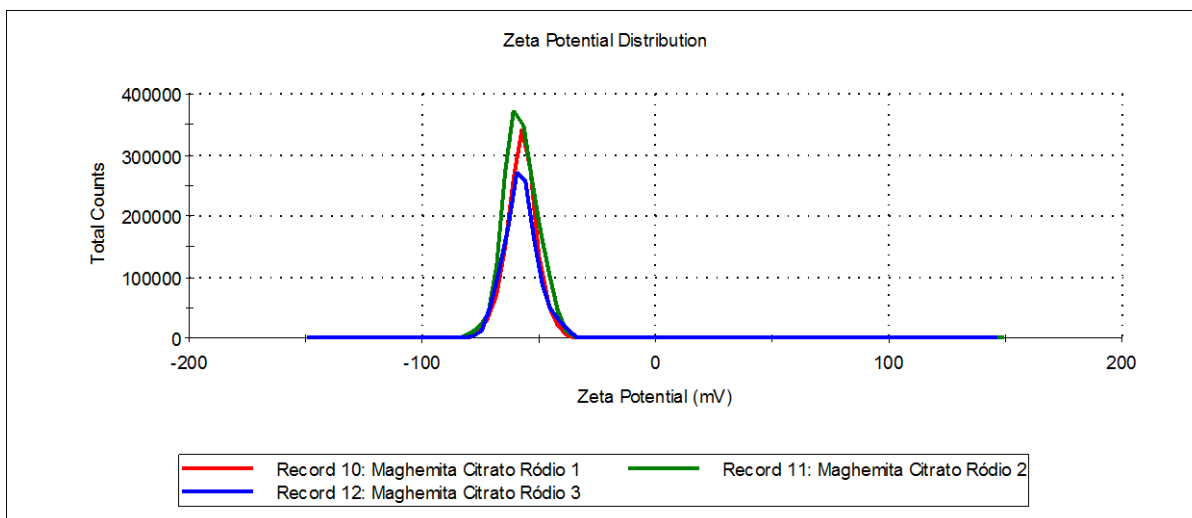


**Figura 5:** Micrografia de aglomerados de nanopartículas de  $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$  visualizados por microscopia eletrônica de transmissão.





**Figura 6:** Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas (Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>) em nanômetros. Os complexos apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de ~160,8 nm. Cada experimento da triplicata foi identificado com uma cor (vermelho - maghemita citrato de ródio 1, verde – maghemita citrato de ródio 2 e azul - maghemita citrato de ródio 3).

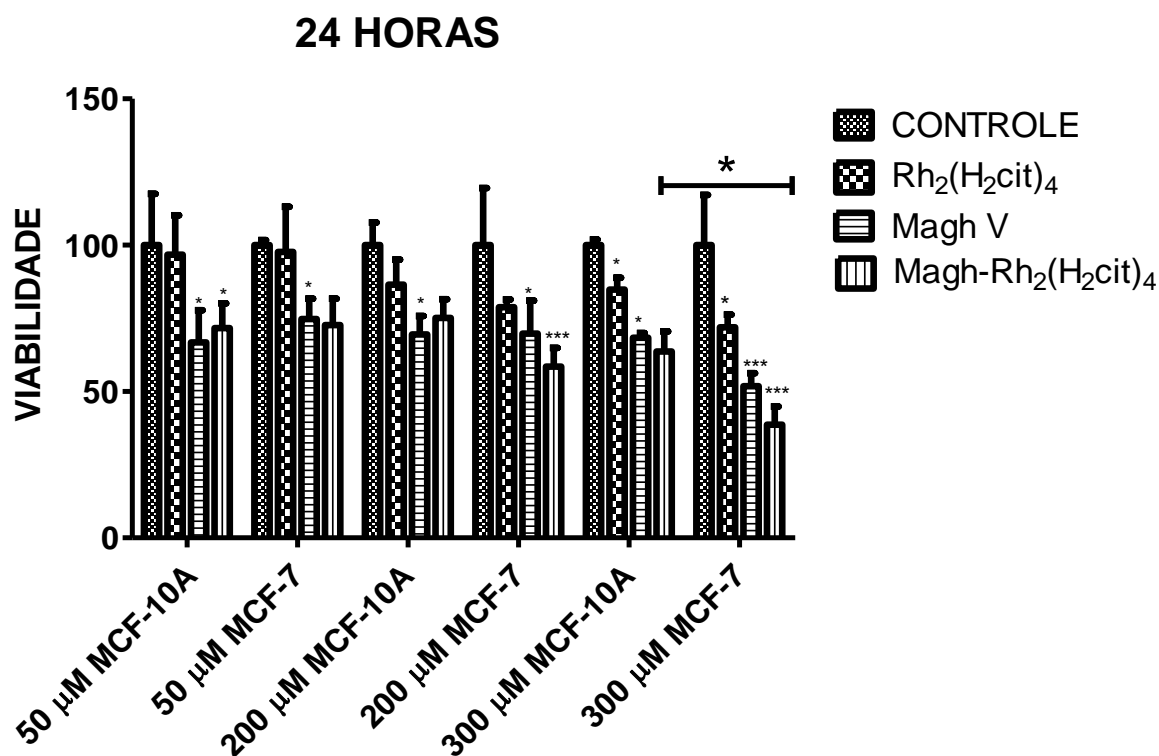


**Figura 7:** Distribuição do potencial zeta das nanopartículas (Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>). A carga das superfícies das nanopartículas é negativa com potencial zeta de -57,6 mV. Cada experimento da triplicata foi identificado com uma cor (vermelho - maghemita citrato de ródio 1, verde – maghemita citrato de ródio 2 e azul - maghemita citrato de ródio 3).

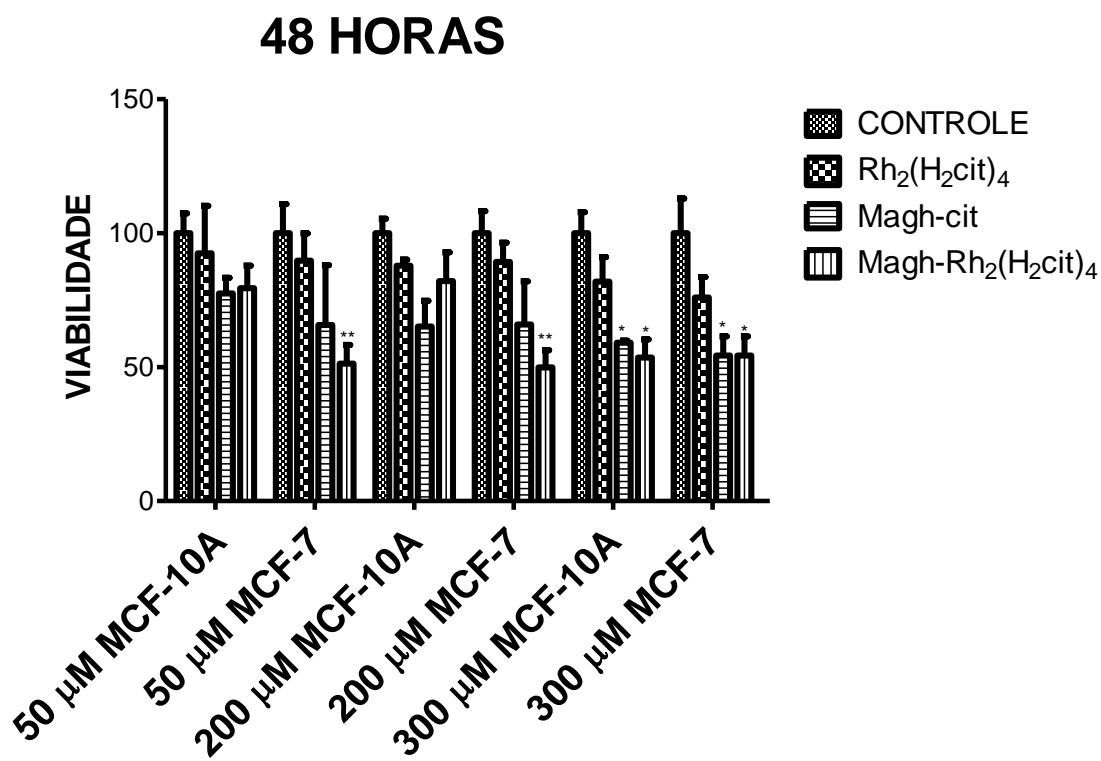
## 5.2 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE PELA AVALIAÇÃO DA DESIDROGENASE MITOCONDRIAL

Os compostos contendo citrato de ródio nanoparticulado com maghemita promoveram maior redução da viabilidade nas células avaliadas do que o citrato de ródio livre. Também a citotoxicidade promovida pelas nanopartículas mostrou-se mais específica para as células tumorais em relação ao controle, em algumas concentrações, após 24 e 48 horas de tratamento. Com 24 horas de tratamento, a menor concentração de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> avaliada (50 µM de citrato de ródio) mostrou-se citotóxica tanto para células tumorais como para células normais do epitélio mamário (**figura 8**). Nas concentrações de 200 e 300 µM (24 horas), a redução da viabilidade foi mais intensa em células de carcinoma mamário (**figura 8**). Comparadas as células MCF-10A, a redução da viabilidade promovida por 300 µM de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> em 24 horas mostrou-se significativa estatisticamente nas células MCF-7 (**figura 8**). Também houve redução da viabilidade de células tumorais tratadas com as nanopartículas de maghemita funcionalizadas apenas com o citrato. Este composto reduziu a viabilidade celular significativamente em ambas as linhagens e em todas as concentrações avaliadas em 24 horas de tratamento. Porém, com o equivalente de ferro de 200 e 300 µM de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (12 mM e 19 mM de Ferro, respectivamente), observou-se citotoxicidade, preferencialmente maior, em células tumorais, MCF-7 (**figura 8**). Em 48 horas de tratamento, a maghemita associada ao citrato, promoveu redução da viabilidade de células tumorais de forma significativamente estatística ( $p < 0,05$ ), na concentração de ferro (3 mM) equivalente a contida na maghemita associada ao citrato de ródio (50 µM). Na mesma concentração e tempo de tratamento, esse complexo não foi citotóxico para células MCF-10A (**figura 9**). Também não foi citotóxica para as células MCF-10A, a concentração

de 12 mM de ferro de Magh-cit que reduziu a viabilidade de células tumorais, enquanto 200  $\mu\text{M}$  (48 horas) de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> não foi citotóxica nessas células. Já na concentração de 300  $\mu\text{M}$  desse complexo foi conferida a citotoxicidade em células tumorais e normais da mama. O tratamento de Magh-cit de concentração comparável ao complexo de 300  $\mu\text{M}$  Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (19 mM de ferro) também foi citotóxico para as duas linhagens, em 48 horas de tratamento (figura 9).



**Figura 8:** Viabilidade celular em células epiteliais (MCF-10A) e células tumorais (MCF-7) da mama após 24 horas de tratamento. Os tratamentos utilizados foram: Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> livre e, associado a nanopartículas de maghemita [Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>] 0.153 mol/L de ferro nas concentrações de 50, 200 e 300  $\mu\text{M}$  de citrato de ródio ou nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato (Magh-cit) 0.173 mol/L de ferro com  $2.3 \times 10^{16}$  partículas de ferro/mL na concentração de 3 mM, 12 mM e 19 mM de ferro. P < 0,05: (\*); P < 0,01: (\*\*); e P < 0,001: (\*\*\*)

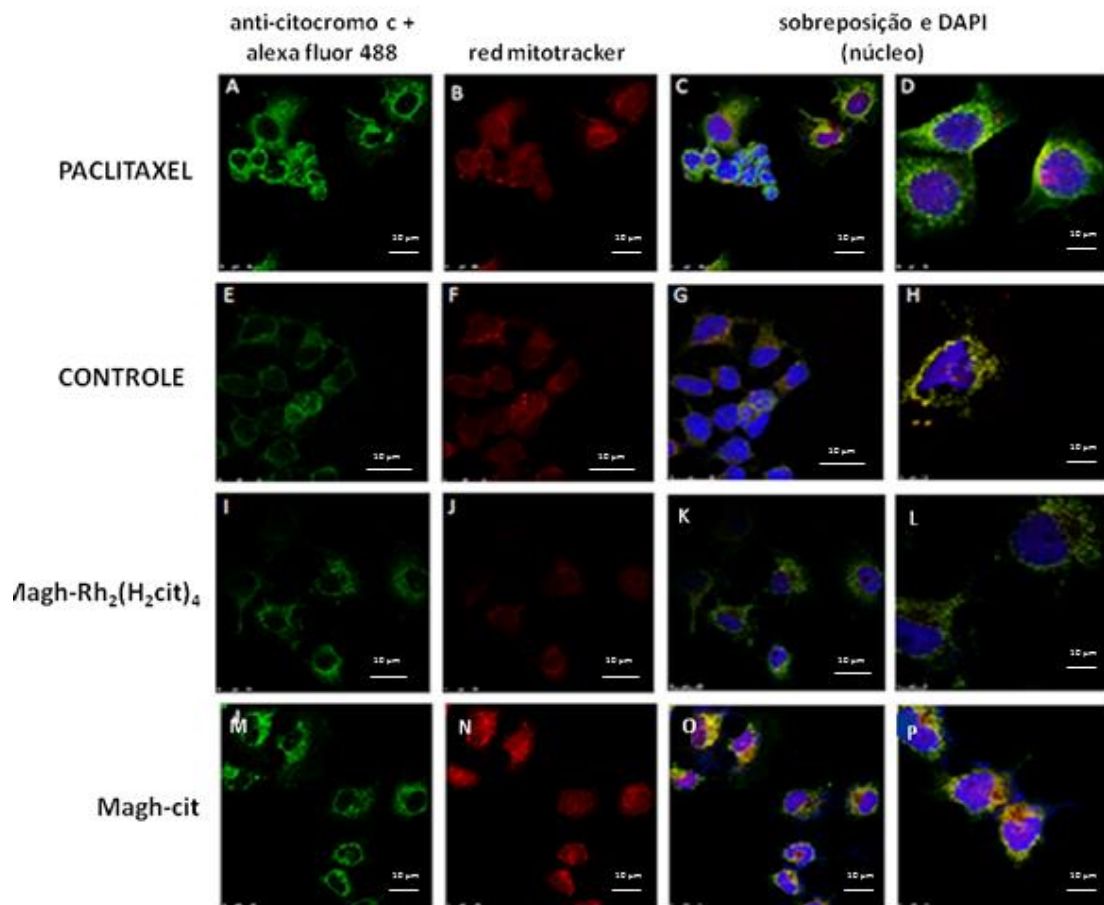


**Figura 9:** Viabilidade celular em células epiteliais (MCF-10A) e células tumorais (MCF-7) da mama após 48 horas de tratamento. Os tratamentos utilizados foram: Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> livre e, associado a nanopartículas de maghemita [Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>] 0.153 mol/L de ferro nas concentrações de 50, 200 e 300 µM de citrato de ródio ou nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato (Magh V) 0.173 mol/L de ferro com 2.3 × 10<sup>16</sup> partículas de ferro/mL na concentração de 3 mM, 12 mM e 19 mM de ferro. P < 0.05: (\*); P < 0.01: (\*\*).

### 5.3 ANÁLISE DE CITOCROMO C POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Essa análise teve como objetivo verificar ativação e translocação do citocromo c, em células MCF-7. No início do processo de apoptose quando há alteração do potencial de membrana mitocondrial, essa proteína deixa a mitocôndria deslocando-se para o citosol onde posteriormente participará da formação do apoptossomo. Nas células tratadas com 10 nM de paclitaxel por 2 horas (**figura 10A→D**), a marcação do citocromo c, em verde, predomina sobre a marcação mitocondrial (em vermelho). Essa observação é evidenciada

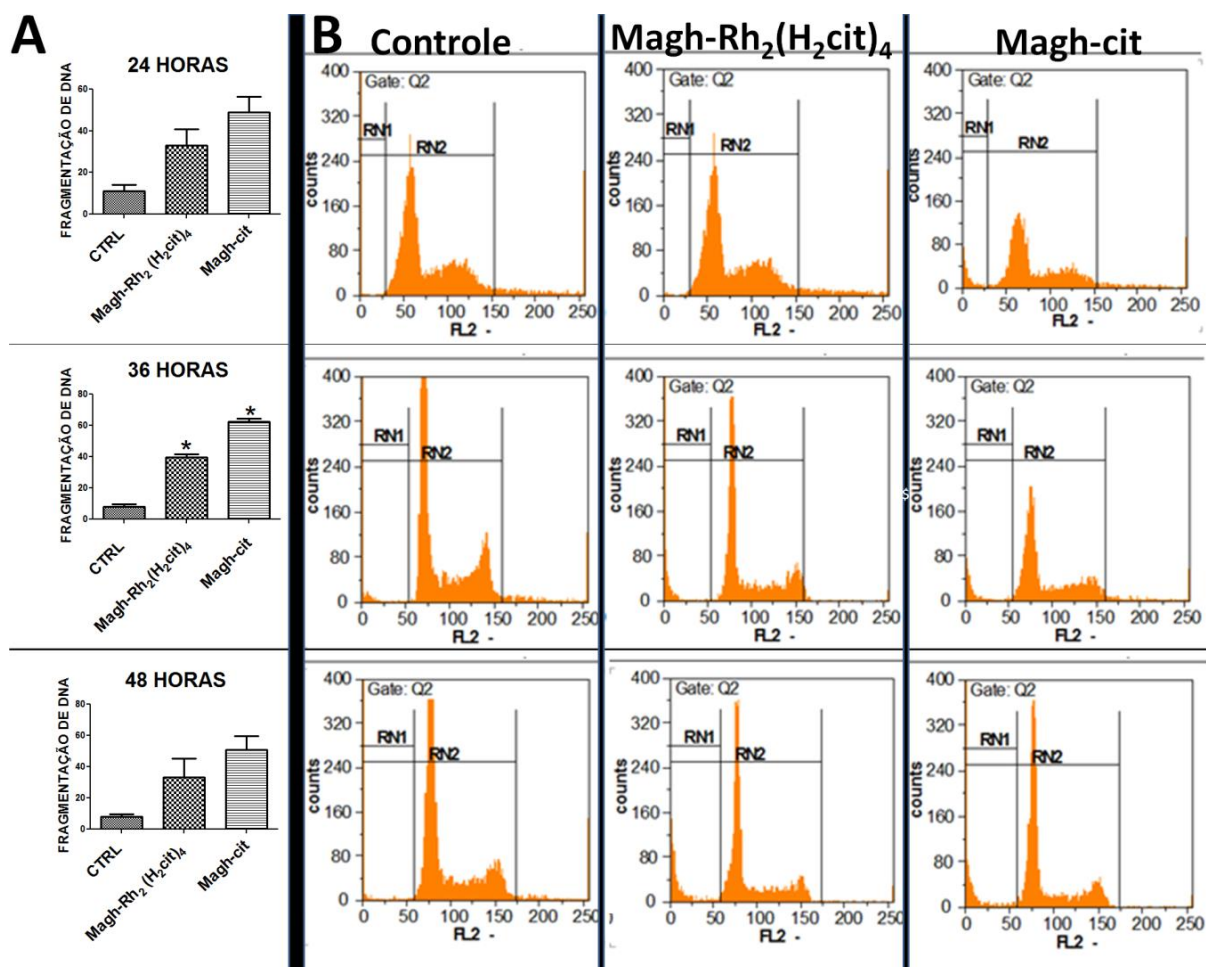
na sobreposição das imagens (**figura 10C e D**). Esse padrão sugere que as proteínas não estão mais confinadas dentro das mitocôndrias, indicando um passo essencial para o início da via intrínseca da apoptose está ativo nas células MCF-7. Nas células não tratadas, a marcação do citocromo c coincide com a marcação das mitocôndrias, apresentando uma composição fluorescente em amarelo na sobreposição das imagens (**figura 10G e H**). Com esse resultado é possível inferir que nas células não tratadas não há liberação espontânea de citocromo c. Nos grupos de células tratadas com 300  $\mu\text{M}$  de citrato de ródio em Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$  (**figura 10I→ L**) ou 19 mM de ferro de Magh-cit (**figura 10M→P**), por 24 horas, os resultados foram similares ao do controle positivo de células tratadas com paclitaxel. Portanto, baseado nos resultados, sugere-se que os tratamentos com 300  $\mu\text{M}$  (citrato de ródio) Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$  ou 19 mM de ferro de Magh-cit foram capazes de induzir a liberação de citocromo c para o citoplasma em células tumorais MCF-7.



**Figura 10:** Localização do citocromo c em células MCF-7. A identificação do citocromo c foi realizada através de marcação com anticorpo anti citocromo c e anticorpo secundário (alexa-fluor 488) em verde (A, E, I e N). As mitocôndrias foram marcadas com Red-mitotracker em vermelho (B, F, J e N). Para visualização do núcleo, foi feita a marcação com DAPI em azul. As células MCF-7 foram tratadas com 10 nm de paclitaxel por 2 horas (A, B, C e D), no grupo controle positivo. As células não tratadas formaram o grupo controle (E, F, G e H). Foi avaliado o tratamento com 300  $\mu$ M de citrato de ródio em Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (I, J, K e L) e 19 mM de ferro de Magh-cit (M, N, O e P). A translocação do citocromo c é definida na sobreposição das imagens (C, D, G, H, k, L, O e P).

## 5.4 ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA

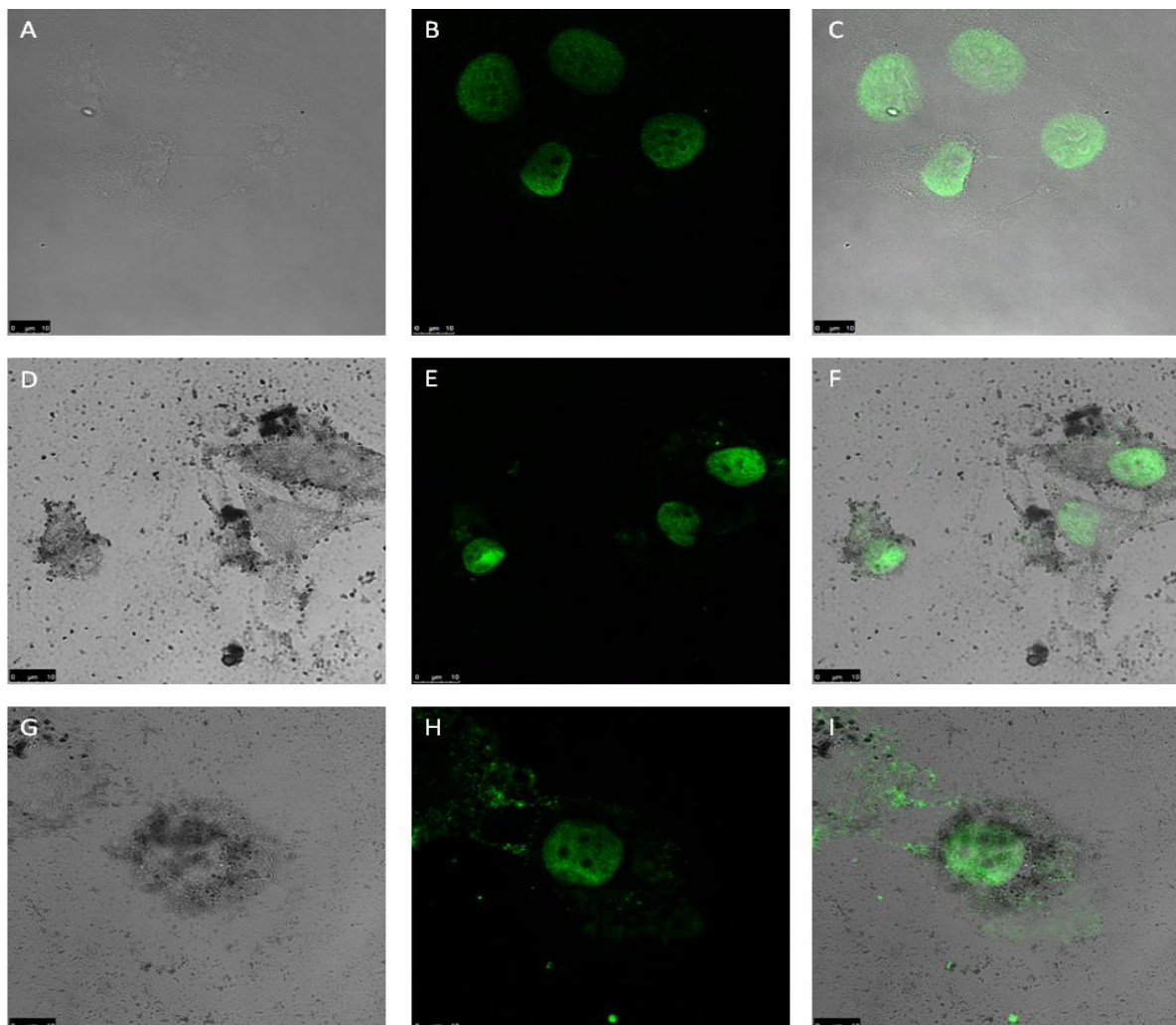
Em análise por citometria de fluxo, observou-se que as nanopartículas induziram a fragmentação de DNA em células MCF-7. A marcação de DNA fragmentado ocorreu em todos os tempos de tratamento (**figura 11RN1**). No entanto, o resultado da quantidade de fragmentação de DNA (**figura 11A**), só foi significativamente maior em relação ao controle após 36 horas de tratamento de 300  $\mu\text{M}$  (citrato de ródio) de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e 19 mM de ferro de Magh-cit, porém, não foi observada diferença estatísticas entre esses dois tratamentos.



**Figura 11:** Fragmentação de DNA por citometria de fluxo em células MCF-7. As células MCF-7 foram tratadas com 300  $\mu$ M (citrato de ródio) de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e 19 mM de ferro de Magh-cit por 24, 36 e 48 horas. O DNA fragmentado é identificado no pico sub GO/G1 (B: RN1) após marcação com iodeto de propídio (FL2). B/ RN2: DNA íntegro. O teste foi realizado em triplicata com 3 repetições. O histograma representa a média aproximada das três repetições. A: Análise estatística de fragmentação de DNA induzida por 300  $\mu$ M (citrato de ródio) de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub>, 19 mM de ferro de Magh-cit e controle (não tratado) por 24, 36 e 48 horas. (\*): P<0,05.

A marcação do TUNEL pela adição de dUTP catalisada pela terminal deoxynucleotidyl transferase, foi observada nos tratamentos de 300  $\mu$ M (citrato de ródio) Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (figura 12D → F) e 19 mM de ferro de Magh-cit (figura 12G→I) em 48 horas, com perfil de marcação similar ao do controle positivo (figura 12A→C), confirmando que os complexos metálicos testados induzem a fragmentação de DNA.



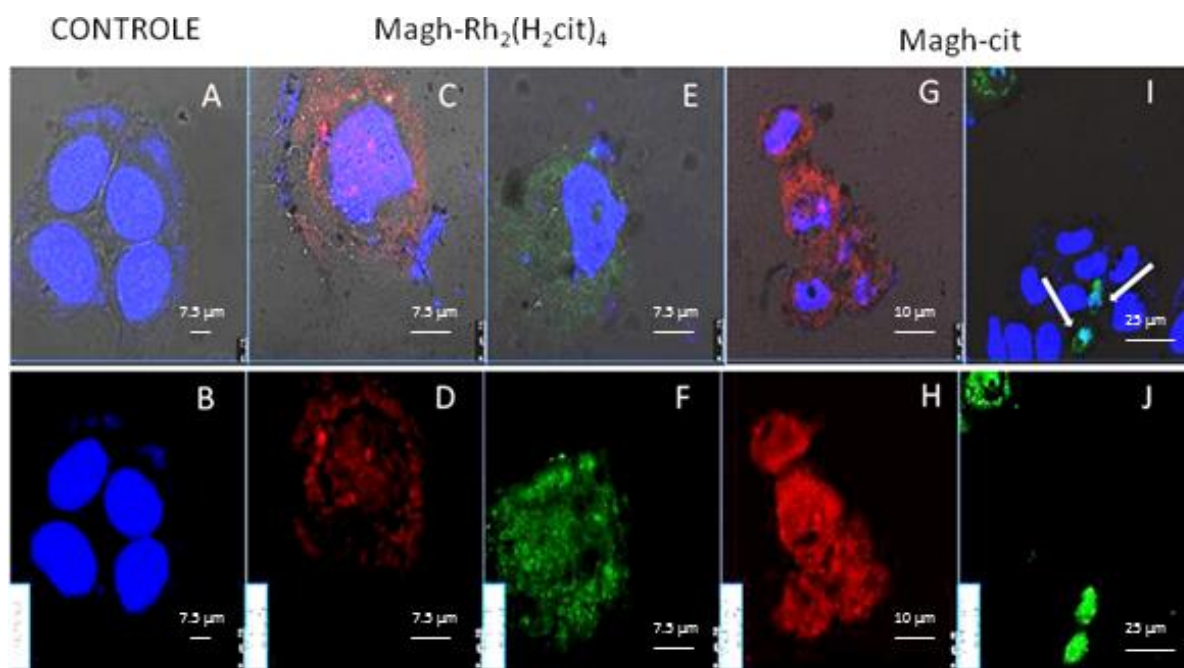


**Figura 12:** Análise de fragmentação de DNA por TUNEL em células MCF-7. O grupo controle positivo (A→C) foi tratado com 10 U/mL de DNase (Invitrogen) em 50 mM de Tris-HCL (pH 7,5) e 1 mg/mL de BSA por 10 minutos. As células MCF-7 também foram tratadas com 300  $\mu$ M (citrato de ródio) de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (D→F) e 19 mM de ferro de Magh-cit (G→I) por 48 horas. A, D e G: campo claro. B, E e H: Campo escuro (fluorescência). C, F e I: sobreposição do campo claro e fluorescência.

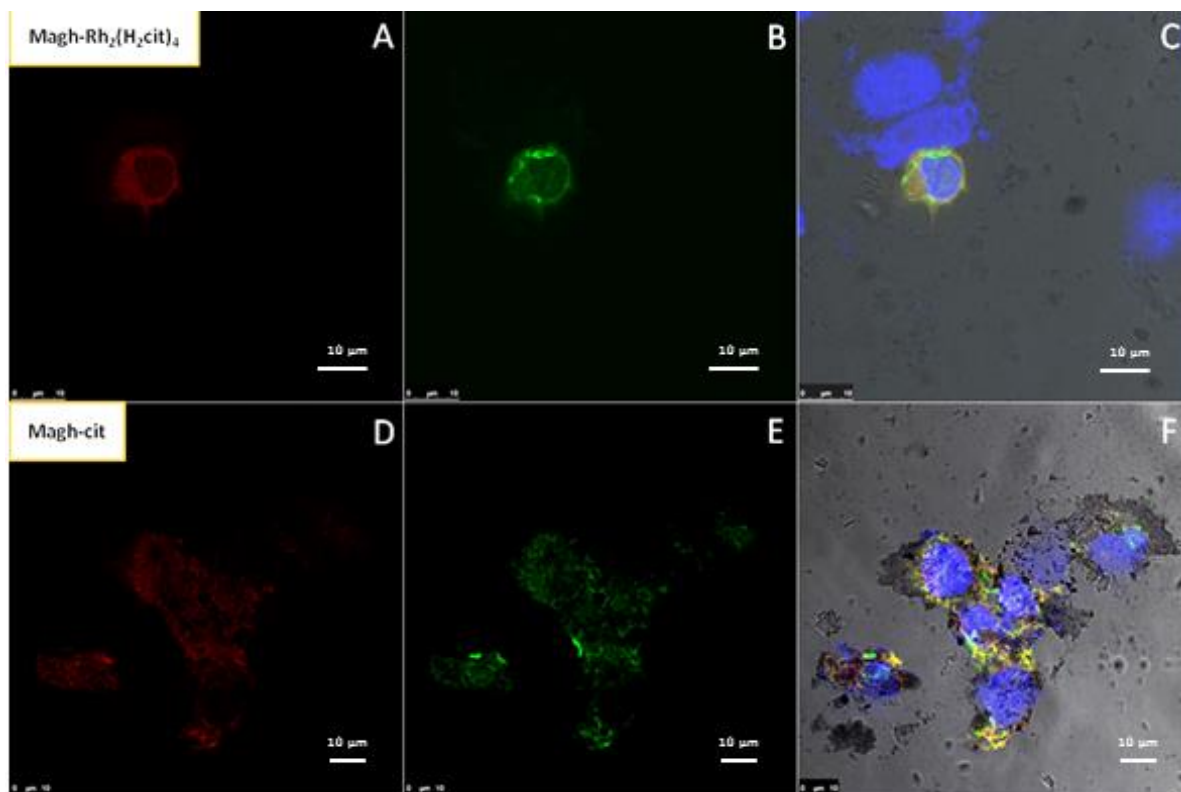
## 5.5 ESTUDO DA ATIVIDADE DE CASPASES 6 E 7

A análise de caspases efetoras (6 e 7) após 12 horas de tratamento com 300  $\mu$ M de citrato de ródio em Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (**figura 13C→F**) e 19 mM de ferro de Magh-cit (**figura 13G→J**) identificou a presença destas em suas formas ativas. A marcação fluorescente das caspases é acompanhada por outras características de células apoptóticas

como núcleo picnótico e difuso (**figura 13I**). Essas características nucleares (marcação com DAPI) indicam que a apoptose está envolvida na citotoxicidade promovida por estes complexos metálicos em células MCF-7. As células controles (não tratadas) não apresentaram marcação de caspases ativadas (**figura 14A e 14B**). Em análise realizada com ambas as marcações para os mesmos grupos celulares simultaneamente, submetidos aos mesmos tratamentos de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (**figura 14A→C**) e Magh-cit (**figura 14D→F**), indica-se que as caspases em questão são ativadas de forma associada, ou seja, não foi observado a presença de apenas uma caspase ativada individualmente.



**Figura 13:** Ativação de caspases. No grupo controle sem tratamento (A e B), a fluorescência azul corresponde apenas aos núcleos das células MCF-7 marcados com DAPI. Nas células tratadas com 300  $\mu$ M de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (C→F) e 19 mM de ferro de Magh-cit (G→ J) as caspases ativas 6 (E, F, I e J) em verde e 7 (C, D, G e H) em vermelho foram identificadas após 12 horas de tratamento. A, C, E, G e I: sobreposição de Campo claro e fluorescência. Setas indicam núcleos picnóticos característicos de apoptose. B, D, F, H, J: campo escuro (fluorescência).



**Figura 14:** Identificação de caspases efetoras simultaneamente. As células tumorais foram tratadas por 12 horas com 300  $\mu\text{M}$  de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> (A→C) e 19 mM de ferro de Magh-cit (D→F). A ativação das caspases 6 é representada pela fluorescência vermelha (B e E) e 7 representada pela fluorescência verde (A e D), imagens sobrepostas (C e E).

## 6. DISCUSSÃO

As nanopartículas de maghemita funcionalizadas com ácido cítrico apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 107 nm  $\pm$  0,602, carga negativa média, de potencial zeta (ZP) – 48 mV com característica monodispersa apresentando PDI (Índice de Polidispersão) de 0,137  $\pm$  0,011. As nanopartículas de maghemita, quando associadas ao citrato de ródio apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 160,8 nm  $\pm$  0,1, diâmetro modal de 9 nm, carga média (ZP) de – 57,6 mV, com característica monodispersa apresentando PDI de 0,118 $\pm$ 0,013.

Medições de potencial zeta proporcionam um critério importante para conferir a estabilidade de um sistema coloidal (Hunter, 1981). Os complexos metálicos analisados mostraram-se aniônicos, semelhantes a outros resultados de maghemita funcionalizadas com citrato (Paterno *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2011; Vaccari *et al.*, 2012). A regra geral para a estabilidade eletrostática da solução é a faixa de potencial zeta de - 30 mV a + 30 mV (Bedê, 2010). Se o potencial da solução estiver fora dessa faixa, então a solução pode ser considerada estável, como no caso dos resultados dos complexos estudados.

O diâmetro hidrodinâmico pode-se referir a aglomerados e não à nanopartículas isoladas. Vaccari e colaboradores (2012) verificaram, uma diferença entre o diâmetro das nanopartículas isoladas mensuradas por microscopia eletrônica (7,7 nm) e o diâmetro hidrodinâmico (62 nm), em nanopartículas magnéticas funcionalizadas com citrato, assim como no presente trabalho que obteve resultados de 9 nm de diâmetro modal e 160,8 nm de diâmetro hidrodinâmico para as nanopartículas de maghemita associada ao citrato de ródio (II).

A característica de monodispersão refere-se à uniformidade de tamanhos, formas ou massas das partículas. Valores do índice de polidispersão em torno de 0,1 caracterizam a amostra como monodispersa. Esta propriedade foi igualmente encontrada em outros trabalhos de caracterização de nanopartículas de maghemita, sem utilização de qualquer ferramenta de seleção de tamanho (Hyeon *et al.*, 2001; Vidal-vidal *et al.*, 2006). Essa é uma característica fundamental para produção de nanopartículas em aplicações biomédicas. Valores de polidispersão como os encontrados nesta análise (monodispersa) refletem a estreita distribuição de tamanhos e homogeneidade das nanopartículas, indicando uniformidade e controle do diâmetro do complexo.

Baseado nos resultados da avaliação de citotoxicidade promovida pelo  $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ , indica-se que este composto livre na concentração de até 200  $\mu\text{M}$  não promove redução da viabilidade de forma significativamente estatística em células de câncer de mama

Carneiro e colaboradores (2011) encontraram resultados semelhantes para essa concentração em 24 e 48 horas (viabilidade de 85 e 73%, respectivamente). Associando esse fármaco (citrato de ródio) a nanopartículas de maghemita, observou-se em nossos resultados uma redução da viabilidade celular, sendo essa maior em células tumorais (MCF-7) do que em células normais (MCF-10A), principalmente nas concentrações de 200  $\mu\text{M}$  (24 e 48 horas) e 300  $\mu\text{M}$  (24 horas). Em outro estudo, no qual se comparava 50  $\mu\text{M}$  de citrato de ródio livre ou associado a nanopartículas ( $3 \times 10^{15}$  partículas de ferro/mL) observou-se que a associação de nanopartículas de maghemita potencializou a ação citotóxica do citrato de ródio. Nesse trabalho, para essa mesma concentração de ferro, não foi relatada redução da viabilidade promovida pelas nanopartículas de maghemita, apenas funcionalizadas com citrato (Magh-cit) para as linhagens testadas, em 24, 48 e 72 horas (Carneiro *et al.*, 2011). Já no presente estudo foi identificada ação citotóxica significativa dessa nanopartícula, sendo a diferença estatística em relação ao controle maior em 24 horas de tratamento, na concentração de 19 mM de ferro ( $2,4 \times 10^{16}$  partículas de ferro/ml), para células MCF-7. No entanto essa citotoxicidade não foi estatisticamente maior que os valores encontrados para a Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ .

Os resultados de citotoxicidade em MCF-7 promovidos pela Magh-cit em nosso trabalho pode ser explicado pelo maior número de partículas de ferro por ml ( $2,4 \times 10^{16}$ ) presente em nosso composto comparado ao composto testado no estudo referido. Mesmo sendo biocompatíveis, os compostos contendo ferro, podem estar associados à citotoxicidade

celular mediada principalmente por mecanismos redox, que causam estresse oxidativo (Jungwirth *et al.*, 2011). Auffan e colaboradores (2008) verificaram que nanopartículas de magnetita foram completamente oxidadas em maghemita, induzindo toxicidade em *E. coli*. Portanto, o potencial citotóxico da nanopartícula associada ao citrato deve ser levado em consideração. Os resultados dos ensaios de viabilidade em 48 horas indicam que os nanocompostos estudados não promoveram redução de viabilidade intensificada quando comparada a redução de viabilidade em 24 horas de tratamento nas concentrações avaliadas. A partir dessa observação é possível inferir que a citotoxicidade promovida pelas nanopartículas não é tempo-dependente.

Os compostos Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit nas concentrações de 300 µM (citrato de ródio) e 19 mM de ferro respectivamente em 24 horas, induziram a liberação de citocromo c. Esse evento é característico da morte celular por apoptose via mitocôndria. A ativação e a dispersão do citocromo c é um estágio inicial desse processo, que resulta da alteração do potencial de membrana da mitocôndria (Slee *et al.*, 1999). Apesar da linhagem tumoral testada não expressar caspase 3, caracterizando-a como células resistentes a apoptose (Jänicke, 2009), alguns fármacos são capazes de induzir esse tipo de morte celular. Xue e colaboradores (2003) concluíram que a estaurosporina induz apoptose nesse tipo celular, acompanhada de ativação de citocromo c, porém não estão presentes todas as alterações mitocondriais inerentes desse processo, sugerindo assim que a caspase 3 pode ser essencial para mediar as demais modificações (Slee *et al.*, 2001). Nos estudos de Narvaez & Welsh (2001), tal modificação mitocondrial não se mostrou dependente da ativação de caspases. Sugerem ainda Li e colaboradores (1998) que a caspase-8 pode também clivar Bid (um domínio BH3 contendo membros proapoptóticos da família Bcl-2) para sua forma truncada

(tBid). Translocação de tBid para a mitocôndria induz liberação mitocondrial de citocromo c e subsequente ativação de caspase 9, amplificando assim o sinal de morte. Nossos resultados corroboram a hipótese da independência da caspase 3 para a dispersão de citocromo c de dentro da mitocôndria para o citoplasma, induzida por Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit.

Além do citocromo c, outro marcador apoptótico, a ativação de caspases, foi encontrado após tratamento por 12 horas de 300 µM de Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e contendo 19 mM de ferro de Magh-cit.

As caspases, uma família de proteases de cisteína, são parte integrante da fase de execução da morte celular programada. As caspases iniciadoras 2, 8, 9 e 10 são primeiramente induzidas a oligomerização, levando a atividade autocatalítica e subsequente clivagem das caspases efetoras. O estresse celular, mediado por luz ultravioleta, pode iniciar a apoptose mitocondrial através da liberação do citocromo c (Hakem *et al.*, 1998). Na via iniciada pela caspase-9, o citocromo c citoplasmático desencadeia a formação do apoptossomo, que é um complexo de multi-proteínas contendo citocromo c, dATP, Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) e pro-caspase-9 (Li *et al.*, 1997; Saleh *et al.*, 1999). Os estudos realizados por Ferguson e colaboradores (2003) revelaram que, além da translocação de citocromo c, também foi observada ativação de caspase efetora (caspase 7) no tratamento com radiação ultravioleta em células MCF-7. O fato de células MCF-7 serem induzidas, morfológica e fisiologicamente, a apoptose, sugere a presença de uma via alternativa para a sua iniciação. Foi proposto que as caspases iniciadoras com prodomínios longos, tais como caspase 8 ou 9, podem levar à ativação de apoptose através da ativação não só de caspase 3, mas também de caspase 7 (Fraser & Evan, 1996; Cohen, 1997). Os

resultados do nosso estudo permite inferir que esta caspase é ativada em células MCF-7 tratada com os compostos metálicos estudados.

Outra caspase importante na cascata da apoptose, que também foi identificada nesse trabalho em sua forma ativa, é a caspase 6. Esta é a responsável pela clivagem das lâminas nucleares, desencadeando assim, a morte celular (Orth *et al.*, 1996). A inibição de caspase 6, protegeu da apoptose células MCF-7 tratadas com neocarzinostatina (NCS), um agente anti-mitótico (Liang *et al.*, 2001).

Baseado nessas informações, a identificação da ativação das caspases efetoras 6 e 7 em nossos estudos permite considerá-las candidatas a mediadoras importantes de alterações apoptóticas decorrente do tratamento com Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit. Porém, necessita-se de testes confirmatórios para confirmação dessa hipótese, como a análise desses eventos após a inibição dessas caspases.

As células de carcinoma mamário da linhagem MCF-7 não expressam caspase 3 como resultado de uma deleção do par de bases 47 dentro do exon 3 do gene casp-3. A deleção resulta no salto do exon 3 durante o splicing pré-mRNA e, assim, bloqueia a tradução do mRNA casp-3 (Jänicke *et al.*, 1998).

A degradação do DNA nuclear em unidades nucleosomais é uma das características da morte celular por apoptose. Este processo ocorre em resposta a vários estímulos apoptóticos em uma ampla variedade de tipos de células. A caracterização molecular do processo identificou uma DNase específica (CAD, caspase-activated DNase), que cliva o DNA cromossômico de um modo dependente de caspase. CAD é sintetizada com a ajuda de ICAD (inibidor da CAD), que funciona como um acompanhante específico para CAD. CAD é encontrado complexado com ICAD na proliferação das células. Quando as



células são induzidas à apoptose, as caspases, em particular caspase 3, cliva ICAD desassociando o complexo CAD-ICAD, liberando CAD para clivar o DNA cromossômico (Nagata, 2000).

Além de UV, estaurosporina, fator de necrose tumoral (TNF) e vários outros agentes que danificam o DNA, são listados como indutores de apoptose em células MCF-7 (Jänicke, 1998; Jänicke *et al.*, 2001 ). No entanto essa morte ocorre na ausência de fragmentação de DNA. Segundo Jänicke (2009), para ocorrência desse evento específico, é essencial a ativação da caspase 3. Os resultados de nossos estudos mostram que o citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita e a nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato induzem a fragmentação de DNA em células MCF-7, após análise das marcações de DNA com PI por citômetro de fluxo complementada por imagens de microscopia confocal da marcação por TUNEL. Mc Gee e colaboradores (2002) também demonstraram a ocorrência de fragmentação de DNA pelo método de marcação por TUNEL nesse tipo celular, após tratamento com um membro de pyrrolo-1,5-benzoxazepines, PBOX-6. Nesse estudo, a ocorrência de fragmentação era suprimida com a inibição de caspase 7, sugerindo que na ausência da caspase 3, outra caspase efetora pode ser a principal mediadora da fragmentação de DNA. Essa pode ser também a explicação para o mecanismo de ocorrência de fragmentação de DNA na ausência de caspase 3, induzida por Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit em células MCF-7. Liang e colaboradores (2001) também verificaram a ocorrência de fragmentação de DNA em células MCF-7 após tratamento com neocarzinostatina. Usando uma série de inibidores de caspases com especificidades sobrepostas, enzimas específicas de substratos cromogênicos e um anticorpo específico para

a caspase 7 ativada, este grupo concluiu que, no tratamento testado nessa linhagem, a ocorrência da apoptose depende das caspases 9, 7 e 6.

Além da hipótese que cogita outras caspases efetoras como mediadoras de fragmentação de DNA, há estudos que sustentam a indução de apoptose na ausência de caspases (Fehsel *et al.*, 1995; Pozo-Guisado *et al.*, 2005). Em testes com resveratrol (RES), uma molécula quimiopreventiva, foi observada a fragmentação de DNA em células MCF-7 mesmo com inibição de caspases, sugerindo assim, um mecanismo de apoptose independente de caspase mediado por Bcl-2 levando a perda de potencial de membrana mitocondrial e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Pozo-Guisado *et al.*, 2005).

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos principais resultados, conclui-se que:

- 1) Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit, foram citotóxicas para células tumorais.
- 2) Os compostos metálicos utilizados [Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit] são capazes de induzir alterações morfológicas características da apoptose na ausência de caspase 3 como: ativação e translocação do citocromo c, ativação de caspases e fragmentação de DNA.

A ocorrência do conjunto de eventos apoptóticos encontrado sugere uma ativação atípica da indução do processo de apoptose em células MCF-7, pois, esses eventos acontecem na ausência da caspase 3.

Portanto, os mecanismos de ocorrência de fragmentação de DNA, assim como de outros eventos sinalizadores de apoptose que ocorrem na ausência de caspase 3 induzida por Magh-Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>cit)<sub>4</sub> e Magh-cit, devem ser investigados, a fim de se mapear a ação citotóxica do fármaco em questão e possibilitar a sua síntese cada vez mais eficaz para o tratamento de câncer de mama.

## 8. REFERÊNCIAS

Alexis, F., J. W. Rhee, et al. (2008). New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, Elsevier.

Arruebo, M., R. Fernández-Pacheco, et al. (2007). "Magnetic nanoparticles for drug delivery." Nano Today 2(3): 22-32.

Auffan, M., W. Achouak, et al. (2008). "Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward Escherichia coli." Environmental science & technology 42(17): 6730-6735.

Barros, A., E. M. Barbosa, et al. (2001). "Diagnóstico e tratamento do câncer de mama." São Paulo: Associação Médica Brasileira/Brasília: Conselho Federal de Medicina.

Bear, J., E. Zysk, et al. (1986). Precious Metals 1985: Proceedings of the Ninth International Precious Metals Conference, Zysk, ED, Bonucci, J. A., Eds.

Bedê, P. M. "Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomédica". 2010, 73f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Militar de Engenharia. 2010.

Bosslet, K., R. Straub, et al. (1998). "Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy." Cancer research 58(6): 1195-1201.

Boven, E., W. J. F. van der Vijgh, et al. (1985). "Comparative activity and distribution studies of five platinum analogues in nude mice bearing human ovarian carcinoma xenografts." Cancer research 45(1): 86-90.

Carneiro, M. L. B, E. S. Nunes, et al. (2011). "Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy." Journal of nanobiotechnology 9(1): 11.

Carneiro, M. (2011). "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*". 130f. tese (doutorado) – Universidade de Brasília. 2011.

Chandler, J. M., G. M. Cohen, et al. (1998). "Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver." Journal of Biological Chemistry 273(18): 10815-10818.

Chen, F., V. Vallyathan, et al. (2001). "Cell apoptosis induced by carcinogenic metals." Molecular and Cellular Biochemistry 222(1): 183-188.

Chifotides, H. T. and K. R. Dunbar (2005). "Interactions of metal-metal-bonded antitumor active complexes with DNA fragments and DNA." Accounts of chemical research **38**(2): 146-156.

Chinnaiyan, A. M., K. Orth, et al. (1996). "Molecular ordering of the cell death pathway." Journal of Biological Chemistry **271**(9): 4573-4576

Clarke, M. and M. Stubbs (1996). "Interactions of metallopharmaceuticals with DNA." Metals in biological systems **32**: 727-780.

Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochemical Journal **326**(Pt 1): 1-16.

CTSU (Clinical Trial Service Unit), Radcliffe Infirmary (RI). (2005). "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." Lancet **365**: 1687-1717.

Das, M., C. Mohanty, et al. (2009). "Ligand-based targeted therapy for cancer tissue." Expert opinion on drug delivery **6**(3): 285-304.

Eck-Enriquez, K., M. E. N. D. T. A. G. Kiefer, et al. (2000). "Pathways through which a regimen of melatonin and retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells." Breast cancer research and treatment **61**(3): 229-239.

Erck, A., L. Rainen, et al. (1974). Studies of rhodium (II) carboxylates as potential antitumor agents. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY), Royal Society of Medicine. **145**(4): 1278-1283.

Fehsel, K., K. D. Kroncke, et al. (1995). "Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes." The Journal of Immunology **155**(6): 2858-2865.

Ferguson, H. A., P. M. Marietta, et al. (2003). "UV-induced Apoptosis Is Mediated Independent of Caspase-9 in MCF-7 Cells a model for cytochrome c resistance." Journal of Biological Chemistry **278**(46): 45793-45800.

Fischer, U., R. Jänicke, et al. (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." Cell Death & Differentiation **10**(1): 76-100.

Fossati, R., C. Confalonieri, et al. (1998). "Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: a systematic review of published randomized trials involving 31,510 women." Journal of Clinical Oncology **16**(10): 3439-3460.

Fraser, A. and G. Evan (1996). "A license to kill." Cell **85**(6): 781-784.

Ghobrial, I., T. Witzig, et al. (2005). "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy." CA: A Cancer Journal for Clinicians **55**(3): 178-194.

Grivicich, I; Regner, A; Rocha, A.D (2007). "Morte Celular por Apoptose." Revista brasileira de Cancerologia, **53**(3): 335-343.

Guan, Y. Q., Z. Li, et al. (2012). "Cell cycle arrest and apoptosis of OVCAR-3 and MCF-7 cells induced by co-immobilized TNF- $\alpha$  plus IFN- $\gamma$  on polystyrene and the role of p53 activation." Biomaterials. **33**(26): 6162-6171.

Hakem, R., A. Hakem, et al. (1998). "Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo." Cell **94**(3): 339-352.

Hughes, R., J. Bear, et al. (1972). "Synergistic effect of rhodium (II) acetate and anabinosylcyto-sine on L210". Proc. Am. Assoc. Cancer Res **13**:120.

Hunter, R.J. (1981) "Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications " Academic Press, London.

Hussain, R., A. Nouri, et al. (1993). "A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay." Journal of immunological methods **160**(1): 89-96.

Hyeon, T., S. S. Lee, et al. (2001). "Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process." Journal of the American Chemical Society **123**(51): 12798-12801.

Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." Nature Reviews Cancer **2**(4): 277-288.

Instituto Nacional de Câncer, Brasil, (2011). Atlas da Mortalidade. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>. Acesso em: 8 dezembro.

Instituto Nacional de Câncer, Brasil, (2012). Incidência do câncer no Brasil 2012. Síntese de resultados e comentários. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>, Acesso em 2012 jun.

Jain, R. K. (1987). "Transport of molecules in the tumor interstitium: a review." Cancer research **47**(12): 3039-3051.

Jänicke, R. U., P. Ng, et al. (1998). "Caspase-3 is required for  $\alpha$ -fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis." Journal of Biological Chemistry **273**(25): 15540-15545.

Jänicke, R. U., I. H. Engels, et al. (2001). "Ionizing radiation but not anticancer drugs causes cell cycle arrest and failure to activate the mitochondrial death pathway in MCF-7 breast carcinoma cells." Oncogene **20**(36): 5043-5053.

- Jänicke, R. U. (2009). "MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3." Breast cancer research and treatment **117**(1): 219-221.
- Jemmerson, R. and X. Wang (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." Cell **86**: 147-157.
- Jungwirth, U., C. R. Kowol, et al. (2011). "Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes." Antioxidants & redox signaling **15**(4): 1085-1127.
- Keppler, B. K. (1993). Metal complexes in cancer chemotherapy, Wiley-VCH, Weinheim: 187-220
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzler, et al. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science **275**(5303): 1132-1136.
- Laurent, S., S. Dutz, et al. (2011). "Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles." Advances in colloid and interface science **166**(1): 8-23.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**(4): 491-502.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-490.
- Liang, Y., C. Yan, et al. (2001). "Apoptosis in the absence of caspase 3." Oncogene **20**(45): 6570-6578.
- Lucas, E. F., B. G. Soares, et al. (2001). Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica, Editora E-papers.
- Martinvalet, D., D. M. Dykxhoorn, et al. (2008). "Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death." Cell **133**(4): 681-692.
- Marzo, I., S. A. Susin, et al. (1998). "Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function." FEBS letters **427**(2): 198-202.
- Mc Gee, M. M., E. Hyland, et al. (2002). "Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1, 5-benzoxazine, PBOX-6." FEBS letters **515**(1): 66-70.
- McGill, G. and D. E. Fisher (1997). "Apoptosis in tumorigenesis and cancer therapy." Front Biosci **2**: 353-379.

Medema, J., R. Toes, et al. (1997). "Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis." European journal of immunology **27**(12): 3492-3498.

Merry, D. and S. Korsmeyer (1997). "Bcl-2 gene family in the nervous system." Annual review of neuroscience **20**(1): 245-267.

Nagata, S. (2000). "Apoptotic DNA fragmentation." Experimental cell research **256**(1): 12-18.

Narvaez, C. J. and J. E. Welsh (2001). "Role of mitochondria and caspases in vitamin D-mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells." Journal of Biological Chemistry **276**(12): 9101-9107.

Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends in biochemical sciences **22**(8): 299-306.

NIH. Consensus statements (2000): "114, adjuvant therapy for breast cancer". Disponível em: <http://consensus.nih.gov/2000/2000AdjuvantTherapyBreastCancer114html.htm>. Acesso 2012 dezembro.

Oberhammer, F., J. Wilson, et al. (1993). "Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation." The EMBO Journal **12**(9): 3679-3684.

Orth, K., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A." Journal of Biological Chemistry **271**(28): 16443-16446.

Özgür, E., U. Mert, et al. (2012). "Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells." Clinical and Experimental Medicine: 1-8.

Pankhurst, Q. A., J. Connolly, et al. (2003). "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine." Journal of physics D: Applied physics **36**(13): R167-R181.

Pasqualini, J. R. (2002). "Mechanism Involved in Carcinogenesis of the Breast" in: Breast cancer: prognosis, treatment, and prevention, Nova York, Informa Healthcare.

Paterno, L. G., M. A. G. Soler, et al. (2009). "Layer-by-layer assembly of bifunctional nanofilms: Surface-functionalized maghemite hosted in polyaniline." The Journal of Physical Chemistry C **113**(13): 5087-5095.

Peixoto, R. 2012. "Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita em modelo experimental de câncer de mama". 106f. dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília. 2012.



- Persidis, A. (1999). "Cancer multidrug resistance." Nature Biotechnology **17**(1): 94-95.
- Porter, A. G. and R. U. Jänicke (1999). "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis." Cell death and differentiation **6**(2): 99-104.
- Pozo-Guisado, E., J. M. Merino, et al. (2005). "Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF- $\kappa$ B." International journal of cancer **115**(1): 74-84.
- Rafique, S., M. Idrees, et al. (2010). Transition metal complexes as potential therapeutic agents." Biotech. Mol. Biol. Rev **5**: 38-45.
- Rao, P. N., M. L. Smith, et al. (1980). "Rhodium (II) butyrate: a potential anticancer drug with cell cycle phase-specific effects in Hela cells." Journal of the National Cancer Institute **64**(4): 905-912.
- Richie, R. C. and J. O. Swanson (2003). "Breast cancer: a review of the literature." Journal of insurance medicine - New York then denver- **35**(2): 85-101.
- Ries, F. and Klastersky. J. (1986). "Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity." Am J Kidney Dis **8**(5): 368-379.
- Rosenberg, B. and Vancamp, L. (1969). "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents." Nature **222**: 385-386.
- Rudin, C.M and Thompson, C.B. (1997). "Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death." Annual review of medicine **48**(1): 267-281.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, et al. (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." Journal of Biological Chemistry **274**(25): 17941-17945.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." The EMBO Journal **17**(6): 1675-1687.
- Semenov, D., P. Aronov, et al. (2004). "Oligonucleosome DNA Fragmentation of Caspase 3 Deficient MCF-7 Cells in Palmitate-Induced Apoptosis." Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids **23**(6-7): 831-836.
- Shimizu, S., Y. Eguchi, et al. (1996). "Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors." Oncogene **13**(1): 21-29.
- Simstein, R., M. Burow, et al. (2003). "Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system." Experimental biology and medicine **228**(9): 995-1003.

Singletary, S. E. and J. L. Connolly (2008). "Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual." CA: A Cancer Journal for Clinicians **56**(1): 37-47.

Sinisterra, R. D., V. P. Shastri, et al. (1999). "Encapsulation and release of rhodium (II) citrate and its association complex with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin from biodegradable polymer microspheres." Journal of pharmaceutical sciences **88**(5): 574-576.

Slee, E. A., M. T. Harte, et al. (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9-dependent manner." The Journal of cell biology **144**(2): 281-292.

Slee, E. A., C. Adrain, et al. (2001). "Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis." Journal of Biological Chemistry **276**(10): 7320-7326.

Susin, S. A., N. Zamzami, et al. (1997). "The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/Apo-1/CD95-and ceramide-induced apoptosis." The Journal of experimental medicine **186**(1): 25-37.

Taylor, R. C., S. P. Cullen, et al. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(3): 231-241

Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. (1998). "Caspases: Enemies Within".Science **281**, 1312-1316.

Vaccari, C., N. Cerize, et al. (2012). "Biocompatible Magnetic Microspheres for Use in PDT and Hyperthermia." Journal of Nanoscience and Nanotechnology **12**(6): 5111-5116.

Vidal-Vidal, J., J. Rivas, et al. (2006). "Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **288**(1): 44-51.

Xue, L., S. Chiu, et al. (2003). "Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions." Experimental cell research **283**(2): 135-145.

Zajchowski, D. A., M. F. Bartholdi, et al. (2001). "Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells." Cancer research **61**(13): 5168-5178.

Zapata, J. M., K. Pawlowski, et al. (2001). "A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains." Journal of Biological Chemistry **276**(26): 24242-24252.

Zhang, C. X. & S. J. Lippard (2003). "New metal complexes as potential therapeutics". Curr Opin Chem Biol **7**(4): 481-489.

Zhivotovsky, B., A. Samali, et al. (1999). "Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis." Cell death and differentiation **6**(7): 644-651.

Zyngier, S.B; Kimura, E; Najja, R (1989). "Antitumor effects of rhodium (II) citrate in mice bearing Ehrlich tumors". Brazilian J. Med. Biol. Res. **22**, 397- 401.

Zwelling, L. A., T. Anderson, et al. (1979). "DNA-protein and DNA interstrand cross-linking by cis-and trans-platinum (II) diamminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity." Cancer research **39**(2 Part 1): 365-369.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2008.

Yang, J., X. Liu, et al. (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." Science **275**(5303): 1129-1132.