



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Efeitos biológicos e atividade terapêutica de nanocápsulas de selol em
carcinoma de pulmão de células não pequenas

BRASÍLIA

2014

LUDMILLA REGINA DE SOUZA

Efeitos biológicos e atividade terapêutica de nanocápsulas de selol em
carcinoma de pulmão de células não pequenas

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Biologia Molecular, do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília, como parte
integrante dos requisitos para a obtenção do Título
de Doutor em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sônia Nair Bão

BRASÍLIA

2014

LUDMILLA REGINA DE SOUZA

Efeitos biológicos e atividade terapêutica de nanocápsulas de selol em
carcinoma de pulmão de células não pequenas

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Molecular.

Aprovado em ___/___/___

COMISSÃO EXAMINADORA:

(Prof^ª. Dra. Sônia Nair Bão - Presidente)

(Prof^ª. Dra. Mônica Cristina de Oliveira)

(Prof. Dra. Fabiana Pirani Carneiro)

(Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva)

(Prof. Dr. José Raimundo Corrêa)

(Prof. Dr. Sacha Braun Chaves - Suplente)

Agradecimentos

A Deus, pela oportunidade de vivenciar tantas boas experiências que nunca fizeram parte dos meus planos. Por ter me concedido serenidade para aceitar as coisas que eu não posso mudar, e coragem para mudar as coisas que eu posso.

Ao meu amado Celinho, pelo significado real de companheirismo. Pelas vezes que precisou abdicar dos seus interesses para me acompanhar e apoiar. Pelo auxílio em meus experimentos e por tentar compreender o meu trabalho a fim de transmitir-me sua visão de leigo. Muito obrigada por me fazer feliz e contribuir para que os problemas se tornassem menores.

À minha família, que finalmente compreendeu o que é ser um biólogo pesquisador, mas que mesmo sem compreender, sempre me apoiou e se orgulhou de mim. A satisfação de vocês me fazia lembrar o quanto é importante comemorar cada pequena conquista. Obrigada pelo acolhimento em todos os momentos que precisei restabelecer o meu equilíbrio emocional. Dedico essa vitória a vocês: Mãe, Pai, Lore e Tia Neusa.

Agradeço à Professora Sônia por sua vocação em formar pessoas e por ter acreditado em mim sem nenhuma indicação. Sou grata pela forma como me recebeu, pela confiança, pelos anos de aprendizado, pelo exemplo de coragem e determinação. Agradeço-lhe por ter me apresentado ao Professor Ricardo, um grande mestre em gerir, inovar e visionar. Obrigada, professor, por ter me acolhido entre os membros do seu laboratório e pelos constantes incentivos. À querida Professora África, por ter me recebido tão bem em Vigo e ter me proporcionado experiências fundamentais para minha formação pessoal e profissional. Foi um prazer ter trabalhado com esses três grandes líderes. Ao professor Paulo César de Moraes, por ter me disponibilizado a sua bolsa de doutorado sanduíche.

Agradeço a todos os amigos que fiz durante esses 4 anos em Brasília, os quais seria impossível enumerá-los. Muito obrigada aos amigos dos laboratórios de microscopia, nanobiotecnologia, genética e toxicologia, pela amizade, disponibilidade em ajudar, pelas experiências partilhadas, comemorações de aniversários, auxílio na experimentação animal, caronas e, sobretudo, pelas recordações inesquecíveis.

Agradeço ao professor César Grisolia pelo empréstimo do microscópio e pela paciência com minhas constantes visitas; aos membros do seu laboratório, em especial à Paolin, Vânia, Bélin e José, por toda ajuda e grande amizade.

Aos membros do laboratório de genética e à Prof^a Zulmira, pelos empréstimos de tantos equipamentos. À querida Livia, pela amizade e pelas várias contribuições científicas, principalmente relacionadas à microtomografia.

Agradeço à professora Anamélia e à técnica Viviane pelas experiências compartilhadas com a imunoistoquímica.

Ao laboratório de microscopia, pela acolhida e todo carinho que sempre recebi. Pelas festinhas, aprendizados com as aulas práticas e reuniões. Ao professor José Raimundo e suas alunas, pelas ricas discussões. A todas as Flores, Mys, Khesler, Rapha, Débora, Marcella, Ricardo, Felipe, Ingrid, Mayara, Nat, Cláudio, Mariana, Rachel, Márcia, Tatiane, Karine, Bruna, Rafaela, Natália, Núbia, meu grande abraço e gratidão. Em especial, agradeço às queridas amigas Mayara e Natália, pelos anos de intensa convivência, amizade e parcerias. Saudades!

Ao laboratório de nanobiotecnologia, minha segunda casa. Aos amigos dos primeiros anos de doutorado que foram fundamentais à minha adaptação. Aos novos amigos, que serão parte da saudade dos bons tempos. João, Luis, Maria Luiza, Mosar, Grazi, Vic, Khélida, Bia, Samuel, Ana Lygia, Karen, Raphael, Jaque, Sebastian, Renata, Jana, Diego, Luciana, e tantos outros, obrigada por tudo que vocês representaram à minha temporada no laboratório. Grandes amigos! Obrigada Karen e Leandro, por terem prontamente me acolhido e pela grande amizade que construímos. Ao Sacha, pela paciência em me ajudar com a microtomografia.

Um agradecimento especial ao Luis, pelo qual tenho imenso carinho e admiração. Muito obrigada pela paciência com as minhas exigências em relação à partícula, e pelas nossas incontáveis horas de discussões e aprendizado. Às amigas Mayara, Marília e Rayane, por terem me proporcionado muito aprendizado e terem confiado em mim e no melhor que poderíamos fazer. Vocês fazem parte dessa história chamada Selol que conto na tese.

À dona Zélia, pela sua extrema dedicação ao laboratório, pelo auxílio inegável e por tornar a rotina do laboratório mais organizada e agradável.

CNPQ, Finatec, Finep, INCT, CAPES, Xunta de Galicia e BIOCAPS, pelo auxílio financeiro. Ao Sabin, pelas análises bioquímicas. Ao Centro de Ciências Nacional da Polônia, pelo Selol.

Obrigada, Senhor, pelas boas recordações de Brasília!!!

Que os futuros projetos nos reúnam novamente!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
Abraçar a vida e viver com paixão,
Perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
E a vida é muito para ser insignificante”

Charles Chaplin

Resumo

O selol é uma mistura oleosa de selenitotriacilgliceróis efetivo contra as células de câncer e menos tóxico às células normais em comparação às formas inorgânicas de selenito. No entanto, sua hidrofobicidade é um obstáculo à sua administração *in vivo*. Neste contexto, desenvolveu-se para o presente estudo uma formulação de nanocápsulas contendo selol estabilizadas pelo copolímero poli (vinil, metil-éter-co-anidrido maléico) (PVM/MA) (SNP). O objetivo deste trabalho foi caracterizar a formulação de nanocápsulas de selol e avaliar sua efetividade contra células de carcinoma de pulmão do tipo não-pequenas (CPCNP) em modelos *in vitro* e *in vivo*. As nanocápsulas de selol mostraram-se monodispersas e estáveis. As linhagens celulares de CPCNP utilizadas nos ensaios *in vitro* foram carcinoma de células escamosas (NCIH 2170) e adenocarcinoma (A549). Ambos selol livre (S) e SNP reduziram significativamente a viabilidade das células de adenocarcinoma pulmonar (A549), enquanto S reduziu mais pronunciadamente a viabilidade das células não tumorais em comparação a SNP. Células da linhagem NCIH 2170 não foram responsivas ao selol livre e encapsulado nas condições estudadas. O efeito supressor de SNP sobre as células A549 foi principalmente associado ao bloqueio na progressão do ciclo celular na fase G2/M, corroborado pelas reduções nas expressões gênicas de *CCNB1* e *CDC25C*. Apoptose e necrose foram induzidas por S e SNP em porcentagens discretas de células A549. No entanto, SNP parece ter causado alterações celulares capazes de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e os níveis dos transcritos de *GPXI*, *CYP1A1*, *BAX* e *BCL2*. Em camundongos portadores de adenocarcinoma de pulmão, SNP reduziu a área dos nódulos tumorais superficiais, no entanto não provocou redução do volume dos nódulos tumorais totais. A pequena diminuição da porcentagem de proliferação das células tumorais tratadas não foi estatisticamente significativa. Os resultados bioquímicos e hematológicos são sugestivos de baixa toxicidade sistêmica por SNP. As propriedades de superfície das nanocápsulas de selol apontam para características compatíveis com o tratamento de tumores *in vivo*: baixos potenciais inflamatório e hemolítico, ausente ativação do sistema complemento e leves ou ausentes alterações conformacionais de proteínas plasmáticas. Concluindo, o presente estudo apresenta uma formulação de nanocápsulas de selol com potencial para ser utilizada como terapia contra células de adenocarcinoma de pulmão, e demonstra, pela primeira vez, bloqueio no ciclo celular induzido pelo selol.

Abstract

Selol is an oily mixture of selenitetriacylglycerides that is effective against cancerous cells and less toxic to normal cells in comparison to the inorganic forms of selenite. However, its hydrophobicity hinders its administration *in vivo*. In this context, it was developed for the present study a formulation of poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) (PVM/MA)-stabilized selol nanocapsules (SNP). The aim of this work was to characterize the formulation of selol nanocapsules and evaluate its effectiveness against non-small cells lung carcinoma (NSCLC) at *in vitro* and *in vivo* models. Selol nanocapsules were monodisperse and stable. NSCLC cell lines used in *in vitro* assays were squamous cells carcinoma (NCIH 2170) and adenocarcinoma (A549). Both free selol (S) and SNP significantly reduced the viability of pulmonary adenocarcinoma (A549) cells, whereas S reduced more pronouncedly the viability of non-tumor cells, in comparison to SNP. The NCIH 2170 line cells were not responsive to both free selol and encapsulated under the conditions studied. The SNP suppressor effect at A549 cells was mainly associated to an arrest of cell cycle progression at G2/M phase, corroborated by down-regulation of *CCNB1* and *CDC25C* genes. Apoptosis and necrosis were induced by S and SNP in discrete percentages of A549 cells. However, SNP appears to have induced cell changes able to increase reactive oxygen species production and transcripts levels of *GPX1*, *CYP1A1*, *BAX* and *BCL2*. In mice with lung adenocarcinoma, SNP reduced the area of superficial tumor nodules, however caused no reduction in the volume of total tumor nodules. Subtle decrease of proliferation percentage of treated tumor cells was not statistically significant. Biochemical and hematological findings are suggestive of low systemic toxicity by SNP. The surface properties of the selol nanocapsules indicate characteristics compatible with tumors treatment *in vivo*: low inflammatory and hemolytic potentials, no activation of complement system and mild or absent conformational changes of plasma protein. Concluding, this present study exhibits a selol nanocapsule with potential to be used as a therapy against lung adenocarcinoma cells, and shows, for the first time, cell cycle arrest induced by selol.

Lista de figuras

Figura 1. Hidrólise do grupamento anidrido do PVM/MA originando dois grupamentos ácidos carboxílicos.....	8
Figura 2. Estrutura química do selol dependente do conteúdo de selênio.....	11
Figura 3. Estrutura química do selol 5% contendo um único anel selenito.....	11
Figura 4. Modelo clássico do ciclo celular em animais.....	15
Figura 5. Diâmetro hidrodinâmico (DH) e morfologia das nanocápsulas de selol.....	42
Figura 6. Avaliação de contaminação microbiana na formulação SNP.....	45
Figura 7. Viabilidade celular da linhagem NCIH 2170.....	46
Figura 8. Morfologia das células NCIH 2170.....	47
Figura 9. Morfologia ultraestrutural das células NCIH 2170.....	48
Figura 10. Viabilidade de células não tumorais e células A549.....	49
Figura 11. Viabilidade de células A549 e normais tratadas com a formulação de nanocápsulas de selol nos 1° e 60° dias após o estoque a 4°C.....	50
Figura 12. Influência de SNP na proliferação das células não tumorais e A549.....	51
Figura 13. Índices celulares em tempo real de células A549 tratadas com SNP.....	52
Figura 14. Índices de células A549 tratadas com a formulação SNP nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.....	53

Figura 15. Morfologia e confluência das células não tumorais e A549.....	54
Figura 16. Influência do selol livre e encapsulado na membrana plasmática de células A549.....	56
Figura 17. Morfologia ultraestrutural das células A549.....	57
Figura 18. Morfologia ultraestrutural das células não tumorais.....	58
Figura 19. Potencial de membrana mitocondrial das células A549 tratadas com SNP.....	59
Figura 20. Fragmentação de DNA das células A549 tratadas com SNP	60
Figura 21. Produção de espécies reativas de oxigênio em células A549 e HL60 tratadas com SNP.....	61
Figura 22. Expressão gênica relativa após tratamento das células A549 com SNP.....	62
Figura 23. Evolução do peso corpóreo dos camundongos A/J durante a indução do tumor comparado aos animais A/J sem tumor.....	63
Figura 24. Nódulos tumorais induzidos por uretano.....	64
Figura 25. Fotomicrografias dos lóbulos pulmonares dos animais experimentais.....	65
Figura 26. Área e número médio de nódulos tumorais superficiais em animais controle (PBS) e tratados com SNP.....	66
Figura 27. Imagens bidimensionais dos lóbulos pulmonares obtidas por microtomografia.....	67
Figura 28. Fotomicrografias de parênquimas pulmonares de camundongos A/J saudáveis.....	69

Figura 29. Fotomicrografias de tecidos pulmonares de camundongos A/J portadores de adenocarcinoma de pulmão não tratado.....	70
Figura 30. Fotomicrografias de tecidos pulmonares de camundongos A/J portadores de adenocarcinoma de pulmão tratados com SNP 5 mg/kg.....	71
Figura 31. Fotomicrografias de tecidos pulmonares de camundongos A/J portadores de adenocarcinoma de pulmão tratados com SNP 10 mg/kg.....	72
Figura 32. Fotomicrografias de amostras de baço utilizadas como controles das reações de imunohistoquímica.....	73
Figura 33. Expressão imunohistoquímica da proteína ki67.....	74
Figura 34. Pesos corpóreos dos animais durante os tratamentos.....	75
Figura 35. Avaliação do potencial hemolítico de SNP.....	79
Figura 36. Efeito do tratamento com SNP na proliferação e fragmentação de DNA das células da medula óssea.....	80
Figura 37. Avaliação da ativação do sistema complemento por SNP.....	81
Figura 38. Espectros de emissão de fluorescência das proteínas globulina, fibrinogênio e albumina após tratamento com SNP.....	84
Figura 39. Representação esquemática das nanocápsulas de selol estabilizadas por moléculas de PVM/MA parcialmente hidrolisadas.....	87

Lista de tabelas

Tabela 1. Materiais utilizados nos experimentos.....	19
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de qRT-PCR.....	31
Tabela 3. Dosagem espectrofotométrica de selênio nas nanocápsulas de selol.....	43
Tabela 4. Avaliação da estabilidade termodinâmica da formulação SNP.....	44
Tabela 5. Efeito do tratamento SNP na distribuição das células A549 nas fases do ciclo celular.....	55
Tabela 6. Efeito do tratamento com SNP sobre os pesos dos órgãos dos animais.....	75
Tabela 7. Análises de parâmetros bioquímicos indicativos de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em camundongos portadores de tumor de pulmão sem tratamento ou tratados com SNP.....	76
Tabela 8. Leucograma de camundongos A/J sem tumor e camundongos portadores de tumor de pulmão com e sem tratamento com SNP.....	77
Tabela 9. Plaquetograma de camundongos A/J sem tumor e camundongos portadores de tumor de pulmão com e sem tratamento com SNP.....	77
Tabela 10. Eritrograma de camundongos A/J sem tumor e camundongos portadores de tumor de pulmão com e sem tratamento com SNP.....	78
Tabela 11. Determinação dos níveis de citocinas após tratamento com SNP.....	82

Lista de abreviaturas e siglas

$\Delta\Psi_m$ – Potencial de membrana mitocondrial

A549 – Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão

AC – Adenocarcinoma

Akt – Proteína quinase Serina/Treonina

ATCC – *American Type Culture Collection*

BAX – Proteína X associada à família BCL-2

BCL-2 – Linfoma 2 de células B; proteína anti-apoptótica da família BCL-2

BSA – Albumina sérica bovina

C3 – Terceiro componente do complemento

C3a – Produto da clivagem de C3 com função anafilotoxina

C3b – Produto da clivagem de C3 com função opsonina

C5a – Produto da clivagem de C5 (quinto componente do complemento) com função anafilotoxina.

CAT – Catalase

CCE – Carcinoma de células escamosas

CCNB1 – Ciclina B1

CCND1 – Ciclina D1

CCNE1 – Ciclina E1

CDC25C – Proteína do ciclo de divisão celular 25C

CDK – Quinase dependente de ciclina

cDNA – DNA complementar

CHK2 – Quinase 2 do *checkpoint*

CPCNP – Carcinoma de pulmão de células não pequenas

CPCP – Carcinoma de pulmão de células pequenas

CYP1A1 – Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1

DAB – Diaminobenzidina

DH – Diâmetro hidrodinâmico

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

dNTPs – Desoxirribonucleotídeo trifosfato

DTT – DL-Dithiothreitol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

EPR – Permeação e retenção aumentadas

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FITC – Fluoresceína

GADD45 – Gene induzido por dano ao DNA (Gadd)45

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GPx – Glutaciona peroxidase

GPX1 – Glutaciona peroxidase 1

GSH – Glutaciona reduzida

GSSeSG – Selenodiglutaciona

GSSG – Glutaciona bissulfito

HCT – Hematócrito

HEPES – Solução tampão ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico

HGB – Hemoglobina

HL60 – Linhagem de células promielocíticas

ID – 5-iodotironina deiodinase

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

JNK – Quinase c-Jun N-terminal

Ki67 – Proteína nuclear de proliferação celular

KRAS – GTPase KRas

MAP – Proteína ativada por mitógeno

MCH – Hemoglobina corpuscular média

MCHC – Concentração de hemoglobina corpuscular média

MCV – Volume corpuscular médio

MET – Microscópio eletrônico de transmissão

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

MPV – Volume plaquetário médio

MTT - 3,4,5-dimethylthiazol-2,5 biphenyl tetrazolium bromide

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NCIH 2170 – Linhagem de carcinoma de células escamosas de pulmão

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NK – *Natural killer*

NV – Nanopartículas vazias

Oligo (dT)₁₈ – Oligonucleotídeo composto de 18 timidinas

p21 – Inibidor de quinase dependente de ciclina p21

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – Tampão fosfato salino

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PdI – Índice de polidispersão

PDW – Distribuição de tamanho das plaquetas

Phe – Fenilalanina

PI – Iodeto de propídeo

P-LCR – Porcentagem de plaquetas grandes

PLT – Número de plaquetas

PMA – Acetato miristato de forbol

pRb – Proteína retinoblastoma

PVM/MA – Poli (vinil, metil-éter-co-anidrido maléico)

RBC – Número de hemácias

RDW – Distribuição do número de eritrócitos

Rho123 – Rodamina 123

RPMI – Meio desenvolvido pelo Instituto Memorial Park Roswell

S – Selol livre

SDS – Dodecil-sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SIRT3 – Sirtuína 3

SNP – Selol encapsulado em nanocápsulas estabilizadas por PVM/MA

SS – Selenito de sódio

TGO – Transaminase oxalacética

TGP – Transaminase pirúvica

Th – T helper

TNF- α – Fator de necrose tumoral alpha

TNF- β – Fator de necrose tumoral beta

TP16 – Gene da proteína supressora de tumor 16.

TP53 – Gene da proteína supressora de tumor 53

TR – Tioredoxina redutase

Trp – Triptofano

TrxR1 – Tioredoxina redutase-1

Tyr – Tirosina

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

WBC – Leucócitos totais

Wee1 – Tirosina quinase Wee1

Zp – Potencial zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Carcinoma de pulmão de células não pequenas.....	3
2.2 Abordagens nanotecnológicas no tratamento de neoplasias.....	5
2.3 Compostos selênicos.....	9
2.4 O ciclo celular como alvo terapêutico.....	14
3 JUSTIFICATIVA.....	17
4 OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo geral.....	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
5 METODOLOGIA.....	19
5.1 Materiais.....	19
5.2 Obtenção da formulação de nanocápsulas de selol.....	21
5.3 Caracterização da formulação de nanocápsulas de selol.....	21
5.3.1 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.....	21
5.3.2 Morfologia de superfície e estrutura.....	21
5.3.3 Eficiência de encapsulação.....	22
5.3.4 Estabilidade termodinâmica da composição.....	23
5.4 Avaliação de possíveis contaminantes biológicos.....	23
5.5 Investigações <i>in vitro</i>	23
5.5.1 Cultivo celular.....	23
5.5.2 Tratamentos.....	24
5.5.3 Viabilidade celular.....	25
5.5.4 Morfologia e confluência celular.....	25
5.5.5 Contagem celular.....	26

5.5.6 Índice celular em tempo real.....	26
5.5.7 Avaliação com anexina V/iodeto de propídeo.....	27
5.5.8 Potencial de membrana mitocondrial.....	27
5.5.9 Fragmentação de DNA e análise do ciclo celular.....	28
5.5.10 Avaliação de espécies reativas de oxigênio.....	28
5.5.11 Expressão gênica em A549.....	29
5.5.11.1 Extração de RNA e transcrição reversa.....	29
5.5.11.2 RT-PCR quantitativa e análise dos dados.....	30
5.6 Investigações <i>in vivo</i> e análises complementares.....	31
5.6.1 Manutenção dos animais.....	31
5.6.2 Indução de tumor.....	31
5.6.3 Tratamentos <i>in vivo</i>	32
5.6.4 Análises pré-clínicas e histopatológicas.....	33
5.6.5 Microtomografia.....	35
5.6.6 Avaliação da proliferação celular tumoral.....	36
5.6.7 Análises bioquímicas.....	36
5.6.8 Hemograma.....	37
5.6.9 Análises de danos à medula óssea.....	37
5.6.10 Ensaio hemolítico.....	38
5.6.11 Ativação do sistema complemento.....	38
5.6.12 Ensaio de citocinas T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2)	39
5.6.13 Avaliação de resíduos aromáticos de proteínas plasmáticas.....	40
5.7 Análise estatística.....	41
6 RESULTADOS.....	42
6.1 Caracterização da formulação de nanocápsulas de selol.....	42
6.2 Redução da viabilidade varia entre os diferentes tipos celulares.....	45
6.3 SNP reduz a proliferação e promove bloqueio no ciclo celular.....	50

6.4 Aspectos morfológicos sugerem baixa taxa de morte celular.....	55
6.5 Dano ao DNA e alterações no potencial de membrana mitocondrial.....	59
6.6 Produção de EROs por células A549 tratadas com SNP.....	60
6.7 Bloqueio da proliferação e morte celular provocados por SNP.....	61
6.8 Perda de peso corpóreo e óbito de animais em processo de indução de tumor..	63
6.9 Efeito de SNP sobre o tamanho e o número de nódulos tumorais.....	64
6.10 Tratamento com SNP não alterou a histopatologia dos tumores pulmonares..	68
6.11 Observações pré-clínicas decorrentes do tratamento com SNP.....	74
6.12 Baixo perfil de toxicidade de SNP.....	76
6.13 Ciclo celular e fragmentação de DNA de células da medula óssea.....	79
6.14 Nanocápsulas de selol não ativam o sistema complemento.....	80
6.15 Nanocápsulas de selol apresentam baixo potencial inflamatório.....	82
6.16 Baixa reatividade das nanocápsulas de selol com proteínas plasmáticas.....	83
7 DISCUSSÕES.....	85
8 CONCLUSÕES.....	102
9 REFERÊNCIAS.....	104
10 ANEXOS.....	124
10.1 Parecer do comitê de ética animal.....	124
10.2 Parecer do comitê de ética em investigação clínica.....	125

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP) é um câncer particularmente agressivo e um grave problema de saúde pública mundial (Holmberg *et al.*, 2010; Riley *et al.*, 2013). Constitui aproximadamente 85% de todas as malignidades primárias de pulmão (Sangha *et al.*, 2010). Seus subtipos histológicos mais prevalentes são o carcinoma de células escamosas (CCE) e o adenocarcinoma (AC), registrando-se um aumento da incidência de AC nos últimos anos (Silvestri & Spiro, 2006; Herbst *et al.*, 2008; Riley *et al.*, 2013). A maioria dos indivíduos portadores de CPCNP apresenta neoplasia em idade avançada (70 anos em média) e mais de 75% dos pacientes apresentam doença metastática ou localmente invasiva, limitando o sucesso das terapias (Edge *et al.*, 2010). O tratamento quimioterápico em estágio avançado tem recentemente evoluído de ausente para o uso em rotina como terapias de primeira, segunda e terceira linhas (Jassem, 2012; Gerber & Schiller, 2013). Particularmente, o tratamento baseado em platina é o mais recomendado como terapia de primeira linha; no entanto, ele é responsável pela maioria dos relatos de graves toxicidades em resposta ao tratamento e alcança taxas de resposta de somente 20-40%, com sobrevida média resultante entre 7 e 12 meses (Pfister *et al.*, 2004, Wakelee, 2005, Das *et al.*, 2009; Gentzler *et al.*, 2014). A interrupção de um tratamento inicial à base de platínicos para a adoção de uma quimioterapia não platínica em regime temporário tem prolongado a sobrevida de pacientes CPCNP e é, portanto, foco de vários estudos nesse campo (Azzoli *et al.*, 2011; Paz-Ares *et al.*, 2012). Além disso, estratégias de tratamento toleráveis são importantes no controle da doença, principalmente em casos de terapias prolongadas, comorbidades e estado debilitado do paciente (Aggarwal & Langer, 2012; Kim *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Gentzler & Patel, 2014).

Os compostos selênicos são potenciais candidatos para estratégias contra o CPCNP, visto que eles são efetivos agentes anticâncer e usualmente apresentam baixo perfil de toxicidade. A eficácia desses compostos depende da natureza química e da dose (Tapiero *et al.*, 2003; Letavayová *et al.*, 2008). Compostos selênicos contendo selênio (Se) no estado de oxidação +4, selenito, apresentam maiores atividades antioxidante e anticâncer (Drake, 2006). No entanto, os componentes contendo Se (IV) geralmente apresentam alta toxicidade sistêmica, limitando sua aplicação clínica. Neste

contexto, o selol é um novo componente contendo Se +4 obtido da Universidade Médica de Varsóvia, Polônia (Fitak *et al.*, 1999 - Patente polonesa no. 176530). Trata-se de uma mistura de diferentes selenitrotriacilgliceróis, que apresenta potencial antitumoral e baixa toxicidade cumulativa (Suchocki *et al.*, 2007; 2010). O selol apresenta-se como um potente adjuvante para quimioterapias anticâncer convencionais, por sensibilizar células de leucemia à citotoxicidade de vincristina e doxorrubicina (Suchocki *et al.*, 2007). Além disso, sua atividade antitumoral parece estar associada à indução de estresse oxidativo em tecidos tumorais (Suchocki *et al.*, 2010; Ksiazek *et al.*, 2013).

Entretanto, apesar do potencial terapêutico apresentado pelo selol, sua hidrofobicidade é o principal obstáculo à aplicação biológica (Suchocki *et al.*, 2010). A alta hidrofobicidade frequentemente dificulta sua administração, além de conferir um perfil farmacocinético indesejável para sua forma livre. Este problema pode ser minimizado pelo encapsulamento do selol em um veículo aquoso. Além disso, recobrir as gotículas de selol com um polímero que apresenta grupos químicos funcionalizáveis pode conferir novas possibilidades para a entrega desse agente anticâncer para o sítio de ação desejado. Dessa forma, desenvolveu-se para o presente estudo uma formulação de nanocápsulas de selol estabilizadas pelo copolímero poli (vinil, metil-éter-co-anidrido maléico) (PVM/MA), o qual apresenta grupos funcionalizáveis, capacidade surfactante e tem sido proposto como um material biocompatível e biodegradável para preparar sistemas de liberação de drogas (Arbós *et al.*, 2002). Diante do exposto, no presente estudo objetivou-se caracterizar a formulação de nanocápsulas de selol e investigar seus efeitos biológicos e terapêuticos em carcinoma de pulmão de células não pequenas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Carcinoma de pulmão de células não pequenas

Os carcinomas de pulmão constituem as principais causas de morte por câncer em todo mundo e apresentam-se como o segundo tipo de câncer de maior incidência e prevalência (Herbst *et al.*, 2008; WHO, 2011; Riley *et al.*, 2013). As estimativas de mortalidade por câncer de pulmão entre as mortes por câncer em mulheres e homens em 2013 foram de 26% e 28%, respectivamente (Siegel *et al.*, 2013). No Brasil, estimam-se cerca de 27.330 novos casos em 2014, sendo que 60% deles acometerão o gênero masculino (INCA, 2014). Os carcinomas de pulmão são classificados em dois principais grupos histológicos, carcinoma de pulmão de células pequenas e carcinoma de pulmão de células não pequenas (Kamangar *et al.*, 2006). O carcinoma de pulmão de células pequenas (CPCP) representa 13 – 20% dos tumores em pulmão e caracteriza-se por rápida progressão e baixa sobrevida (Brown *et al.*, 2010). Embora os indivíduos portadores de CPCP inicialmente respondam ao tratamento, a maioria deles apresenta óbito decorrente de recidiva (Govindan *et al.*, 2006). O carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP) reúne tumores pelas similaridades prognósticas e comportamentais, e apresenta como principais subtipos histológicos o carcinoma de células escamosas (CCE) (30%), adenocarcinoma (40%) e carcinoma de células grandes (10%), e em menor prevalência os carcinomas adenoescamosos e sarcomatóides (Bennett *et al.*, 2008; Herbst *et al.*, 2008; Riley *et al.*, 2013). O carcinoma de células escamosas, o adenocarcinoma e o carcinoma de células pequenas juntos contabilizam 80-90% dos carcinomas pulmonares registrados no banco de dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC - International Agency for Research on Cancer) (Devesa *et al.*, 2005).

A prevalência de fumantes entre os homens tem diminuído em várias partes do mundo desde 1960. As maiores incidências registradas de cânceres de pulmão em homens ocorreram em torno de 1980. O abandono do hábito tabagista provocou uma redução do risco de desenvolvimento de carcinomas de pulmão, especialmente do carcinoma de células pequenas (Khuder *et al.*, 2001). Diferentemente, o adenocarcinoma é menos associado ao hábito tabagista que os outros tipos de tumores em pulmão, e a incidência dessa malignidade vêm aumentando em vários países nos últimos anos, em ambos os gêneros (Devesa *et al.*, 2005; Bennett *et al.*, 2008).

A patogênese do CPCNP envolve o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas devido em parte à exposição crônica a carcinógenos. Doença pulmonar obstrutiva crônica, exposição a agentes químicos, consumo de tabaco, susceptibilidade genética, imunodepressão, entre outros, são alguns fatores intrínsecos e extrínsecos ao hospedeiro que podem estar associados à sua etiopatogênese (ACS, 2008).

O CPCNP pode desenvolver-se a partir do epitélio aparentemente saudável ou a partir de lesões potencialmente malignas, como displasia escamosa, hiperplasia adenomatosa atípica e carcinoma *in situ* (Kerr, 2001; Wang *et al.*, 2006). A ampla maioria dos carcinomas de células escamosas surge nas vias aéreas centrais e caracteriza-se histologicamente pela presença de pérolas de queratina (Yakut *et al.*, 2006). Adenocarcinomas de pulmão são comumente localizados periféricamente, caracterizam-se pela diferenciação glandular ou produção de mucina e são bem conhecidos pela heterogeneidade clínica, radiológica, patológica e molecular (Shim *et al.*, 2011).

Os carcinomas de pulmão caracterizam-se por múltiplas anormalidades moleculares, algumas delas são comuns aos diversos tipos histológicos, como a ativação do oncogene *KRAS* (GTPase KRas), mutações que favorecem maior expressão gênica do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), perda de heterozigosidade do cromossomo 3p e inativação dos genes supressores de tumor *TP53* e *TP16* (Westra *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). A inativação epigenética do gene *TP16* e as alterações cromossômicas em -3p são anormalidades mais frequentes na patogênese do CCE (Belinsky *et al.*, 1998; Danner *et al.*, 2011). Particularmente em adenocarcinoma de pulmão, vários estudos relatam alterações em *EGFR*, enzimas glicolíticas e em ciclinas de fase tardia da transição G2/M do ciclo celular (ciclinas A2, B1 e B2, por exemplo) (Stearman *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013).

A disseminação das células tumorais para linfonodos proximais e órgãos distantes ocorre via vasos linfáticos e vasos sanguíneos, respectivamente. Estima-se que aproximadamente 50% dos indivíduos apresentando câncer de pulmão ressecável desenvolverão metástases dentro de 5 anos. 35-40% dos pacientes com CPCNP podem apresentar metástases linfonodais no momento do diagnóstico e o risco de desenvolver metástases distantes (osso, cérebro, pulmão contralateral, fígado e glândula adrenal) é alto no período de dois anos (Boelens *et al.*, 2009). Na ausência de terapia, o tempo médio de sobrevivência para tumores diagnosticados em estágios avançados é de 3 a 6 meses (Ramakrishna *et al.*, 2000).

A abordagem terapêutica para o câncer de pulmão é dependente do tipo, da localização e estágio clínico da neoplasia (ACS, 2008; INCA, 2014). As opções de tratamento padrão em pacientes com câncer de pulmão e metástases pulmonares são cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (Vogl *et al.*, 2013). Em doenças localmente avançadas, em estágio metastático ou em casos de recidivas o tratamento inclui quimioterapia e radioterapia (Wakelee & Belani, 2005; Das *et al.*, 2009). Cisplatina, doxorrubicina, paclitaxel e docetaxel são as composições antineoplásicas mais utilizadas no tratamento de carcinomas de pulmão, sendo que a quimioterapia baseada em platínicos permanece como a primeira opção de tratamento (Ramalingam & Belani, 2008; Curran *et al.*, 2011; Scheff & Schneider, 2013). A disseminação metastática reduz acentuadamente a possibilidade de cura, com um impacto negativo sobre a sobrevida do paciente. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas, o índice de recidivas permanece elevado, sendo superior a 30% em tumores em estágios clínicos iniciais (Das *et al.*, 2009). Outros parâmetros como a idade avançada e o estado do paciente no momento do diagnóstico são fatores associados ao insucesso do tratamento (Curran *et al.*, 2011).

Melhorias foram verificadas nos índices de sobrevida a partir de 1975 para muitos tipos de cânceres, como reflexo do diagnóstico precoce e às estratégias terapêuticas que exploram as terapias adjuvantes (Jemal *et al.*, 2009; Holmberg *et al.*, 2010; Sangha *et al.*, 2010; Siegel *et al.*, 2013). Em CPCNP, embora os casos de sobrevida de 1 ano tenham aumentado de 32% em 1973 para 41% em 1994, os índices correspondentes à sobrevida de 5 anos permanecem inalterados (Jemal *et al.*, 2009; WHO, 2011). Apenas 16% dos indivíduos apresentam sobrevida média de 5 anos e, particularmente nos casos clínicos iniciais, essa expectativa é alcançada em cerca de 27% dos indivíduos (Goldstraw *et al.*, 2007). A sobrevida dos pacientes com doença avançada sob tratamento quimioterápico permanece pobre, com menos de 5% dos pacientes sobrevivendo por 5 anos (Gentzler & Patel, 2014).

2.2 Abordagens nanotecnológicas no tratamento de neoplasias

De acordo com os princípios básicos da quimioterapia, cada dose citotóxica destrói certa fração do tumor. Após a quimioterapia, as células neoplásicas retomam a atividade proliferativa, justificando assim a necessidade de múltiplas injeções de

quimioterápicos em doses que condicionem maior destruição que repopulação celular (Patil & Panyam, 2009). Agentes anticâncer se acumulam no tecido tumoral em consequência de características do tumor descritas no efeito EPR, do inglês *Enhanced Permeability and Retention* (Permeação e Retenção Aumentadas), evidenciadas por Matsumura & Maeda, 1986. De acordo com esse efeito, as macromoléculas exibem um maior acúmulo no tecido tumoral que as espécies de baixo peso molecular, devido à vascularização aumentada e imatura combinada à pobre drenagem linfática e lento retorno venoso, como consequência de uma rápida e defeituosa angiogênese. Logo, pequenas moléculas (< 16kDa), como por exemplo a proteína anticâncer neocarzinostatina, são mais facilmente drenadas pelos vasos linfáticos em sua forma livre que conjugada a polímero. Paralelamente, em decorrência da vascularização imatura, as nanopartículas atravessam mais ativamente as pequenas fenestras endoteliais que as micropartículas e são ainda favorecidas pelo deficiente sistema de drenagem, fenômeno denominado direcionamento passivo das nanopartículas para os tumores. Em sistemas carreadores de drogas, a retenção das nanopartículas permite a desintegração das mesmas e a liberação do fármaco nas proximidades do tumor (Thanou & Ducan, 2003). O mecanismo de reconhecimento das células tumorais pode ser aumentado pela adsorção de ligantes específicos do tumor na superfície das nanopartículas, resultando em uma atração específica entre as partículas e as células tumorais, processo conhecido como direcionamento ativo (Wang *et al.*, 2008a; 2008b). Portanto, os sistemas de liberação de fármacos por meio de nanopartículas representam importantes avanços na terapêutica do câncer, baseados na habilidade de reconhecimento de uma região do corpo, no mecanismo de liberação controlada dos fármacos, na redução da quantidade de fármaco necessária para gerar uma resposta satisfatória e na redução da concentração de fármacos em sítios não alvos, minimizando, com isso, os efeitos adversos advindos da terapia (Patil & Panyam, 2009).

Os fármacos carreados pelas nanopartículas podem ser incorporados ou adsorvidos. O tamanho da partícula tem importância substancial na determinação das suas aplicações, de acordo com o sítio de interesse de ação do fármaco ou a distribuição (local ou sistêmico). Nanopartículas sem ligantes de direcionamento administradas por via sistêmica tendem a circular por todo organismo e transpor barreiras celulares incompatíveis às micropartículas, ao passo que as micropartículas tendem a acumular-se em pequenos vasos. No entanto, quando administradas em um órgão específico, as

micropartículas apresentam maior potencial de retenção no sítio de administração que as nanopartículas. As nanopartículas são preferidas se o efeito sistêmico é almejado ou o sítio de ação é irrigado por vascularização de pequeno calibre, como nos casos de tratamento de tumores e metástases (Kohane *et al.*, 2002). Com esse intuito, vários nanosistemas carreadores de fármacos têm sido estabelecidos, como micelas, lipossomas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas híbridas envelopadas por lipídios, conjugados droga-polímeros, dentre outros (Letchford & Burt, 2007; Tan *et al.*, 2013). A disponibilidade de novos quimioterápicos associados aos progressos nas tecnologias de nanopartículas, ciência dos materiais, engenharia, fisiologia e patologias celular e molecular têm contribuído para os avanços dos estudos de nanoformulações para fins terapêuticos, em um cenário em que a quimioterapia tem apresentado uma relevância crescente e tem se tornado uma das principais modalidades de tratamento (Feng, 2004).

Os fármacos lipofílicos podem ser entregues como soluções, emulsões, nanopartículas, matrizes poliméricas, pós, entre outros. Cada tipo apresenta suas vantagens e desvantagens para encapsular, proteger e entregar os agentes funcionais, bem como custo, facilidade de uso, biodegradabilidade, biocompatibilidade e estabilidade (McClements *et al.*, 2007). Uma importante vantagem dos sistemas nanoparticulados é a grande área de superfície, que permite uma penetração mais ativa dos fármacos. Dentre eles, a nanocápsula destaca-se como uma importante classe de nanocarreadores terapêuticos, visto que apresenta grande área de superfície associada à disponibilidade de cavidades internas disponíveis para carreamento de drogas. Nanocápsula é um tipo de nanopartícula classificada como um sistema reservatório, constituída de um núcleo líquido revestido por uma membrana geralmente polimérica. O fármaco carreado neste sistema pode encontrar-se dissolvido no núcleo e/ou adsorvido à superfície da partícula (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Na maioria das formulações, as nanocápsulas são hidrofílicas e apresentam um núcleo oleoso; no entanto elas podem ser também lipofílicas contendo um núcleo aquoso (Khoee & Yaghoobian, 2008; Dongwoo *et al.*, 2010).

As nanocápsulas utilizadas como carreadoras de drogas podem mascarar sabores indesejáveis, fornecer propriedades de liberação controlada, proteger moléculas da degradação, podem ser administradas por diferentes rotas (oral, retal, transdérmica, ocular, nasal, subcutânea, intraperitoneal e intramuscular, caso possuam diâmetro de até

250 nm), e, na maioria dos casos, os procedimentos de síntese podem ser realizados com solventes com baixo potencial tóxico (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Para que as nanopartículas possam ser empregadas *in vivo*, é necessário que elas sejam biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicas (MacDonald & Watkin, 2006). Nanopartículas poliméricas compostas por PVM/MA (Poli (vinil, metil-éter-co-anidrido maléico)), por exemplo, têm demonstrado apresentar biocompatibilidade, biodegradabilidade, liberação sustentada e segurança (Yoncheva *et al.*, 2005). O copolímero PVM/MA tem sido proposto como um novo material para preparar nanopartículas bioadesivas - capazes de interagir fortemente com células e/ou tecidos biológicos - para liberação de drogas. Quando o polianidrido do copolímero é degradado hidroliticamente, são gerados dois grupamentos carboxila, os quais aumentam a capacidade do polímero formar ligações de hidrogênio com estruturas biológicas, como as mucosas (Figura 1). Além disso, a hidrólise gradual dos grupamentos anidrido associa-se ao mecanismo de liberação controlada do fármaco (Arbós *et al.*, 2002). A disponibilidade de polianidrido no PVM/MA permite ainda ligar facilmente moléculas ditas “de direcionamento específico”, tornando as nanopartículas próprias ao que se denomina de “direcionamento ativo ao alvo biológico” (Arbós *et al.*, 2002).

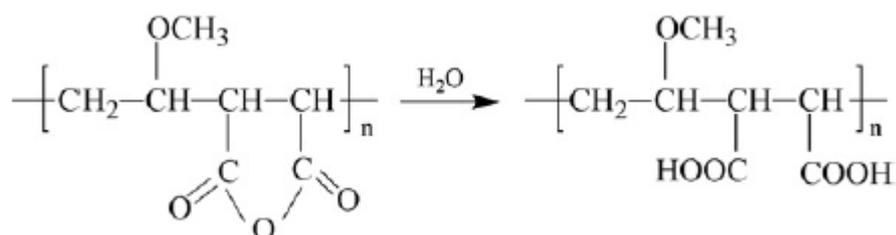


Figura 1. Hidrólise do grupamento anidrido do PVM/MA originando dois grupamentos ácidos carboxílicos. (Fonte: Li & Lee, 2010)

A biocompatibilidade das nanopartículas é também determinada pelo tamanho, forma e a química de superfície. Devido ao tamanho nanométrico e à grande razão área de superfície/volume, as nanopartículas podem interagir com lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e até mesmo metabólitos biológicos. De importância particular, a longevidade da partícula é principalmente determinada pela associação e dissociação de proteínas na superfície (Saptarshi *et al.*, 2013). Como a maioria das nanoformulações terapêuticas

são intencionados para a administração endovenosa e a imunoestimulação não é desejada, a ligação de proteínas à superfície das partículas e às células sanguíneas deve ser minimizada (Reddy *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2008). Particularmente, o sistema complemento, composto por proteínas de membrana plasmática e solúveis no sangue, é crucial na ligação a partículas exógenas e na imunidade inata e adaptativa (Ricklin *et al.*, 2010). A identificação das partículas exógenas pode ocorrer por três vias: via clássica, via alternativa e via das lectinas. Todas elas convergem para ativar o componente do complemento C3, o qual é clivado em dois fragmentos: C3a, que apresenta função reguladora e por isso é liberado no sangue, e C3b, que se liga à partícula exógena e forma complexos com outras proteínas, com o intuito de ativar a continuidade da cascata do complemento e eliminar a partícula exógena (Gadjeva *et al.*, 1998; Tordello *et al.*, 2013). A deposição de opsoninas nas partículas pode também sinalizar a secreção de citocinas por células T auxiliares (T helper (Th)) dos tipos 1 (Th1) e 2 (Th2), desencadeando a remoção das partículas por uma variedade de células do sistema imune (Hickey *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2013). Como alguns fragmentos do complemento (C3a e C5a) são citocinas pró-inflamatórias, reação sistêmica e ativação da resposta imunitária adaptativa podem ocorrer via quimiotaxia (Szebeni *et al.*, 2005; Ricklin *et al.*, 2010).

2.3 Compostos selênicos

O selênio é um micronutriente essencial ao funcionamento do organismo. Todas as formas de selênio podem ser transformadas metabolicamente para adquirirem a forma de intermediário comum, seleneto, e serem incorporados como centro ativo de selenoproteínas, como glutathione peroxidase (GPx), 5-iodotironina deiodinase (ID) e tioredoxina redutase (TR) (Ip, 1998; Birringer *et al.*, 2002; Suzuki, 2005; Liu *et al.*, 2013). A incorporação do seleneto às selenoproteínas ocorre por meio de um códon específico para resíduos de selenocisteína (Suzuki, 2005). Suas atividades antioxidantes protegem o organismo dos produtos do metabolismo celular que causam danos em ácidos nucleicos, proteínas e membranas lipídicas. O selênio também exerce um papel vital no sistema imune, uma vez que ele é essencial aos macrófagos, neutrófilos e células *natural killer* (NK) (Arthur *et al.*, 2003; Chudobova *et al.*, 2013). Diante das diversas funções atribuídas às selenoproteínas e da extensão de mecanismos

dependentes de selênio, sua deficiência pode ser causa de várias doenças, como fraqueza muscular, problemas cardíacos e virulência aumentada a diversos vírus e, além disso, associa-se a maiores incidências de cânceres, como cânceres de pulmão, mama, cólon e próstata (Ghadirian *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2007; Rikiishi, 2007).

É amplamente aceito que a atividade antioxidante do selênio está ligada aos efeitos anticâncer, os quais são dependentes da composição e da concentração (Hatfield *et al.*, 2002; Rikiishi, 2007; Letavayová *et al.*, 2008). Embora seu modo de ação não esteja completamente entendido, a citotoxicidade causada pelo selênio tem sido bastante explorada na literatura e a indução de morte celular apoptótica tem sido amplamente descrita (Rahden-Starón *et al.*, 2010, Suzuki *et al.*, 2010; Brozmanová, 2011; Wu *et al.*, 2013).

Acredita-se que os componentes orgânicos contendo selênio sejam mais rapidamente absorvidos e eliminados do organismo, acarretando uma baixa toxicidade cumulativa (Tapiero *et al.*, 2003). Os compostos selênicos que apresentam maior atividade contra radicais livres e atividade anticâncer possuem selênio no nível de oxidação +4. Dentre eles, o selol é um componente orgânico de selênio que tem se mostrado particularmente promissor devido à baixa toxicidade cumulativa associada ao seu potencial em induzir morte celular (Suchocki *et al.*, 2003).

O selol é uma mistura complexa de selenitotriacilgliceróis e funciona como um carreador de selênio na forma de selenito (Jastrzebski *et al.*, 1995; Zagrodzki *et al.*, 2000). O documento PL 176530 apresenta um composto semissintético preparado por esterificação do óleo de girassol com ácido selenioso. Dependendo do conteúdo de selênio, como resultado da dimerização, o selol possui várias estruturas, com concentrações de selênio variando de 1% a 20% (Figura 2). Na concentração de selênio 5%, a porção variável do selol pode possuir um ou dois anéis de selenito (Figura 3) (Suchocki *et al.*, 2010). O termo “selenito” refere-se ao selênio na forma aniônica, cuja estrutura química é SeO_3^{2-} e o estado de valência é +4, sendo altamente solúvel em água e conhecido por ser tóxico aos sistemas biológicos em baixas concentrações. Em contrapartida, o selênio elementar (valência 0) é altamente insolúvel em água e, por isso, apresenta mínima toxicidade (Maiers *et al.*, 1988). Nesse sentido, o selol é um triacilglicerol carreador de selenito, portanto um óleo bastante viscoso e insolúvel em meio aquoso. Por ser um componente hidrofóbico, a farmacocinética do selol pode ser

melhorada com o uso da tecnologia de nanopartículas. Estudos realizados com o selênio elementar, por exemplo, insolúvel e inerte, demonstram que o mesmo foi eficientemente captado pelas células em forma de nanopartículas (Zhang *et al.*, 2005).

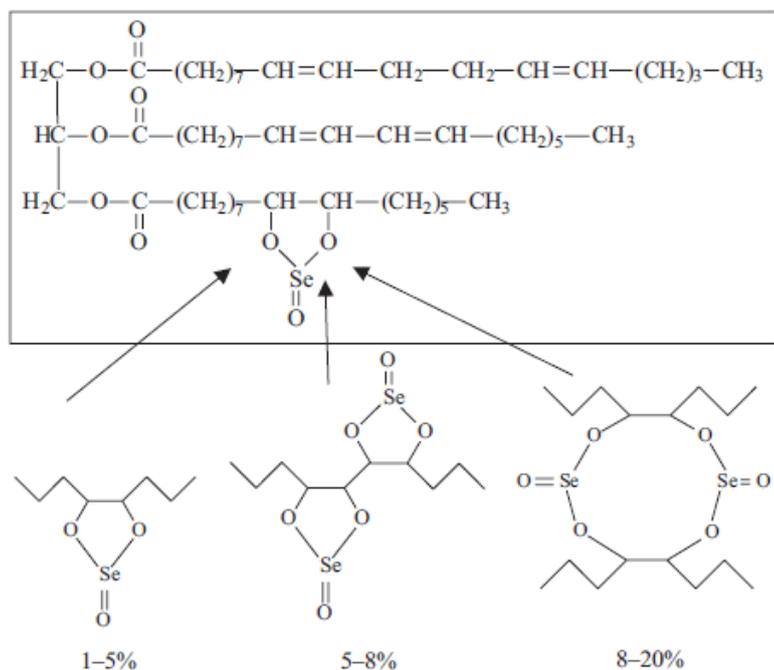


Figura 2. Estrutura química do selol dependente do conteúdo de selênio, conforme indicado pelas setas. (Fonte: Suchocki *et al.*, 2010)

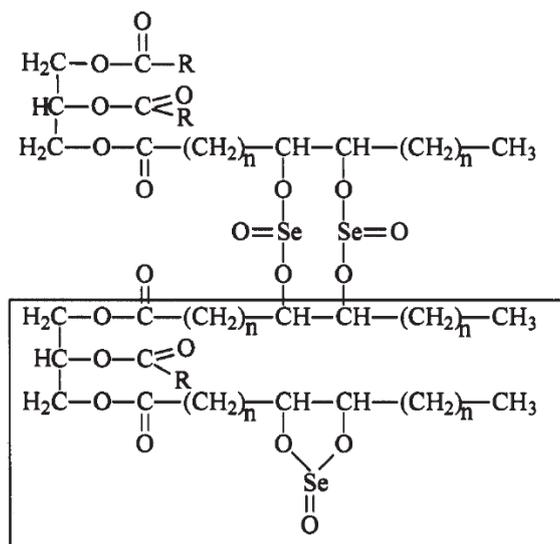


Figura 3. Estrutura química do selol 5% contendo um único anel selenito. O conteúdo de selênio (IV) 5% está contido na janela em destaque, octadeca-9,11-dienoic acid 1-[7-(5-non-3-enyl-2-oxo-2λ⁴-[1,3,2]-dioxaselenolan-4-yl)-heptanoxylomethyl]-2-octadeca-9,13-dienoyloxy-ethyl ester. (Fonte: Suchocki *et al.*, 2003)

Na atividade anticâncer, o selênio tem ação sobre múltiplos alvos intracelulares, dificultando a recuperação das células expostas à alta concentração de selênio. Entre seus potenciais alvos, o bloqueio do ciclo celular e a ativação da morte celular apoptótica têm sido os mais evidenciados (Zhao *et al.*, 2006). O bloqueio à progressão do ciclo celular tem como intermediários a ativação de uma série de proteínas, como GADD45, p21 e Chk2, e a repressão de várias ciclinas e genes requeridos para a replicação de DNA e mitose, como a ciclina B1 e Cdc25c (Sanmartín *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2013). Alvo de programas de química médica, a regulação de quinases é também um evento reconhecidamente modulado por compostos selênicos, incluindo as quinases MAPK, ERK, JNK, Akt, Cdk1 (Sanmartín *et al.*, 2011). Adicionalmente, a apoptose celular induzida pelo selenito causa alterações no potencial de membrana mitocondrial, na cascata de caspases, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e o consumo de glutathiona reduzida (Zhong *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2006; Sarveswaran *et al.*, 2010). Reduções da densidade microvascular, da expressão de VEGF e das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 associam-se ao seu potencial antiangiogênico (Jiang *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 2001).

A atividade pró-oxidante do selênio origina-se de suas regulações metabólica e antioxidante. A toxicidade por selênio manifesta-se quando o dano oxidativo excede as defesas antioxidantes ou a habilidade do organismo formar selenoproteínas (Spallholz, 1994). O selenito reage não enzimaticamente com glutathiona reduzida (GSH) para formar selenodiglutationa (GSSESG) e glutathiona bissulfito (GSSG). Selenodiglutationa reage com NADPH ou GSH para produzir seleneto e seleneto de hidrogênio (H₂Se) (Chaudiere *et al.*, 1992; Spallholz, 1994; Combs *et al.*, 1998). O seleneto (Se²⁻) é incorporado em proteínas por um mecanismo especializado (Suzuki *et al.*, 2005). Quando o seleneto de hidrogênio é gerado em grandes quantidades, ele pode ser convertido em SeO₂ ou oxidado por peroxidases a partir do O₂ para produzir selênio elementar (Se⁰), radical superóxido e peróxido de hidrogênio. Portanto, a oxidação de glutathionas e a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio causam um deslocamento oxidativo na célula, deixando-a exposta aos principais pró-oxidantes induzidos por selenito, assim como a outras fontes oxidativas (Chaudiere *et al.*, 1992; Spallholz, 1994; Combs *et al.*, 1998). Além disso, SeO₂ e selenito de sódio são facilmente difundidos pela mitocôndria e reagem com GSH mitocondrial, a qual apresenta grande relevância na manutenção da integridade das proteínas e lipídios

mitocondriais, e consequente permeabilização e liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria (Costantini *et al.*, 2000).

A redução de selenito a seleneto pode também ser causada pelos grupamentos tióis e tioredoxina redutase-1 (TrxR1). Na presença de oxigênio, o seleneto sofre ciclagem redox, gerando oxidação de NADPH e ânions superóxidos, tendo também importante influência nos mecanismos de toxicidade celular (Drake, 2006).

A atividade antineoplásica do selol é ainda pouco explorada e carente de novos estudos. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o selol é consideravelmente menos tóxico que o selenito de sódio (Jastrzebski *et al.*, 1995; Suchocki *et al.*, 2007; 2010). Além disso, a distribuição dos anéis selenito na estrutura molecular do selol confere graus variados de citotoxicidade comparando-se as diferentes formas de selol (Suchocki *et al.*, 2010). Estudos sobre o mecanismo de morte celular induzido pelo selol 5% revelaram alterações em eventos relacionados à morte apoptótica, como alteração no potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA; no entanto não foram evidenciadas atividades sobre as caspases e as exposições das fosfatidilserinas. Morfologicamente, as células apresentaram características de autofagia e mudança na distribuição dos lisossomos (Suchocki *et al.*, 2007). A escassez de estudos sobre o mecanismo anticâncer desencadeado pelo selol, associada aos resultados pouco conclusivos, reforça a necessidade de novas investigações sobre seus mecanismos de ação contra células tumorais.

Por outro lado, o selol vem se destacando como suplemento alimentar de selênio para fins antioxidantes, visto que é praticamente atóxico sistemicamente quando comparado às convencionais fontes inorgânicas de selênio, além de apresentar melhor absorção e rápida eliminação do organismo (Jastrzebski *et al.*, 1995; Zagrodzki *et al.*, 2000). Nas dietas animais, o selênio é um nutriente bastante deficiente e sua suplementação é amplamente utilizada para bovinos, aves e suínos. Documentos depositados na forma de patente sob os números PI0605813-2 A2 e US 1984/4476114 descrevem duas composições de selênio intencionadas para suplementação alimentar. PI0605813-2 A2 descreve sais orgânicos insolúveis contendo selênio; US 1984/4476114 apresenta uma solução contendo ferro e selênio; ambas são usadas na prevenção de doenças infecciosas, aumento da resistência imunológica e melhora das condições gastrointestinais em animais e humanos.

2.4 O ciclo celular como alvo terapêutico

As células eucarióticas têm desenvolvido mecanismos de controle que impedem a transição no ciclo celular em situação de estresse. Os pontos de controle da integridade do ciclo chamados de pontos de checagem (*checkpoint*) certificam se as condições celulares e de DNA/cromossomo estão adequadas para 1) realizar a transição da primeira fase de intervalo do ciclo celular (G1) para a fase de síntese (S), 2) manter a integridade da replicação por meio de um ponto de checagem durante a fase S, 3) realizar a transição do segundo intervalo do ciclo celular (G2) para a fase de mitose, 4) realizar a transição da metáfase para a anáfase (dentro da fase de mitose) e 5) manter a integridade da citocinese ao final da mitose. Especialmente, durante a fase G1, as células também monitoram as condições externas para verificar se o microambiente encontra-se favorável à proliferação (Goto *et al.*, 2013). Nas células tumorais, a desregulação do ciclo celular apresenta grande interesse prognóstico e terapêutico, uma vez que as células tumorais frequentemente apresentam instabilidade genômica e alterações cromossomais associadas à alta atividade proliferativa (Swede *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2012).

O ciclo celular é controlado por uma família de quinases dependentes de ciclina (CDKs), cujas atividades são moduladas por ciclinas e inibidores. Dentre as diversas ciclinas existentes nas células, as ciclinas A, B, D e E estão relacionadas ao ciclo celular, cujos níveis encontram-se variáveis durante as diferentes fases deste processo (Lapenna & Giordano, 2009).

Quando as células quiescentes (G0) entram no ciclo celular, inicia-se a fase de intérfase e as quinases CDK4 e CDK6 formam complexos ativos com as ciclinas D1, D2 e D3, iniciando-se a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb) (Figura 4). Ao final da fase G1, o complexo CDK2-ciclina E reforça a fosforilação de pRb em sítios adicionais, libera-se o fator de transcrição E2F e irreversivelmente inicia-se a expressão gênica associada à fase de síntese. Durante a fase G1 e a transição de G1 para S, as quinases agem como proteínas sensoras, podendo sinalizar o bloqueio do ciclo em resposta aos danos ao DNA. Esses estágios de controle da divisão celular são cruciais para impedir que as células, especialmente as células tumorais, entrem em síntese na ausência de estímulo mitogênico (Lapenna & Giordano, 2009). Durante as fases S e G2, o complexo ciclina A/CDK2 ativo prossegue à fosforilação de pRb. Além disso, a transcrição da ciclina B1 apenas inicia-se na presença do complexo ciclina A/CDK2

ativo (Deckbar *et al.*, 2011). Paralelamente à replicação do DNA, inicia-se o ciclo do centróssomo, que se duplica na fase S e na transição de S para G2. Os centróssomos separam-se em direção aos polos, preparando-se para a mitose (Lapenna & Giordano, 2009). Ao final de G2, a ciclina A é degradada e forma-se o complexo ciclina B1/CDK1, necessário à progressão para a fase M. Nessa etapa, o complexo ciclina B1/CDK1 encontra-se inativo devido à fosforilação inibitória de CDK1 realizada pela tirosina quinase Wee1. Para a entrada na mitose, CDK1 é desfosforilada pela fosfatase Cdc25C e o complexo ciclina B1/CDK1 torna-se ativo. Durante a transição G2/M, Wee1 mantém-se inativa. Ao final da mitose, a degradação de ciclina B1 fornece a direcionalidade do ciclo durante a transição de M para G1 (Potapova *et al.*, 2009; Malumbres & Barbacid, 2009).

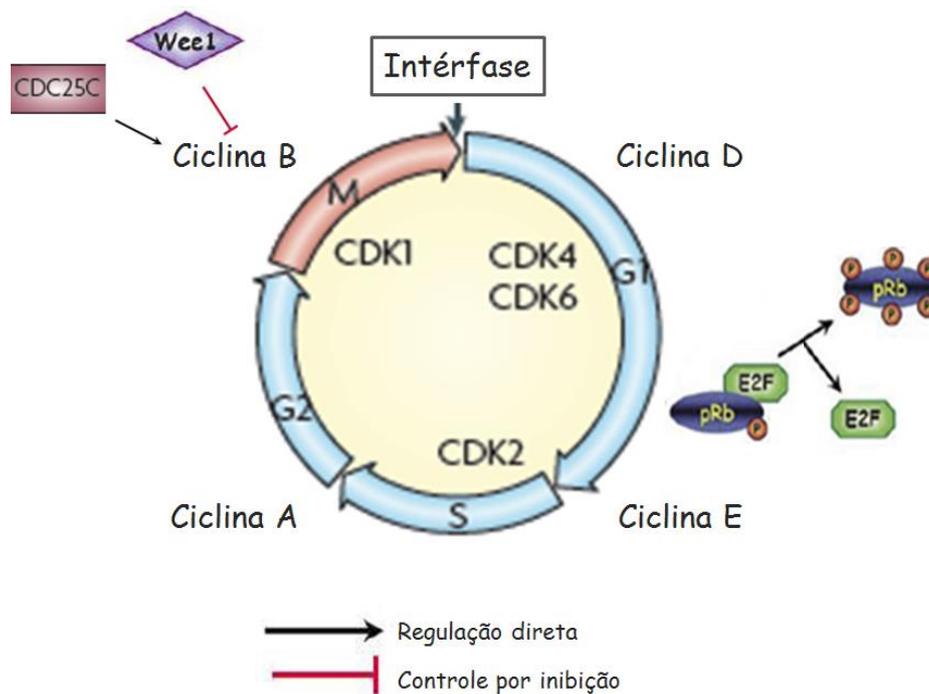


Figura 4. Modelo clássico do ciclo celular em animais. Cada evento principal do ciclo celular é dirigido por uma única quinase (CDK) ligada a ciclinas específicas. A letra P indica fosforilação. Adaptado de Malumbres & Barbacid, 2009.

Dessa forma, diante de um dano, as células sinalizam para o bloqueio temporário do ciclo celular com o intuito de realizar o reparo. No entanto, se o dano não é reparado, as proteínas do ciclo ativam o mecanismo de morte celular programada

(Paulovich *et al.*, 1997). Estudos pré-clínicos indicam que as células com defeitos na função de checagem da integridade do ciclo celular são mais vulneráveis a alguns agentes anticâncer. Moléculas como a cafeína e a pentoxifilina têm sido utilizadas com o intuito de romper a fase G2 e sensibilizar as células tumorais à radiação ionizante, aumentando os efeitos citotóxicos e a consequente morte celular (Yao *et al.*, 1996; Theron *et al.*, 2000).

No entanto, o ciclo celular pode ser também explorado como estratégia anti-proliferativa. Várias moléculas têm sido avaliadas na tentativa de inibir a proliferação por meio do bloqueio de ciclinas e quinases das fases de transição G1/S e G2/M ou por meio da desestabilização dos microtúbulos (Carney *et al.*, 2012). Bloqueando o ciclo celular nas fases G1 ou G2, diminui-se o número de células tumorais, assim como as células podem ficar mais tempo expostas aos efeitos nocivos de uma terapia combinada (Wu *et al.*, 2013). No entanto, em todos esses casos, o tempo de ação dos compostos citostáticos e a especificidade dos mesmos são fatores limitantes para o sucesso das terapias (Stewart *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICATIVA

O carcinoma de pulmão encontra-se entre os mais desafiantes cânceres na busca por novos alvos ou moléculas terapêuticas eficazes. Pesquisas que visem melhorias na resposta ao tratamento e promovam aumento da sobrevida dos pacientes portadores apresentam-se altamente promissoras. Nesse sentido, o potencial citotóxico do selol associado à sua baixa toxicidade sistêmica pode ser avaliado contra cânceres pouco responsivos às terapias disponíveis, tais como os carcinomas de pulmão. Apesar de promissor, os estudos animais apresentam a administração do selol solubilizado em óleo vegetal a fim de torná-lo menos viscoso e passível de aplicação. Desta forma, a administração endovenosa do selol é impraticável. Em ensaios *in vitro*, o selol é comumente dissolvido em um solvente orgânico aprótico - a acetona - e posteriormente aplicado ao meio de cultura. Um agravante é que a acetona, dependendo da concentração, pode ser citotóxica. Além disso, como o selol é altamente hidrofóbico, mesmo solubilizado em acetona ele se agrega em meio aquoso (Suchocki *et al.*, 2007). Trata-se de métodos de aplicação *in vitro* e *in vivo* que podem ser aprimorados, objetivando uma maior efetividade no tratamento e na compreensão acerca dos potenciais desse composto. Tendo em vista esses problemas e no propósito de superá-los, a síntese de nanocápsulas poliméricas apresenta-se como uma alternativa para solucionar os problemas relacionados à aplicação biológica do selol, além de ser uma nova possibilidade terapêutica para o câncer de pulmão. O presente estudo também se justifica pela escassez de estudos científicos que abordem os aspectos morfológicos e moleculares decorrentes da utilização do selol como um agente quimioterápico, bem como do seu uso em nanoestruturas.

Entretanto, visto que as propriedades físico-químicas das partículas influenciam o período de meia vida no sangue, assim como a deposição tecidual, torna-se importante determinar o efeito das nanocápsulas de selol em células tumorais *in vivo* e a possível toxicidade sistêmica, bem como a interação das mesmas com proteínas plasmáticas e do sistema complemento.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos biológicos e a atividade terapêutica de uma formulação de nanocápsulas contendo selol revestidas por PVM/MA [poli(metil,vinil-éter, co-anidrido maléico)] (SNP) em carcinoma de pulmão de células não pequenas.

4.2 Objetivos Específicos

- a. Desenvolver e caracterizar química e físico-quimicamente a formulação de nanocápsulas de selol.
- b. Avaliar os índices de viabilidade das células de carcinoma de pulmão e de células não tumorais *in vitro* em decorrência dos tratamentos com o selol encapsulado em nanocápsulas e o selol livre, e compará-los com a viabilidade decorrente do tratamento com o selenito de sódio.
- c. Investigar os efeitos citotóxicos e/ou citostáticos de SNP sobre células de adenocarcinoma de pulmão *in vitro*.
- d. Avaliar a possível atividade antitumoral de SNP em animais portadores de adenocarcinoma de pulmão.
- e. Avaliar parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos em decorrência do tratamento com SNP em animais portadores de adenocarcinoma de pulmão.
- f. Determinar a influência de SNP sobre a ativação do sistema complemento, a resposta inflamatória e a integridade de hemácias.
- g. Avaliar a estrutura conformacional de proteínas plasmáticas em decorrência da incubação com SNP.

5. METODOLOGIA

5.1. Materiais

Tabela 1. Materiais utilizados nos experimentos

Materiais	Fabricante
2',7'-diclorofluoresceína-diacetato	Life Technology, Estados Unidos da América (EUA)
3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo (MTT)	Invitrogen, EUA
5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP)	Sigma, EUA
Acetona	J. T. Backer, Brasil
Acetato miristato de forbol (PMA)	Abcam, Inglaterra
Ácido cítrico	Sigma, EUA
Ácido trifluoracético	Sigma, EUA
Ágar	Sigma, EUA
Albumina	Sigma, EUA
Anexina V	Invitrogen, EUA
Anticorpo anti-IgG (DO486)	Dako, EUA
Anticorpo primário anti-C3/C3b	Abcam, Inglaterra
Anticorpo primário anti-ki67	Abcam, EUA
Azul de Comassie	Bio-rad, EUA
Azul de tripan	Sigma, EUA
Cetamina	Agener União, Brasil
Cloreto de sódio	J. T. Backer, Brasil
Diaminobenzidina (DAB)	Spring, EUA
Diclorometano	Vetec, Brasil
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma, EUA
DL-Ditiotreitol (DTT)	Bio-rad, EUA
Entellan	Merck, Brasil
Eosina	Lafan Química Fina, Brasil
Estreptomicina	Gibco, EUA
Etanol	J. T. Backer, Brasil
Extrato de levedura	Sigma, EUA
Ficoll-Paque PLUS™	GE Healthcare, EUA
Glicina	Applichem Panreac GMBH, Alemanha
Hematoxilina de Harris	Lafan Química Fina, Brasil
Hematoxilina de Mayer's	Sigma, EUA
Iodeto de propídeo	Invitrogen, EUA
Kit anticorpo secundário e estreptavidina peroxidase	Diagnostic BioSystems, EUA
Kit cDNA Maxima	Life Science, EUA
Kit Flowcytomix	eBioscience, EUA
Kit DNase I, RNase-free	Thermo Scientific, EUA

KitGeneJet RNA	Life Science, EUA.
Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>	Sigma, EUA
Leite em pó (imunoistoquímica)	Nestlé, Brasil
Leite em pó (western blot)	Sigma, EUA
Lipopolissacarídeo de <i>E. Coli</i>	Invivogen, EUA
Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	Invitrogen, EUA
Meio do Instituto Memorial Park Roswell (RPMI)	Invitrogen, EUA
Meio HAM'S F12	Invitrogen, EUA
Membrana de PVDF	Bio-rad, EUA
Membranas de diálise	Thermo Scientific, EUA
Metanol	Fisher, EUA
Organosilano	Sigma, EUA
Oligonucleotídeos (primers)	Life Technology, EUA
Padrão de peso molecular	Thermo Scientific, EUA
Parafina	Vetec, Brasil
Paraformaldeído	Vetec, Brasil
Penicilina	Gibco, EUA
Peróxido de hidrogênio	Vetec, Brasil
Placa de coleta a vácuo	eBioscience, EUA
Poliacrilamida	Bio-rad, EUA
Rnase A	Promega, EUA
Rodamina 123	Sigma, EUA
SDS	Fisher, EUA
Selenito de sódio	Sigma, EUA
Soro fetal bovino	Gibco, EUA
Sulfato de amônio	Sigma, EUA
Suportes de cobre para microscopia eletrônica de varredura	Electron Microscopy Sciences, EUA
Tampão 2x Laemmil	Bio-rad, EUA
Tampão fosfato salino (PBS)	Laborclin, Brasil
Telas de cobre (300 malhas)	Electron Microscopy Sciences, EUA
Tetróxido de ósmio	Electron Microscopy Sciences, EUA
Tripsina	Gibco, EUA
Triptona	Fluka, EUA
Tris	Merck, Brasil
Triton X-100	Merck, Brasil
Tween 20	Sigma, EUA
Uretano	Sigma, EUA
Xilazina	Agener União, Brasil
Xileno	Vetec, Brasil
Zimosan A	Sigma, EUA

5.2. Obtenção da formulação de nanocápsulas de selol

As nanocápsulas poliméricas contendo selol foram sintetizadas pelo Dr. Luis Alexandre Muehlmann no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas, UnB. O selol 5% foi fornecido pela Universidade Médica de Varsóvia, Polônia. O copolímero PVM/MA (Gantrez NA 119) foi gentilmente cedido pela ISP Corp, Brasil. O método utilizado no desenvolvimento da formulação foi o da nanoprecipitação interfacial de polímero pré-formado por meio do deslocamento de solvente. Para tanto, 100 mg do copolímero PVM/MA e 100 mg de selol foram dissolvidos em um volume de 5 mL de acetona. Em seguida, foram adicionados, sob leve agitação, 10 mL de etanol e 10 mL de água. Neste momento, foram formadas as nanocápsulas. Os solventes orgânicos foram removidos por destilação a 45°C sob pressão reduzida (80 mbar) em um evaporador rotativo (Rotavapor RII[®], Buchi Switzerland, Suíça). Em seguida, as partículas foram centrifugadas a 22000 x g por 30 minutos, o sobrenadante aquoso transparente foi removido e o precipitado foi ressuspensão em água destilada estéril. Essa preparação foi imediatamente caracterizada e/ou estocada a 4°C até o uso.

5.3. Caracterização da formulação de nanocápsulas de selol

5.3.1. Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (PdI) e o potencial zeta (Zp) foram determinados por dispersão de luz dinâmica e dispersão de luz eletroforética em Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido; laser 633 nm). Para isso, as amostras foram diluídas em PBS, na concentração de 0,5% (v:v). A temperatura de análise foi mantida em 25°C e o ângulo de leitura foi fixado em 173°. Foram realizadas três leituras para maior confiabilidade.

5.3.2. Morfologia de superfície e estrutura

A caracterização da forma e da morfologia de superfície das partículas foi investigada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM 7001-F[®],

Japão). Previamente, as nanocápsulas foram diluídas em água ultrapura, concentração de 5% (v:v), e 20 µL foram depositados sobre suportes de cobre. Em seguida, a amostra foi fixada por vapor de tetróxido de ósmio (1%) (p:v), 40 µL por 1 h, deixada para secar à temperatura ambiente (TA) e cobertas com ouro em metalizador Blazers SCD 050[®] (Blazers Union AG, Liechtenstein). As imagens foram digitalizadas utilizando uma câmera UltraScan[®] conectada ao *software* Digital Micrograph[®] 3.6.5 (Gatan, EUA).

O diâmetro das partículas foi avaliado com o auxílio do *software* Image Pro-Plus[®] 5.1 em imagens capturadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) (JEOL JEM 1011[®], Japão). Antes da análise, as amostras foram diluídas em água ultrapura, concentração de 3% (v:v), colocadas sobre telas de cobre (300 malhas) previamente cobertas com Formvar 0,5% e fixadas com vapor de tetróxido de ósmio (1%) (p:v), 40 µL por 20 minutos à TA. Os diâmetros de 300 partículas foram registrados.

5.3.3. Eficiência da encapsulação

A dosagem de selol foi conduzida conforme método estabelecido por Suchocki *et al.*, 2003. 300 µL da formulação foram centrifugados a 22000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o conteúdo de água remanescente foi eliminado por secagem à temperatura ambiente durante 2 dias. Em seguida, o selol foi extraído com 800 µL de diclorometano e oxidado com 200 µL de ácido trifluoracético. A absorbância do selênio foi mensurada no comprimento de onda de 380 nm utilizando-se cubeta de quartzo em espectrofotômetro (Bio-Rad, EUA). A eficiência de encapsulação do selol foi calculada considerando a razão de massa do selol encapsulado em função da massa de selol usada inicialmente, conforme apresentado a seguir:

$$\%E = m_{se}/m_{si} \times 100$$

Onde, %E: porcentagem de selol encapsulado

m_{se} : massa de selol encapsulado

m_{si} : massa de selol inicial proporcional ao volume de suspensão original (300 µL)

5.3.4. Estabilidade termodinâmica da composição

A estabilidade da formulação SNP foi avaliada sob as seguintes condições de armazenamento:

- Temperatura ambiente, 4°C e -20°C – Alíquotas da formulação SNP foram estocadas à temperatura ambiente, 4°C e -20°C e suas características coloidais (DH, Zp e PdI) foram avaliados a cada 15 dias.

- Ciclos de congelamento e descongelamento – Quinze ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento (25°C) foram aplicados a uma alíquota de SNP. Após cada ciclo, DH, Zp e PdI foram avaliados.

5.4. Avaliação de possíveis contaminantes biológicos

Para avaliar a esterilidade das nanocápsulas obtidas, 50 µL da formulação SNP foram espalhados em placas com meio nutriente LB (Luria Bertani) ágar (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar, pH 7,0), incubadas a 37°C e avaliadas após 24 horas quanto ao crescimento bacteriano (Prakash & Hosetti, 2012).

5.5. Investigações *in vitro*

5.5.1. Cultivo celular

Células tumorais humanas das linhagens A549 (adenocarcinoma de pulmão) e NCIH 2170 (carcinoma de células escamosas de pulmão) foram obtidas do banco de células da *American Type Culture Collection* (ATCC), EUA. As células A549 foram cultivadas em uma mistura de meios DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) e HAM'S F12 (Mistura nutriente F12 Ham) suplementado com 10% (v:v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v:v) de solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As células NCIH 2170 foram cultivadas em meio RPMI (Instituto Memorial Park Roswell) suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico. Células de tecido conjuntivo humano obtidas de polpa dental de dente normal (Pereira *et*

al., 2012) foram mantidas em cultura primária e utilizadas como células controle não tumorais, nomeadamente células normais. Essas células foram crescidas em DMEM, suplementadas com 10% (v:v) de SFB e 1% (v:v) da solução de antibiótico. Todos os tipos celulares foram mantidos em incubadora úmida a 37°C, 80% de umidade e 5% de CO₂.

5.5.2. Tratamentos

O número de células para o experimento foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e exclusão por azul de tripan. As células foram semeadas em microplacas de poliestireno por 24 h e submetidas aos seguintes tratamentos: **(1)** nanocápsulas contendo selol revestidas por PVM/MA (SNP), **(2)** selol livre (S), **(3)** nanopartículas vazias (NV), ou seja, sem selol, e **(4)** selenito de sódio (SS). Células tratadas com meio de cultivo, meio de cultivo/acetona e meio de cultivo/PBS corresponderam aos grupos controles de SNP, S e SS, respectivamente. No ensaio com selol livre, o selol foi administrado dissolvido em acetona e aplicado ao meio de cultura, conforme realizado por Suchocki *et al.*, 2007. Cabe salientar que previamente à realização dos ensaios, foi realizado um estudo de viabilidade celular para certificar de que os volumes de acetona necessários para cada concentração não seriam citotóxicos. A nanopartícula vazia foi preparada pelo mesmo método e com as mesmas concentrações dos componentes usados para a formulação SNP, porém sem selol. Cada tratamento foi realizado em triplicata e com 3 concentrações diferentes de selênio (50 µg/mL, 100 µg/mL e 150 µg/mL) e tempos de exposição (24 h, 48 h e 72 h). As concentrações de PVM/MA nos tratamentos com as nanopartículas vazias foram equivalentes ao conteúdo de polímero do tratamento SNP.

Para verificar se a atividade biológica de SNP seria mantida após a condição de armazenamento a 4°C, um ensaio de viabilidade celular foi realizado em células A549 e células normais nos dias 1° e 60° após o preparo da composição SNP.

5.5.3. Viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular, 5×10^3 células foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços e então tratadas conforme descrito acima. Em seguida, as células foram incubadas com 0,5 mg/mL MTT em meio de cultivo por 2,5 h a 37°C em atmosfera úmida (80%) e 5% CO₂. O sal tetrazólio é reduzido a formazan apenas pelas células viáveis (Mosmann, 1983). Em seguida, a solução de MTT foi removida e o formazan foi extraído das células com 200 µL de DMSO por poço. A absorbância foi então medida no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA). A absorbância foi usada como um índice de viabilidade celular e os resultados expressos como porcentagens relativas aos grupos controles após 24 horas dos tratamentos. Para maior confiabilidade, foram realizadas três repetições de todos os experimentos.

5.5.4. Morfologia e confluência celular

A morfologia e confluência das células foram avaliadas com o microscópio de contraste de fase (Zeiss, Alemanha) e as imagens foram capturadas com o auxílio do *software* AxioVision® (Zeiss, Alemanha). Assim, as células NCIH 2170, A549 e células normais foram plaqueadas e tratadas com S, SNP e SS na concentração de 100 µg/mL, nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Apenas as células aderidas ao fundo dos poços foram avaliadas quanto à morfologia e confluência. No tratamento com o selol livre, as gotículas de óleo dispersas no meio de cultivo impediram a focalização nas células aderidas e, dessa forma, todo conteúdo do meio com tratamento, assim como as células mortas suspensas no meio, foram removidas e excluídas da avaliação. Por isso, meio de cultura sem tratamento foi adicionado aos poços previamente à obtenção das fotomicrografias. Esse procedimento foi realizado para as células controle, submetidas aos tratamentos com selol livre e encapsulado. Apenas nos grupos tratados com o selenito de sódio as células presentes no sobrenadante foram mantidas, com a finalidade de registrar a grande intensidade de células mortas.

Para a análise ultraestrutural, as células controle e submetidas aos tratamentos com S e SNP, concentração de 100 µg/mL por 24 e 48 horas, foram descoladas dos poços com tripsina, lavadas com PBS e fixadas por 1 hora em solução contendo

glutaraldeído 2% (p:v), paraformaldeído 2% (p:v) e sacarose 3% (p:v) em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. Posteriormente, as células foram pós-fixadas com tetróxido do ósmio 1% (p:v) e ferricianeto de potássio 0,8% (p:v) por 50 min. O material foi lavado com água destilada e contrastado durante 12 h com acetato de uranila 0,5% (p:v) a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) e embebidas em resina Spurr (Carneiro *et al.*, 2011). Secções ultrafinas de 50 nm a 70 nm foram obtidas com facas de diamante em ultramicrotomo Leica Reichert-Supernova (Leica Microsystems, Áustria). As secções foram montadas em telas de cobre de 300 malhas e examinadas em MET (JEOL JEM 1011[®], Japão). As imagens foram digitizadas utilizando uma câmera UltraScan[®] conectada ao *software* Digital Micrograph[®] 3.6.5 (Gatan, EUA).

Em decorrência da alta viabilidade celular da linhagem tumoral NCIH 2170 após os tratamentos com o selol livre e encapsulado, as demais investigações antitumorais não foram realizadas com essa linhagem.

5.5.5. Contagem celular

As células A549 e normais foram plaqueadas e tratadas com SNP (100 µg/mL) por 24 h, 48 h e 72 h. Encerrado o período de tratamento, as células foram coletadas e quantificadas pelo contador de células Scepter[™] Cell Counter[®] (Millipore, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata.

5.5.6. Índice celular em tempo real

A análise celular em tempo real foi realizada em um instrumento RTCA (do inglês *Real-Time Cell Analysis*) (Roche, Suíça), o qual utiliza o sistema xCelligence para o monitoramento dinâmico, livre de marcação, da proliferação celular e viabilidade (Xing *et al.*, 2005; 2006). 5×10^3 células A549 foram semeadas em placa de cultivo contendo biosensores eletrônicos e foram aguardadas 24 h para que as células aderissem ao fundo da placa. Em seguida, os tratamentos com SNP foram adicionados nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 150 µg/mL de selênio. Os índices de células

(IC) aderidas ao fundo da placa foram monitorados a cada 15 minutos por um período de 100 horas. Um total de dois experimentos independentes foi realizado.

5.5.7. Avaliação com anexina V/iodeto de propídeo

A externalização da fosfatidilserina e a perda da integridade da membrana plasmática, sinais de apoptose e necrose, respectivamente, foram avaliadas com o kit de dupla marcação consistindo de anexina V marcada com FITC e iodeto de propídeo (PI). Um ensaio inicial foi realizado com as células A549 tratadas com S e SNP na concentração de 100 µg/mL pelos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Devido à baixa marcação de anexina V e PI nos períodos de tratamento de 24 h e 48 h, as repetições dos experimentos foram realizadas apenas para o período de 72 h. Após os tratamentos das células A549 com S e SNP, elas foram incubadas com 100 µL de tampão de ligação contendo 10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl e 2,5 mM CaCl₂. Em seguida, 5 µL annexin V/FITC e 10 µL PI (50 µg/mL) foram adicionados e as células incubadas por 15 min à temperatura ambiente, na ausência de luz. As células foram analisadas no citômetro CyFlow[®] (Partec, Alemanha) e 10000 eventos foram contados por amostra. Células sem tratamento e sem incubação com os fluoróforos foram utilizadas como controle negativo. Células tratadas com selenito de sódio 100 µg/mL por 24 h, 48 h e 72 h foram usadas como células positivas para anexina V. Células mortas por aquecimento a 60°C por 5 minutos foram utilizadas como células PI positivas. Todos os resultados foram analisados usando os *softwares* Windows[™] Flow Max[®] e FlowJo[®] 7.6.3.

5.5.8. Potencial de membrana mitocondrial

O substrato catiônico fluorescente rodamina 123 (Rho123) foi utilizado para avaliar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas células A549. Essa sonda fluorescente se acumula na matriz mitocondrial por meio de um processo dirigido pelo gradiente eletroquímico, proporcional ao $\Delta\Psi_m$. Intensidade de fluorescência reduzida indica a dissipação do potencial de membrana mitocondrial interno (Castedo *et al.*, 2002). Nos diferentes pontos de tempo após o tratamento SNP, as células aderidas e em suspensão foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, as células foram incubadas com 5 µg/mL Rho123 por 15 min, lavadas duas vezes com PBS e então a

fluorescência foi avaliada em citômetro CyFlow[®] (Partec, Alemanha) (Joanitti *et al.*, 2010). Um total de 10000 eventos foi analisado por amostra. Os dados foram analisados no *software* Windows[™] FlowMax[®] e os histogramas representativos foram criados no *software* FlowJo[®] 7.6.3.

5.5.9. Fragmentação de DNA e análise do ciclo celular

O ciclo celular foi avaliado pela quantificação do DNA total. Células A549 controle e tratadas foram coletadas e fixadas com etanol 70% (v:v) por 2 h a 4°C. Subsequentemente, as células foram lavadas com PBS, incubadas com 50 µg/mL RNase A por 30 min a 37°C e o material genético foi marcado com 50 µg/mL PI por 30 min à temperatura ambiente (Liu *et al.*, 2011). Dez mil eventos por amostra foram contados no citômetro CyFlow[®] (Partec, Alemanha) e as porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo foram determinadas usando o *software* Windows[™] FlowMax[®]. Somente as células que apresentaram conteúdo de DNA entre 2n-4n foram consideradas na análise do ciclo celular. DNA fragmentado foi identificado na população sub-G1 (conteúdo de DNA < 2n) e calculado considerando-se a totalidade de eventos. Os histogramas representativos foram obtidos pelo *software* FlowJo[®] 7.6.3.

5.5.10. Avaliação de espécies reativas de oxigênio

A produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada nas células A549 comparativamente às células da linhagem de leucemia promielocítica humana (HL60). A linhagem HL60, utilizada como um modelo para a avaliação de componentes oxidantes, foi obtida do banco de células da *American Type Culture Collection* e foi mantida em meio de cultura RPMI, suplementado com 10% (v:v) de SFB e 1% (v:v) de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). Dessa forma, as células A549 e HL60 foram tratadas com 100 µg/mL de SNP por 1 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h e 72 h. Em seguida, as células foram coletadas e incubadas com 2,5 µM de 2,7-diclorofluoresceína-diacetato por 30 min a 37°C. Células HL60 tratadas com 10 µM de acetato miristato de forbol (PMA) foram utilizadas como controle positivo. A produção de EROs foi quantificada em citômetro de fluxo FC500[®] (Beckman Coulter, EUA) e analisadas no *software* FlowJo[®] 7.6.3.

5.5.11. Expressão gênica em A549

5.5.11.1. Extração de RNA e transcrição reversa

Células A549 foram semeadas em frascos de cultivo de 25 cm² com 10 mL de meio de cultivo. Diferentes quantidades de células foram estabelecidas a fim de que os grupos controles sem tratamento atingissem a confluência somente no último dia experimental e para que todos os grupos experimentais tivessem o número de células necessário para a extração de RNA. Dessa forma, foram semeadas 9×10^5 células para os tratamentos com SNP e controle 24 h, e 4×10^5 e 2×10^5 células para os grupos controle de 48 h e 72 h, respectivamente. Os tratamentos foram realizados com 100 µg/mL de SNP por 24 h, 48 h e 72 h. Após os tratamentos, as células aderidas foram descoladas e $1,6 \times 10^6$ células foram utilizadas para a extração dos ácidos nucleicos. Um total de três experimentos independentes foi realizado.

A extração dos ácidos nucleicos foi realizada utilizando-se o kit para purificação de RNA GeneJet RNA e seguindo-se as orientações do fabricante. As células foram lisadas com 600 µL de tampão de lise suplementado com DL-Dithiothreitol (DTT) (60 mM). Em seguida, adicionou-se 360 µL de etanol (100%) e transferiu-se todo o conteúdo para a coluna de purificação. Os ácidos nucleicos foram lavados, coletados com 100 µL de água ultrapura e armazenados a -80°C. A pureza e a concentração dos ácidos nucleicos foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000[®] (Thermo Scientific, EUA). A remoção do DNA genômico foi realizada utilizando-se o kit DNase I, RNase-free. Assim, 6 µL dos ácidos nucleicos foram misturados a 1 µL de tampão MgCl₂ 10x, 1 µL de DNase I livre de RNase e 2 µL de água livre de RNase e incubados a 37 °C por 30 min. Logo após, a reação foi interrompida com a adição de 1 µL de EDTA (50 mM) e incubação a 65°C por 10 min. O RNA isolado foi utilizado na transcrição reversa.

O cDNA foi sintetizado com o kit de síntese de cDNA Maxima. 4 µL do mix da reação 5x (tampão, dNTPs, oligo (dT)₁₈ e primers hexâmetros randômicos), 2 µL de mix de enzima (transcriptase reversa e inibidor RNase RiboLock[™]), 10 µL da amostra de RNA e 4 µL de água livre de nuclease foram misturados e incubados por 10 min a 25 °C, seguida por incubações por 15 min a 50°C e 5 min a 85°C. O cDNA produzido foi estocado a -20°C.

5.5.11.2. RT-PCR quantitativa e análise dos dados

A RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) foi realizada com produtos AB Applied Biosystems[®], seguindo-se as recomendações do fabricante. O protocolo utilizado consistiu no preparo de uma reação a partir da adição de 10 µL de TaqMan Fast Advanced Master Mix (2x), 1 µL do primer de interesse (TaqMan gene expression assay 20x), 2 µL do cDNA sintetizado conforme descrito anteriormente e 7 µL de água. Os oligonucleotídeos usados como primers estão listados na Tabela 2. Amostras controles sem cDNA foram utilizadas para verificar a pureza dos reagentes. A reação de PCR foi realizada em placa e em equipamento Fast Real-time System 7900HT (Applied Biosystem[®], EUA). As seguintes condições para a reação de amplificação foram adotadas: ativação da polimerase a 95°C por 20 s, seguida por 40 ciclos do programa de amplificação correspondente a desnaturação a 95°C por 1 s e anelamento/extensão a 60°C por 20 s.

Para validar as condições da qRT-PCR, uma curva padrão para cada amostra foi preparada a partir de diluições seriadas do cDNA e amplificação do gene constitutivo GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Esse experimento informa a extensão de concentrações que fornecem eficiências de amplificações similares, obtendo-se no corrente estudo $R^2 \geq 0,9974$. A partir dessa curva padrão, foram escolhidas as diluições das amostras de cDNA que apresentavam ciclos (CT) entre 17 a 20. CT (do inglês *threshold cycle*) indica o número mínimo de ciclos necessário para a detecção do DNA. A quantidade relativa dos transcritos, normalizada para a amostra controle não tratada, foi estabelecida de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT$ (ΔCT (experimento) - ΔCT (controle)), cujo ΔCT equivale ao CT do gene de interesse - CT do gene constitutivo (Robertson *et al.*, 2012). A expressão gênica foi considerada aumentada ou diminuída quando a taxa de transcrito (FC, do inglês *fold change*) foi ao menos duas vezes variável em relação ao controle (Lee *et al.*, 2012).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de qRT-PCR

Gene	Identificação	Produto (pb)
<i>ACTB</i>	Hs99999903_m1	171
<i>BAX</i>	Hs00180269_m1	62
<i>BCL2</i>	Hs00608023_m1	81
<i>CAT</i>	Hs00156308_m1	68
<i>CDC25C</i>	Hs00156411_m1	145
<i>CCNB1</i>	Hs01030099_m1	86
<i>CCND1</i>	Hs00765553_m1	81
<i>CCNE1</i>	Hs01026536_m1	64
<i>CYP1A1</i>	Hs00153120_m1	91
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1	93
<i>GPX1</i>	Hs00829989_gH	76
<i>SIRT3</i>	Hs00953477_m1	93
<i>WEE1</i>	Hs00268721_m1	66

5.6. Investigações *in vivo* e análises complementares

5.6.1. Manutenção dos animais

Os animais estudados foram camundongos fêmeas da linhagem A/J obtidos do Centro de criação de animais de laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Os animais apresentavam-se saudáveis e sem histórico de uso de qualquer tipo de droga, com peso corporal entre 16-20 g, com 8 semanas de idade, e foram mantidos em condições adequadas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($50\% \pm 10\%$) e 12 horas de ciclos claro/escuro no Biotério do Laboratório de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (GEM-IB-UnB). Os camundongos foram colocados em caixas plástica, 7 animais por caixa, com dieta e água *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, parecer 63966/2011 (Anexo I).

5.6.2. Indução de tumor

O modelo de indução de tumor nos animais foi o da carcinogênese pulmonar induzida por uretano, um modelo de indução química de múltiplas etapas (Du *et al.*, 2013; Satoh *et al.*, 2013). Os metabólitos vinil carbamato e o seu derivado epóxi são

considerados responsáveis pela carcinogenicidade do uretano. O adenocarcinoma de pulmão humano exibe similaridades histológicas, porém poucas semelhanças moleculares a esse adenocarcinoma murino. No entanto, genes controladores do ciclo celular, em especial as ciclinas de transição G2/M, como a ciclina B1, apresentam elevada expressão em ambos os modelos tumorais (Stearman *et al.*, 2005).

Para a indução do tumor, foram utilizados camundongos fêmeas A/J com 8 semanas de vida. Foi realizada uma aplicação semanal do agente indutor uretano (1 g/kg) por via intraperitoneal durante o período de quatro semanas. Aguardaram-se quinze semanas após a última aplicação do uretano para o estabelecimento e desenvolvimento do tumor (Stathopoulos *et al.*, 2007; Zerbe *et al.*, 2008).

Ressalta-se que um estudo piloto foi realizado previamente com 10 animais, seguindo-se os procedimentos descritos anteriormente, a fim de verificar a ocorrência dos nódulos tumorais pulmonares. No ensaio piloto, foram registrados 4 óbitos no período de iniciação e desenvolvimento do tumor. Em todos os animais restantes foram evidenciados vários nódulos distribuídos por todo o pulmão. Dois pulmões foram preparados para a visualização em microscopia eletrônica de varredura. Para isso, os pulmões foram primeiramente fixados por 12 h a 4°C com uma solução contendo glutaraldeído 2% (p:v), paraformaldeído 2% (p:v) e sacarose 3% (p:v) em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. Em seguida os pulmões foram pós-fixados com tetróxido do ósmio 1% (p:v) e ferricianeto de potássio 0,8% (p:v) por 1 h. O material foi lavado com água destilada e desidratado em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%). Após a desidratação, toda água residual foi removida das amostras no equipamento de secagem ao ponto crítico (CPD Balzers 020, Alemanha) e posteriormente metalizadas em metalizador Blazers SCD 050[®] (Blazers Union AG, Liechtenstein). As imagens foram obtidas utilizando uma câmera UltraScan[®] conectada ao *software* Digital Micrograph[®] 3.6.5 (Gatan, EUA).

5.6.3. Tratamentos *in vivo*

Os animais portadores de tumor foram divididos em 3 grupos, com 7 animais cada. A formulação SNP foi administrada a cada 48 h na veia caudal, 10 doses totais, com as concentrações de Se de 5 mg/kg/aplicação e 10 mg/kg/aplicação. Animais portadores de tumor e que receberam apenas PBS foram utilizados como grupo controle. Um grupo

de 5 animais sem tumor e tratados com PBS foi utilizado como grupo controle dos padrões de normalidade do animal. Ambos os grupos controles foram tratados nas mesmas condições e frequência dos animais tratados com SNP. Encerrado o período de tratamento, os camundongos foram anestesiados com cetamina/xilazina (75 mg/kg e 5 mg/kg massa corporal, respectivamente) e eutanasiados por deslocamento cervical. Pulmão, fígado, baço, rins, sangue e células da medula óssea foram coletados.

5.6.4. Análises pré-clínicas e histopatológicas

Os camundongos foram observados diariamente no período das administrações do uretano. As massas corpóreas foram verificadas semanalmente durante as fases de aplicação do agente indutor e desenvolvimento do tumor, anteriormente a qualquer tratamento e no dia da eutanásia. Além disso, os órgãos pulmão, fígado, baço e rins foram pesados após a eutanásia e observados quanto ao aspecto macroscópico.

Após a ressecção do pulmão, os lóbulos pulmonares foram separados e fotografados com o auxílio de um estereomicroscópio (Stemi 2000, Zeiss, Alemanha) acoplado à câmera Axio Cam HRm (Zeiss, Alemanha). As imagens foram obtidas com a objetiva de 2,5 x, optovar 1,0 e câmera 0,63 x. O número de nódulos superficiais e as áreas dos mesmos foram estabelecidos por quantificações realizadas no *software* Zen lite (Zeiss, Alemanha). Nas condições descritas, 1 pixel correspondeu a 4,2 µm.

Para a realização da análise histopatológica, os pulmões foram fixados em solução tamponada de paraformaldeído 4% (p:v) por 4 h à temperatura ambiente. Em seguida, eles foram desidratados com concentrações crescentes de etanol (70% a 100% v:v, 1 h cada), diafanizados com 3 incubações em xileno, 1 h por incubação, infiltrados com 3 banhos de parafina (1 h cada) e posteriormente emblocados em parafina. Todos os procedimentos de desidratação e diafanização foram realizados em histotécnico (OMA[®], DM-40, Brasil).

Visto que todos os lóbulos pulmonares de cada animal foram emblocados, realizou-se a microtomografia dos blocos previamente à realização da microtomia, conforme será apresentado no tópico 5.6.5. As secções histológicas (5 µm de espessura) foram realizadas de forma semi-seriada em micrótomo Leica RM2235 (Leica Microsystems, Alemanha). Foram preparadas nove secções de cada amostra, adotando-

se um intervalo de 50 µm entre cada secção. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina & eosina: 3 banhos de xileno, concentrações decrescentes de etanol (100% - 70% v:v), coloração com hematoxilina (1% p:v), coloração com eosina (1% p:v), concentrações crescentes de etanol (70% - 100% v:v) e 3 banhos de xileno. A hematoxilina foi incubada por 1 min e a eosina por 30 s. As demais incubações ocorreram pelo período de 1 min. As lâminas foram montadas com resina sintética entellan e analisadas em microscópio óptico (Olympus[®], Japão).

Os tumores foram avaliados histologicamente quanto à presença de adenoma e/ou adenocarcinoma, a ocorrência de infiltrado inflamatório e ao padrão de crescimento tecidual, conforme critérios descritos a seguir. Os tumores pulmonares experimentalmente induzidos pelo uretano podem ser do tipo benigno (adenoma) e/ou maligno (adenocarcinoma) (Balli *et al.*, 2011; Satoh *et al.*, 2013). Os adenomas apresentam características morfológicas de tumores bem delimitados, com células epiteliais normalmente uniformes e bem diferenciadas, apresentando crescimento ordenado num arranjo papilífero ou sólido. Suas células apresentam morfologia colunar e/ou cubóide, núcleo circular e quantidade moderada de citoplasma eosinofílico (Nikitin *et al.*, 2004). Os aspectos histopatológicos do adenocarcinoma de pulmão são típica desorganização arquitetural do tecido neoplásico, hiper celularidade e franca invasão do tecido normal circunjacente. As células cancerosas de adenocarcinoma pulmonar são tipicamente pleomórficas, têm maior relação núcleo-citoplasma, exibem figuras de mitoses normais e aberrantes e apresentam núcleo hiper cromático com nucléolos evidentes (Stearman *et al.*, 2005). Esses tumores pulmonares são classificados nos subtipos histológicos sólido, papilífero e misto. Particularmente, o adenocarcinoma de pulmão pode ainda ser classificado como acinar e NOS, sendo esse último o adenocarcinoma que não apresenta características sólida, papilífera ou acinar (Malknson, 2001; Nikitin *et al.*, 2004).

Imagens representativas de cada grupo experimental foram digitalizadas por um sistema de aquisição de imagens acoplado ao microscópio óptico (AnalySIS getIT, Olympus[®], Japão).

5.6.5. Microtomografia

A microtomografia é uma técnica não destrutiva, que permite a análise de secções microtomográficas e a visualização tridimensional de amostras, além de quantificações de área e/ou volume. Esta técnica tem sido crescentemente utilizada em estudos pré-clínicos como um método de imagem *in vitro* e *in vivo* para a avaliação de espécimes de tecido e pequenos animais (Seise *et al.*, 2011; Temmermans *et al.*, 2013).

As amostras de pulmão emblocadas em parafina foram escaneadas em microtomógrafo (Skyscan 1076 (Skyscan, Bélgica)) sob condições de alta resolução: fonte de 50 kV, corrente de 200 μ A, imagens realizadas a cada 0,5° em um escaneamento total de 180°, filtro de alumínio 0,5 mm, número de médias de 8, diâmetro da região de escaneamento de 35 mm e tamanho de voxel de 9 μ m.

As reconstruções bidimensionais foram realizadas com o *software* NRecon (V 1.6.9, versão 64 bit com aceleração GPU, Skyscan, Bélgica), adotando-se as seguintes condições: *step 1*, *smoothing 3*, *beam hardening 40* e *ring artefact 20*.

As reconstruções e análises tridimensionais (3D) foram realizadas com os *softwares* CTAn (V 1.13, versão 64 bit, Skyscan, Bélgica), CTvox (V 1.5.0, versão 64 bit, Skyscan, Bélgica) e CTvol (V 2.2, versão 64 bit, Skyscan, Bélgica).

As imagens foram avaliadas quanto ao volume dos nódulos tumorais baseando-se na análise de morfometria e na avaliação da escala de cinza. Para ambas as análises, os índices da escala de cinza referentes à massa pulmonar total e à massa tumoral foram estabelecidos na seleção binária. A partir da reconstrução tridimensional de cada material, foram gerados histogramas apresentando as áreas relativas referentes a cada tom de branco (material sólido). Os crescentes tons de branco representam as maiores intensidades de material sólido e, no presente estudo, representaram as maiores massas tumorais. As intensidades de branco dos animais tratados com SNP foram normalizadas para a intensidade de branco média dos animais controle (tratados com PBS). A avaliação do volume dos nódulos tumorais foi realizada pela análise de morfometria, adotando-se a referência volume ósseo (do inglês *bone volume*) como o volume do objeto sólido (mm^3). Esse resultado foi expresso em porcentagem, calculado pelo volume dos nódulos tumorais em relação ao volume pulmonar total.

5.6.6. Avaliação da proliferação celular tumoral

Secções histológicas dos pulmões foram analisadas por imunistoquímica com o marcador de proliferação celular anti-ki67. Duas secções de 3 µm de espessura foram coletadas por pulmão e colocadas sobre lâminas cobertas com organossilano. As secções histológicas foram submetidas à desparafinização em banhos de xileno, hidratação em concentrações decrescentes de etanol (100% - 70% v:v) e recuperação antigênica com tampão citrato (0,21 g/L ácido cítrico, pH 6,0, 5 min). A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão e a contagem do tempo iniciou-se a partir do momento em que a panela atingiu a pressão. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% (v:v), por duas incubações de 15 min cada a TA. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com leite em pó 3% (p:v) por 30 min a TA. O anticorpo primário anti-ki67 (ab15580, Abcam) foi preparado em BSA 3% (p:v) na diluição de 1:100 e a incubação procedeu-se pelo período de 12 h a 4°C. A identificação do anticorpo primário foi realizada por meio da incubação com o anticorpo secundário biotilado e a estreptavidina peroxidase, ambos por 30 min a TA. A revelação da reação ocorreu por meio da incubação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 5 s. Por fim as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer's, desidratadas e montadas com resina sintética entellan.

Amostras de baço foram utilizadas como controle positivo. O controle negativo foi obtido por omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por BSA 3% (p:v). Somente as células tumorais que apresentaram núcleos corados em marrom foram consideradas positivas. As avaliações e contagens das células marcadas e não marcadas foram realizadas em microscópio de luz (Olympus[®], Japão) na objetiva de 40 x, com o auxílio de um retículo milimetrado de 100 pontos (área 0,092 mm²) sobreposto aos diferentes nódulos tumorais. Dez campos foram avaliados por animal e o índice de proliferação (IP) foi definido em função da porcentagem de células positivas em relação às células totais.

5.6.7. Análises bioquímicas

O sangue destinado à análise bioquímica foi coletado em tubo com gel separador para a obtenção do soro e posteriormente armazenado a -20°C. As amostras foram enviadas para análise no Laboratório Sabin de Brasília. Os níveis de transaminase

oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) foram avaliados pelo método cinético otimizado U.V., sendo utilizados como parâmetros sugestivos de disfunção hepática. Dosagens de ureia e creatinina foram realizadas pelos métodos colorimétrico enzimático e de Jaffe, respectivamente, avaliadas como indicadoras de disfunção renal. Os procedimentos foram realizados com reagentes Siemens (Alemanha) conforme orientações do fabricante, e as dosagens realizadas em instrumento Advia 2400 (Siemens, Alemanha).

Os resultados obtidos dos animais sadios (sem tumor) foram utilizados como valores de referência, uma vez que esse grupo foi constituído por animais da mesma linhagem, idade e submetidos às mesmas condições ambientais.

5.6.8. Hemograma

Para a análise do hemograma, o sangue foi coletado em tubos contendo EDTA 10% e imediatamente submetido à leitura em hematocitômetro veterinário automático (pocH-100iV Diff, Sysmex, Brasil) calibrado para camundongos. Os parâmetros avaliados foram 1) leucograma (leucócitos totais (WBC), número de linfócitos, neutrófilos e monócitos, e eosinófilos), 2) eritrograma (número de hemácias (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e variação da distribuição do número de eritrócitos (RDW)) e 3) plaquetograma (número de plaquetas (PLT), volume plaquetário médio (MPV), porcentagem de plaquetas grandes (P-LCR) e distribuição de tamanho das plaquetas (PDW)). Os resultados dos animais sadios foram utilizados como valores de referência.

5.6.9. Análises de danos à medula óssea

As avaliações da fragmentação de DNA e o perfil do ciclo celular das células da medula óssea foram estabelecidos como indicadores de toxicidade hematopoiética complementares à avaliação do hemograma. Assim, amostras da medula óssea dos animais foram coletadas dos fêmures, fixadas com etanol 70% (v:v) e armazenadas a -20°C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e processadas para a avaliação do conteúdo de DNA conforme descrito no tópico 5.5.9.

5.6.10. Ensaio hemolítico

Para o estudo hemolítico, 5 mL de sangue de rata foram coletados em tubo contendo EDTA 10% e em seguida foram adicionados 45 mL de PBS. As células foram centrifugadas três vezes a 1000 x g por 10 min a 4°C e ressuspensas em PBS. Após a última centrifugação, o volume de PBS utilizado para ressuspender o precipitado de células foi estabelecido em função do peso do precipitado celular, de forma a obter uma suspensão eritrocítica a 3% (p/v) (Banerjee *et al.*, 2008). 80 µL da suspensão celular foram misturados a 80 µL de SNP, nas concentrações de Se de 1000 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL e incubadas por 4 h a 37°C e 5% de CO₂. PBS e triton X-100 1% (v:v) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (1000 x g por 10 min a 4°C) e avaliadas quanto à coloração do sobrenadante. Os ensaios foram conduzidos em duplicata, com três experimentos independentes.

5.6.11. Ativação do sistema complemento

A ativação do sistema complemento foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de docecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) e western blot, por meio da quantificação da proteína C3. Para isso, um *pool* de amostras de soro humano oriundas de doadores saudáveis foi incubado a 37°C por 1 h com as nanocápsulas de selol nas concentrações de Se de 10 µg/mL e 100 µg/mL. Os controles positivos e negativos utilizados nesse ensaio foram zimosan A (1 mg/mL) e PBS, respectivamente. Após a incubação, 50 µL das amostras foram misturados a 50 µL de DTT (35 mM DTT diluído em tampão 2 x *Laemmli sample buffer* (65,8 mM de Tris-HCl, 2,1% SDS, 26,3% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8)) e aquecidas a 95 °C por 5 minutos. Posteriormente, as nanopartículas foram precipitadas pela centrifugação das amostras a 22000 x g por 30 min e em seguida 50 µL dos sobrenadantes foram reservados para a eletroforese.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida/SDS 30,0%. Um padrão de massa molecular foi utilizado como referência para a identificação das proteínas de interesse. O tampão tris-glicina (25 mM tris; 192 mM glicina; 0,5% SDS, pH 8,6) foi utilizado para a corrida do gel, a qual ocorreu a 200 V por 50 min. Após a corrida, a visualização das proteínas totais foi realizada com coloração de um dos géis com azul

de Comassie, enquanto outro gel foi utilizado para a marcação das proteínas por western blot.

A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose PVDF (0,2 µm) ocorreu durante 30 min a 23 V, na presença de tampão de transferência (10 mM tris, 100 mM glicina e 15% metanol). O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com incubação em tampão de bloqueio (leite desnatado 5% em tampão Tris/0,1% Tween 20) por *overnight* a 4°C, em agitação constante. O anticorpo monoclonal anti-C3/C3b humano (ab11871, Abcam) foi diluído em tampão de bloqueio, 1:2000, e a membrana foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente, em agitação constante. Após esse período, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão Tris/0,1% Tween 20 e incubada com o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina anti-IgG (DO486, Dako) à diluição de 1:2000 em tampão de bloqueio. Em seguida, a membrana foi lavada novamente e revelada com o sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP). Imagens foram capturadas em ChemiDoc XRS (Bio-rad, EUA) e as membranas analisadas no *software* Image lab 3.0.

As marcações foram normalizadas de acordo com a degradação basal da proteína C3 do controle negativo. Além disso, as porcentagens de C3 clivada (C3b) foram estabelecidas de acordo com a quantidade de C3 total. Três experimentos independentes foram realizados.

5.6.12. Ensaio de citocinas T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2)

A formulação SNP foi avaliada quanto à ativação inflamatória Th1 e Th2. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (linfócitos, monócitos e células dendríticas) foram obtidas a partir do sangue periférico total de 3 doadores humanos saudáveis e separadas por centrifugação com gradiente de densidade, utilizando-se Ficoll-Paque PLUS™ conforme as instruções do fabricante. Para o isolamento dessas células, adicionaram-se 3 mL de Ficoll-Paque PLUS™ em um tubo de 15 mL, e sobre ele foram adicionados 7 mL de sangue/PBS (1:1). Em seguida, o tubo foi centrifugado a 400 x g, 20°C, durante 30 min. As diferentes frações sanguíneas foram separadas por centrifugação com gradiente de densidade, e toda a fração de células mononucleares foi retirada, lavada e disposta em 2×10^5 células/poço para a realização dos tratamentos. As células foram cultivadas em meio RPMI, suplementado com 10% (v:v) de SFB e 1%

(v:v) de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina), e mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% CO₂. As nanocápsulas SNP foram incubadas por 24 h às células mononucleares nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL de selênio. Controle positivo foi realizado com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo de *E. coli* + 10 µg/mL de lectina de *Phaseolus vulgaris*. Em seguida, as células foram centrifugadas e 25 µL dos sobrenadantes foram transferidos para a placa de coleta a vácuo de 96 poços, a fim de realizar a incubação com os anticorpos contra as proteínas plasmáticas. A identificação das proteínas (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TNF- β) foi realizada com o uso do kit FlowCytomix de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, 25 µL das amostras foram misturados a 25 µL da mistura de beads, contendo os anticorpos conjugados ao fluorocromo, e em seguida a 50 µL do anticorpo conjugado à biotina, e mantidos a TA por 2 h em agitação. Após a incubação, as amostras foram lavadas em PBS/BSA (1%) e a solução de estreptavidina-PE foi adicionada e mantida a TA por 1 h. Após 2 lavagens em PBS/BSA (1%), as leituras foram realizadas no citômetro FACSaria III[®] (Beckman Coulter, EUA) e analisadas no *software* FlowCytomix Pro, eBioscience. Uma curva padrão para cada proteína foi estabelecida, adotando-se um ajuste de 99%.

5.6.13. Avaliação de resíduos aromáticos de proteínas plasmáticas

Proteínas plasmáticas humanas foram fracionadas por precipitação na presença de sulfato de amônio, conforme Simón-Vázquez *et al.*, 2014. Para isso, 0,5 mL de plasma, proveniente de um doador saudável, foi misturado a 3,5 mL de 10 mM Tris/EDTA (pH 7,4) e mantidos em agitação a 4°C. Com o intuito de precipitar fibrinogênio, 0,44 g de sulfato de amônio foram adicionados ao plasma e a solução foi mantida em agitação a 4°C por 1 h. Em seguida, a fração proteica foi centrifugada (1000 x g a 4°C) por 15 min e as proteínas precipitadas foram solubilizadas em 0,5 mL de PBS (pH 7,4). Para a precipitação das globulinas, foi adicionado 1 g de sulfato de amônio ao plasma e a solução foi também mantida em agitação a 4°C por 1 h. A fração protéica foi centrifugada e ressuspensa em PBS, conforme realizado com a amostra de fibrinogênio.

Para o fracionamento das proteínas de interesse, procedeu-se à diálise utilizando-se membranas de diálise de 10 kDa e PBS (pH 7,4) como meio dialisador. Todo o

conteúdo proteico fracionado foi adicionado à membrana. Após 1 hora em agitação a 4°C, um novo PBS foi adicionado e mantido por 12 h. A fim de verificar a pureza das frações protéicas e quantificá-las, ambas foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000[®] (Thermo Scientific, EUA).

As nanocápsulas de selol foram incubadas por 5 min às frações protéicas fibrinogênio (0,6 mg/mL) e globulinas (0,4 mg/mL) nas concentrações de Se de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Suspensão de albumina humana em PBS (pH 7,4), 1 mg/mL, foi incubada às nanocápsulas nas mesmas condições mencionadas acima. Proteínas incubadas com PBS foram utilizadas como controle negativo. Todas as proteínas foram excitadas a 280 nm e o espectro de emissão de fluorescência foi coletado entre 300-450 nm, com medições realizadas a cada 2 nm no intervalo do comprimento de onda de emissão. Para cada condição, duas medições foram realizadas em espectrofluorímetro Envision (Perkin Elmer Inc, EUA). Ressalta-se que não foi detectada emissão de fluorescência pelas nanocápsulas de selol. Os resultados foram comparados quanto ao perfil do espectro de fluorescência emitida pelos resíduos de aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr e Phe) e analisados no *software* OriginPro 8.0.

Os ensaios realizados com células humanas estão em concordância com o Comitê de ética de investigação clínica da Galícia, Espanha, CEIC: 2013/272 (Anexo II).

5.7. Análise estatística

Os resultados foram analisados nos *softwares* SPSS[®] 17.0 e GraphPad Prisma[®] 5.0 e submetidos a testes estatísticos específicos com confiança estatística de 95% ($p < 0,05$). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar se as variáveis numéricas apresentavam distribuição normal. Possíveis diferenças estatísticas foram avaliadas pelos testes Anova, de uma ou de duas vias, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, empregando-se pós-testes de Tukey ou de Bonferroni. Os resultados quantitativos foram descritos como média \pm erro padrão.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização da formulação de nanocápsulas de selo

A formulação SNP apresentou uma única população de partículas com diâmetro hidrodinâmico (*z-average*) de $344,4 \pm 4,8$ nm, PdI de $0,061 \pm 0,005$ e Z_p de $-29,3 \pm 1,5$. A distribuição do DH das nanocápsulas por intensidade pode ser visualizada na figura 5, A. A microscopia eletrônica de transmissão revelou uma população de nanocápsulas com um diâmetro médio de $207,9 \pm 80,9$ nm. Essas estruturas nanométricas apresentaram forma esférica e superfície relativamente rugosa, como visto por MEV (Figura 5, B).

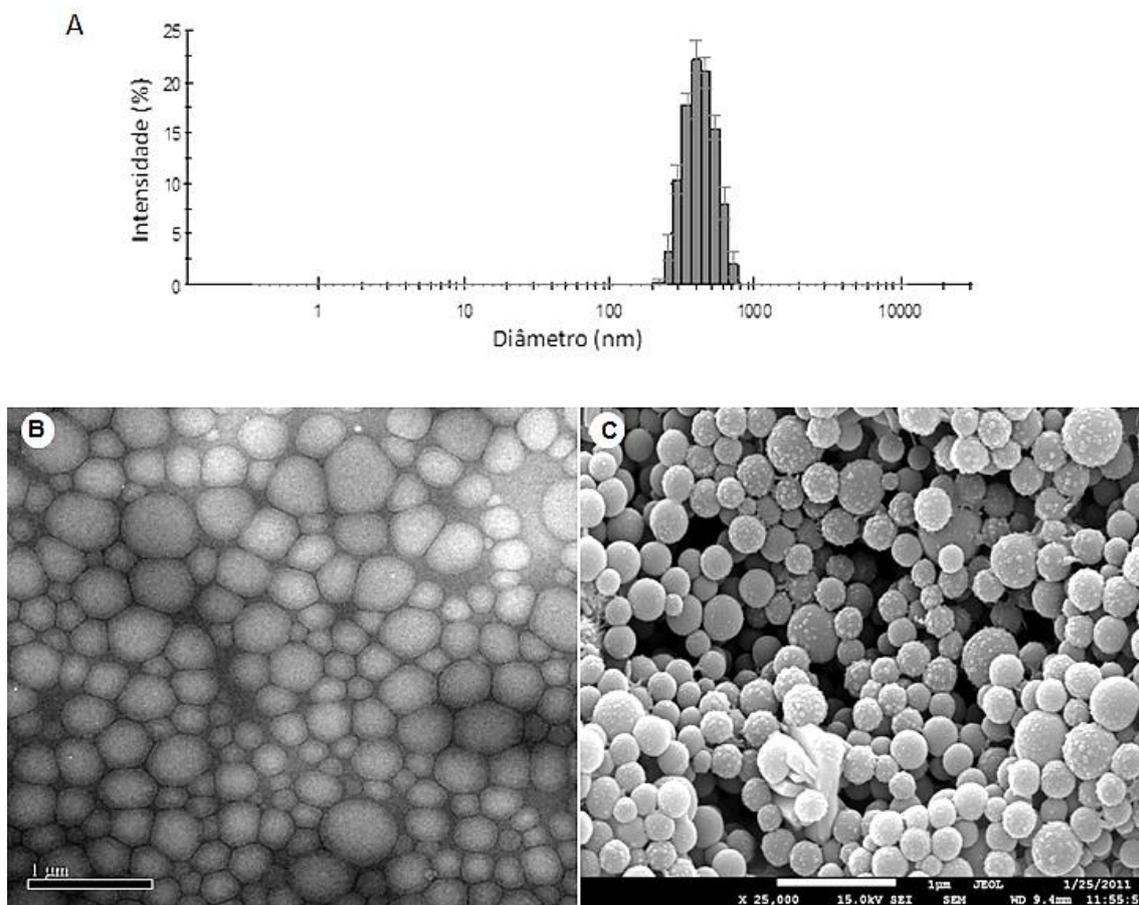


Figura 5. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico (DH) (nm) de nanocápsulas de selo estabilizadas pelo copolímero PVM/MA (A). Morfologia de nanocápsulas de selo avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (B) e microscopia eletrônica de varredura (C). Aumento: 25000 x.

A concentração de selol medida na formulação SNP foi aproximadamente 100% do esperado baseado na quantidade de selol inicialmente usada no processo de preparo (Tabela 3).

Tabela 3. Dosagem espectrofotométrica de selênio nas nanocápsulas de selol

Amostra	[Se] % (m:v)	[Se] teórica % (m:v)	% incorporação
Fresca	0,000347359	0,000335	103,6892529

$$(y = 446,8x + 0,0238; R^2 = 0,999). (m:v) = \text{massa: volume}$$

A formulação SNP mostrou-se estável à temperatura ambiente (TA) por ao menos 120 dias (Tabela 4). Nesta condição, nenhuma mudança estatisticamente significativa ($p > 0,05$) no DH até o período de 120 dias foi observada. No entanto, 240 dias após a síntese foi evidenciada uma redução de aproximadamente 20 nm no DH ($p < 0,05$). Quando estocada a 4°C, o DH médio de SNP aumentou cerca de 40 nm no primeiro dia e então permaneceu estável até 120 dias. Assim como foi verificado no armazenamento à temperatura ambiente, uma pequena diminuição do DH foi observada em 240 dias a 4°C. Em ambos TA e 4°C, os índices de polidispersão permaneceram abaixo de 0,1, demonstrando que as populações das nanocápsulas permaneceram monodispersas. A -20°C, variações significantes foram observadas em ambos DH e PdI ($> 0,3$). Após os ciclos de congelamento e descongelamento, nenhuma mudança significativa no DH e PdI foi encontrada até o oitavo ciclo. Em todas as condições testadas, o Zp das nanocápsulas esteve geralmente entre -25 e -30 mV.

Tabela 4. Avaliação da estabilidade termodinâmica da formulação SNP.

Formulação	Diâmetro hidrodinâmico ± D.P. (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
<u>Temperatura ambiente</u>			
Dia 0	344,4 ± 4,8 ^a	0,061	-29,3
Dia 15	349,7 ± 8,2 ^a	0,049	-29,7
Dia 30	338,9 ± 6,4 ^a	0,046	-29,2
Dia 45	344,3 ± 2,0 ^a	0,034	-26,5
Dia 60	336,6 ± 4,6 ^a	0,043	-29,4
Dia 120	333,9 ± 2,9 ^a	0,023	-29,1
Dia 240	325,1 ± 5,6 ^b	0,033	-29,9
<u>4°C</u>			
Dia 0	344,4 ± 4,8 ^a	0,061	-29,3
Dia 1	390,2 ± 1,0 ^b	0,054	-29,3
Dia 15	391,3 ± 7,5 ^b	0,044	-25,1
Dia 30	373,9 ± 15,0 ^b	0,046	-27,8
Dia 45	381,6 ± 8,9 ^b	0,031	-30,1
Dia 60	380,6 ± 7,1 ^b	0,039	-27,3
Dia 120	382,6 ± 3,7 ^b	0,018	-30,2
Dia 240	367,1 ± 7,7 ^c	0,057	-29,8
<u>-20° C</u>			
Dia 0	344,4 ± 4,8 ^a	0,061	-29,3
Dia 1	414,2 ± 7,7 ^b	0,074	-29,2
Dia 15	408,2 ± 10,7 ^b	0,113	-27,0
Dia 30	471,0 ± 1,3 ^c	0,195	-27,4
Dia 45	615,2 ± 13,3 ^c	0,278	-29,8
Dia 60	566,3 ± 14,8 ^c	0,196	-26,5
<u>Congelamento (-20° C) e descongelação</u>			
Nenhum ciclo	344,4 ± 4,8	0,061	-29,3
I	414,2 ± 7,7	0,074	-29,2
II	414,1 ± 10,0	0,066	-28,9
III	406,7 ± 4,5	0,035	-28,9
IV	410,2 ± 4,7	0,045	-28,1
V	416,5 ± 4,3	0,064	-22,9
VI	405,5 ± 6,0	0,046	-28,5
VII	425,8 ± 0,9	0,079	-28,8
VIII	467,3 ± 9,9	0,143	-27,0
IX	486,5 ± 17,1*	0,106	-28,8
X	495,1 ± 1,0*	0,177	-30,8
XI	509,3 ± 6,6*	0,221	-28,9
XII	566,2 ± 3,5*	0,364	-28,7
XIII	865,1 ± 50,4*	0,581	-27,7
XIV	989,1 ± 26,6*	0,433	-26,9
XV	1027,5 ± 60,7*	0,393	-28,8

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (D.P.) da média. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os DHs de SNP nas diferentes condições de estoque e tempo comparados aos DHs dos dias 0 e 1 (p<0,05). O dia 0 representa o DH de SNP após a síntese. * representam os valores estatisticamente diferentes comparados ao primeiro ciclo de congelamento (-20°C) e descongelamento (p<0,05).

A fim de assegurar que os resultados obtidos no presente estudo foram provenientes dos efeitos das nanocápsulas de selol sem a interferência de contaminantes, certificou-se que as mesmas não possuíam contaminações com bactérias e/ou fungos (Figura 6).

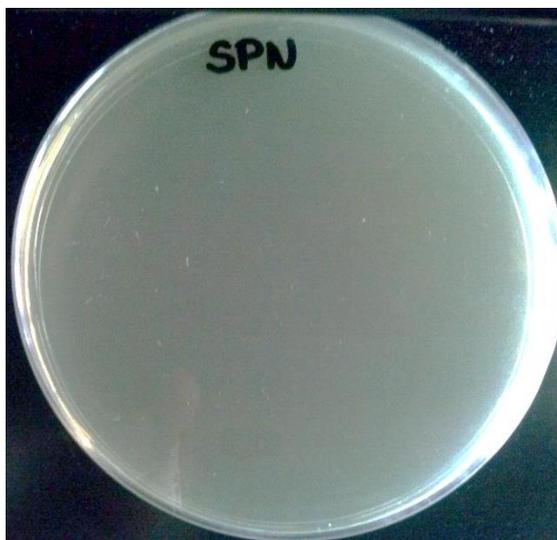


Figura 6. Avaliação de contaminação microbiana na formulação SNP em meio LB ágar.

6.2. Redução da viabilidade varia entre os diferentes tipos celulares

A linhagem celular NCIH 2170 não foi responsiva ao selol nas condições estudadas, e maior proliferação celular foi evidenciada após os tratamentos (Figura 7). Contrariamente, o tratamento dessas células com o selenito de sódio (SS) provocou redução da viabilidade celular, que se acentuou nas maiores concentrações e períodos de tratamento (Figura 7, C).

Percebeu-se, por microscopia de luz, que a linhagem celular NCIH 2170 manteve-se aglomerada em cultivo e não houve aparente redução do número de células. Além disso, as células não apresentaram alterações morfológicas em decorrência dos tratamentos com o selol, em sua forma livre (S) ou encapsulado (SNP) (Figura 8). A figura 8, D demonstra o padrão de alterações morfológicas dessas células após o tratamento com SS 100 µg/mL por 24 h. Várias células em suspensão foram detectadas em apenas 24 h de tratamento com o selenito de sódio. A análise em microscopia eletrônica revelou que as células NCIH 2170 apresentaram-se íntegras após os tratamentos com S e SNP, como visto pela integridade de suas organelas, núcleo e

membrana plasmática. Algumas vesículas foram características dessa linhagem celular e, portanto, foram evidenciadas em todas as condições estudadas (Figura 9). Devido à linhagem NCIH 2170 não ter sido responsiva ao selol, as demais investigações foram realizadas apenas para as células normais e A549.

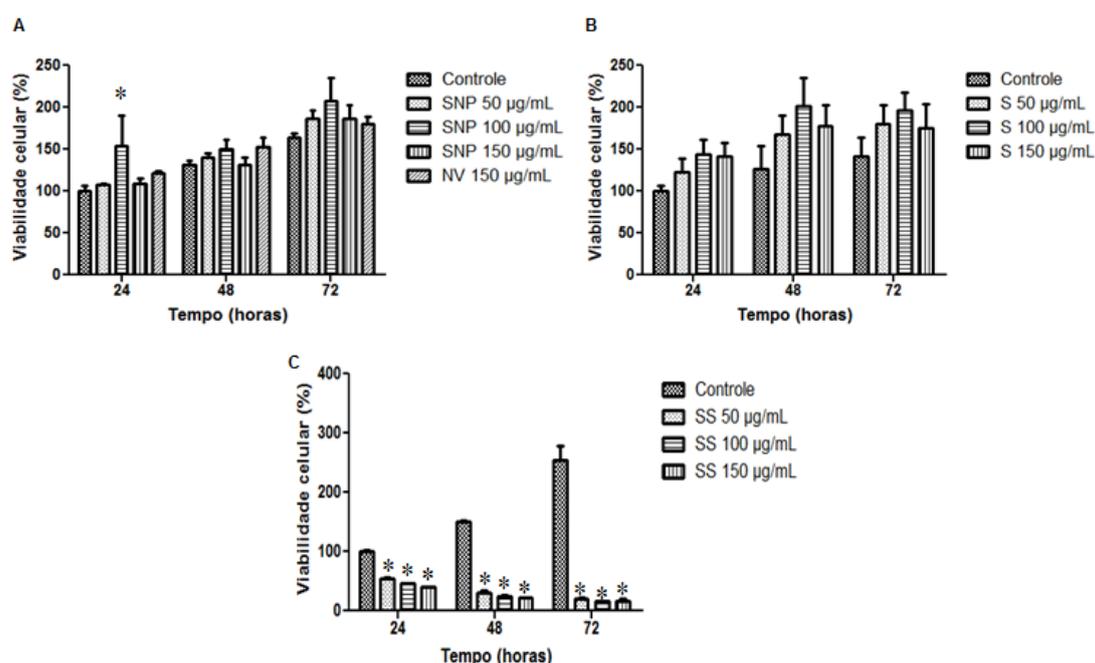


Figura 7. Viabilidade celular de NCIH 2170 após exposição ao selol encapsulado em nanocápsulas (SNP), nanopartículas vazias (NV) (A), selol livre (S) (B) e selenito de sódio (SS) por 24 h, 48 h e 72 h. Dados representam média \pm erro padrão. * representa valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

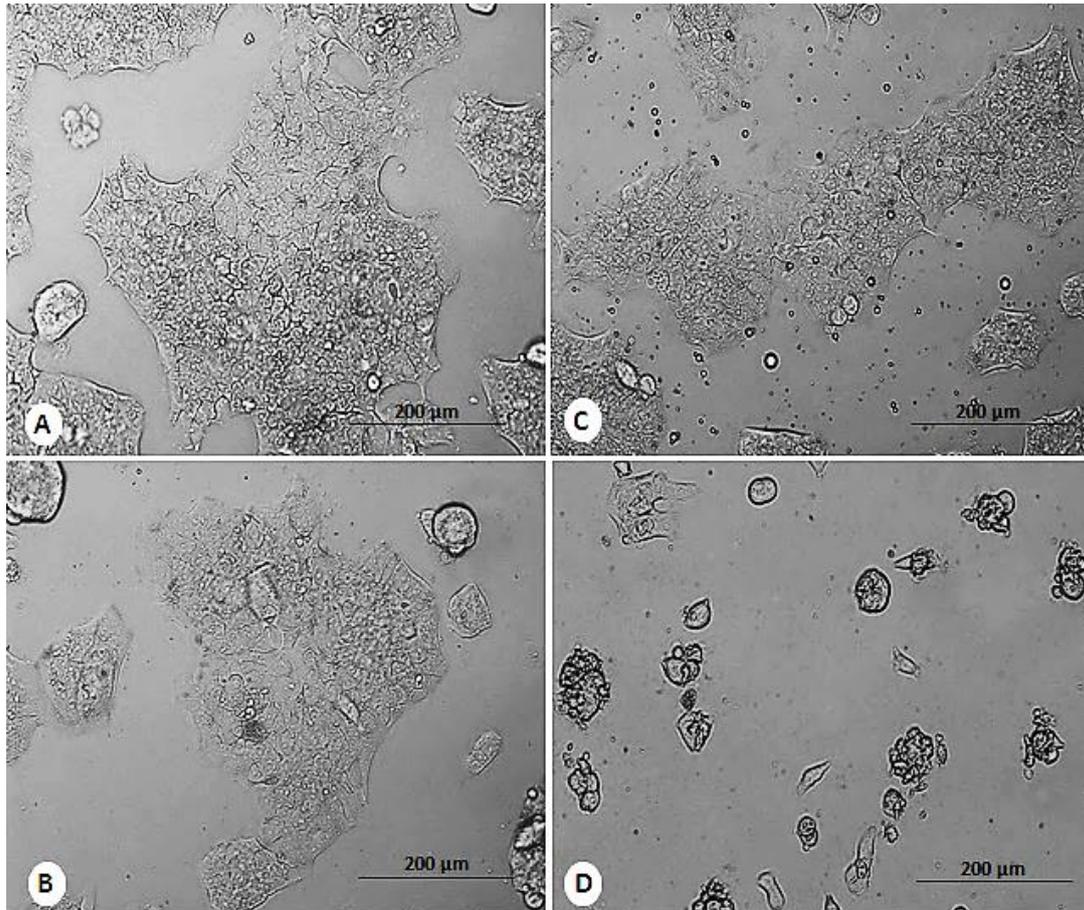


Figura 8. Morfologia das células NCIH 2170 controle (A) e tratadas com o selol encapsulado (B) e livre (C) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de selênio por 72 h. Células tratadas com o selenito de sódio (100 $\mu\text{g Se/mL}$) por 24 h são apresentadas em D. Aumento 200 x.

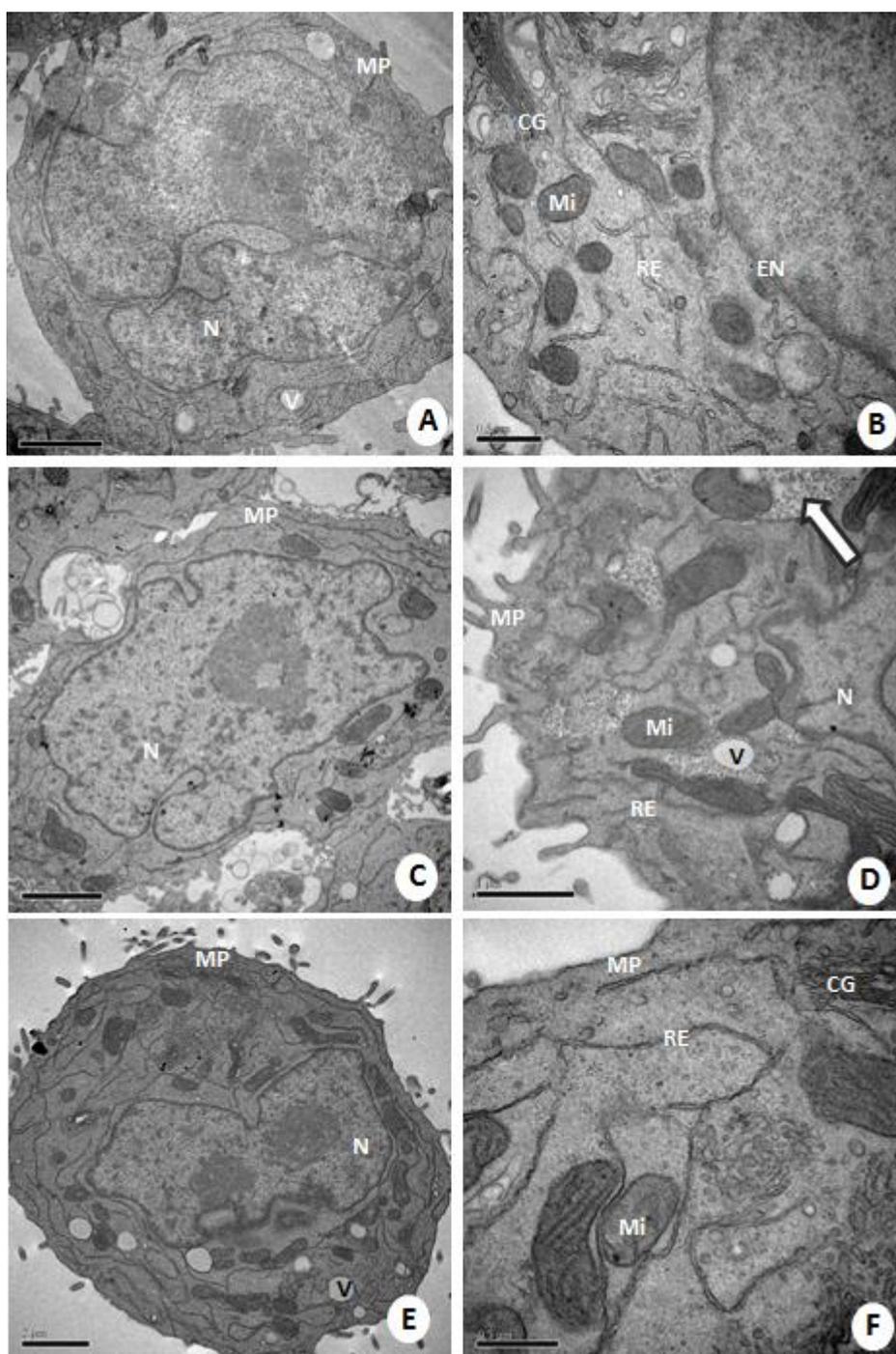


Figura 9. Morfologia ultraestrutural de células escamosas de carcinoma de pulmão (NCIH 2170) controle (A e B), tratadas com selo livre (S) (C e D) e selo encapsulado (SNP) (E e F). Nota-se a integridade das mitocôndrias (Mi), retículo endoplasmático (RE), membrana plasmática (MP), núcleo (N) e envoltório nuclear (EN) nas células controle e tratadas. Vacúolos (V) foram observados em todos os grupos experimentais. Digestão do selo livre (seta) em partículas menores em D. Em C, D, E e F as células foram tratadas com 100 $\mu\text{g Se/mL}$.

Diferentemente da linhagem NCIH 2170, as células A549 e normais (não tumorais) apresentaram reduções da viabilidade causadas pelo selol, que foram variáveis entre os tipos celulares (Figura 10). O ensaio do MTT demonstrou que as nanopartículas de PVM/MA sem selol (NV) não afetaram significativamente as viabilidades das células estudadas (Figura 10, A e C). Reduções significantes na viabilidade celular em A549 foram observadas após as exposições a S e SNP nas concentrações de 50 µg/mL por 72 h, e 100 e 150 µg/mL por 48 e 72 h ($p < 0,05$). Por outro lado, as células normais mostraram-se menos sensíveis ao selol comparadas às células tumorais. O selol livre reduziu a viabilidade das células normais após 48 h, enquanto SNP reduziu a viabilidade somente em 72 h de incubação. SS foi altamente tóxico para ambos os tipos celulares, em todas as concentrações e tempos testados (Figura 10, E e F).

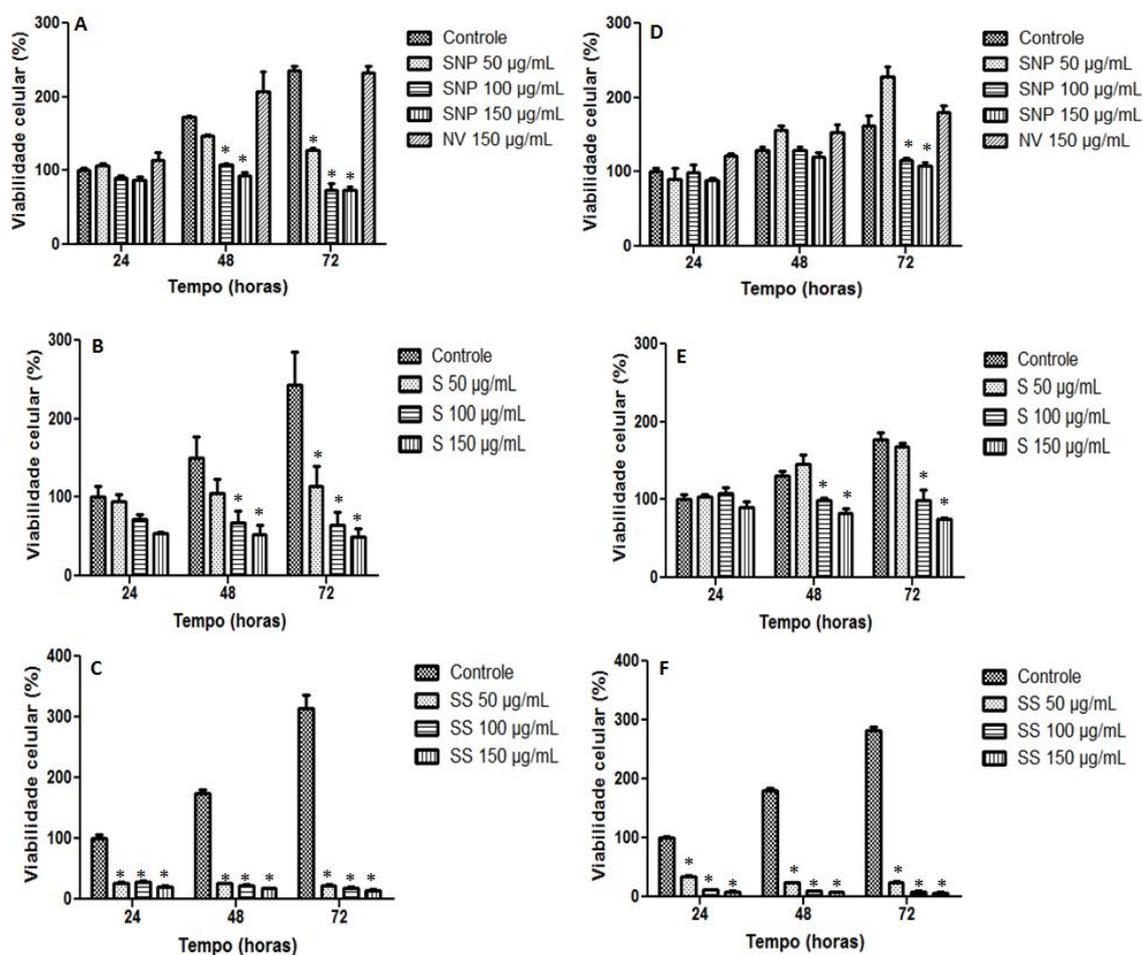


Figura 10. Viabilidade de células A549 (A, B, C) e células normais (D, E, F) após exposição às nanocápsulas de selol (SNP) (A, D), selol livre (S) (B, E), nanopartículas

poliméricas sem selol (NV) (A, D) e selenito de sódio (SS) (C, F) por 24 h, 48 h e 72 h. As células foram tratadas com 50, 100 e 150 $\mu\text{g Se/mL}$. Os dados foram expressos como porcentagem de células viáveis \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. Todos os valores foram normalizados de acordo com o grupo controle de 24 h (100%). A proliferação das células controle foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). * representa valores estatisticamente significantes comparados ao grupo controle do período de tempo correspondente ($p < 0,05$).

A formulação SNP foi sempre utilizada durante o período de 60 dias após o preparo, uma vez que sua atividade biológica não foi alterada durante o estoque a 4°C por esse período de tempo ($p > 0,05$) (Figura 11).

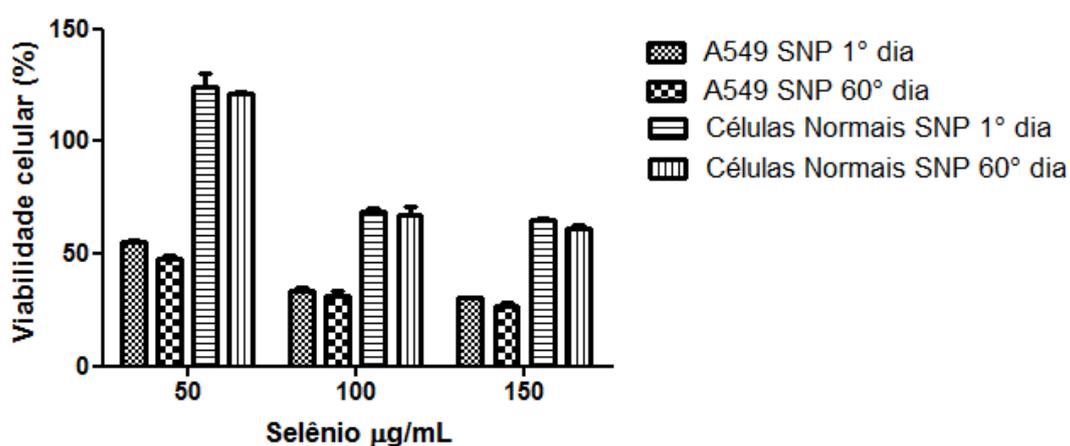


Figura 11. Viabilidade de células A549 e normais tratadas com a formulação de nanocápsulas de selol (SNP) nos 1º e 60º dias após o estoque a 4°C . As células foram tratadas com 50, 100 e 150 $\mu\text{g Se/mL}$ por 72 h e os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média das porcentagens de células viáveis. Não foi encontrada diferença significativa entre os resultados para SNP 1º dia e SNP 60º dia ($p > 0,05$).

6.3. SNP reduz a proliferação e promove bloqueio no ciclo celular

Conforme esperado, ambas as células A549 e normais não tratadas (Ctl) proliferaram em cultura, como evidenciado pelo aumento na concentração de células (células/mL) em função do tempo ($p < 0,001$ para ambos 24 h vs 48 h e 48 h vs 72 h para A549; $p < 0,01$ para 24 h vs 48 h e $p < 0,05$ para 48 h vs 72 h para as células normais) (Figura 12). O tratamento com SNP reduziu a proliferação de ambas as células, mas a

intensidade deste efeito foi dependente do tipo celular. A concentração de células normais e tumorais tratadas com SNP não variou com o tempo de tratamento ($p > 0,05$). Reduções de $40,4\% \pm 2,7\%$ e $64,7\% \pm 1,7\%$ na concentração de células A549 tratadas com SNP foram evidenciadas em 48 h ($p < 0,001$) e 72 h ($p < 0,001$), respectivamente, relativas às células A549 controle. As células normais, no entanto, foram afetadas em menor intensidade, visto que redução significativa na concentração de células tratadas com SNP foi observada somente em 72 h ($24,8\% \pm 6,7\%$, $p < 0,01$) comparada às células normais controle.

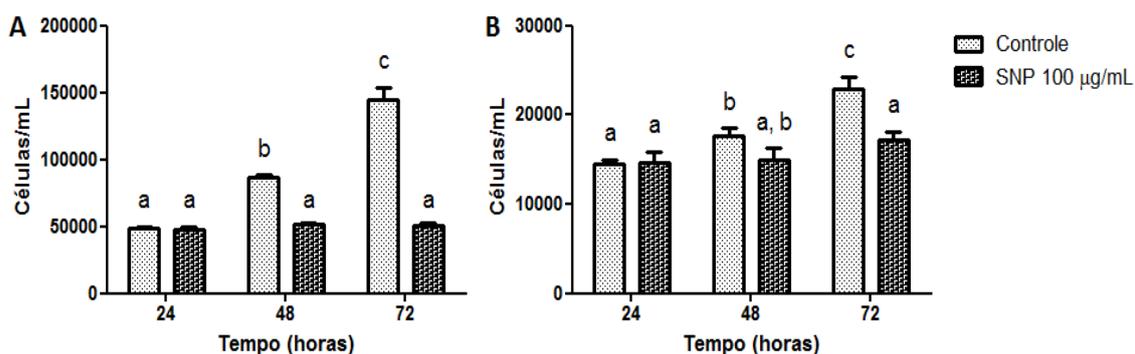


Figura 12. Influência das nanocápsulas de selol (SNP) (100 µg/mL) na proliferação de células A549 (A) e normais (B) avaliadas após 24 h, 48 h e 72 h. Os pares de médias no mesmo gráfico identificadas com diferentes letras são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As barras de variação representam o desvio padrão em torno da média.

Em decorrência dos resultados apresentados, foi realizado o monitoramento do índice celular em tempo real com as células A549. O índice celular avaliado correspondeu ao índice de células aderidas ao fundo da placa de cultivo. Alterações nos índices celulares em comparação ao grupo controle foram evidenciadas a partir das primeiras horas de tratamento com a formulação SNP, que se tornaram mais expressivas nas maiores concentrações e tempos (Figura 13). Aumentos nos índices celulares foram detectados até 20 h, 28 h e 56 h após os tratamentos SNP nas concentrações de 150 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente. Nas concentrações de 100 µg/mL e 150 µg/mL, os maiores índices celulares foram alcançados quando havia 60% de células vivas em relação ao grupo controle. A partir dos tempos mencionados, os índices celulares permaneceram constantes e posteriormente diminuíram (a partir de 37 h, 40 h

e 63 h nas concentrações de 150 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente). Em conformidade com os resultados prévios, os índices celulares em SNP 100 µg/mL foram praticamente invariáveis nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. As porcentagens de células vivas avaliadas em relação ao controle após os períodos de tratamento de 24 h, 48 h e 72 h são demonstradas na figura 14.

Ressalta-se que a avaliação do índice celular em tempo real e a contagem das células em contador automático Scepter™ Cell Counter® não foram realizadas para as células tratadas com o selol livre, uma vez que as gotículas de selol impossibilitaram a realização desses ensaios.

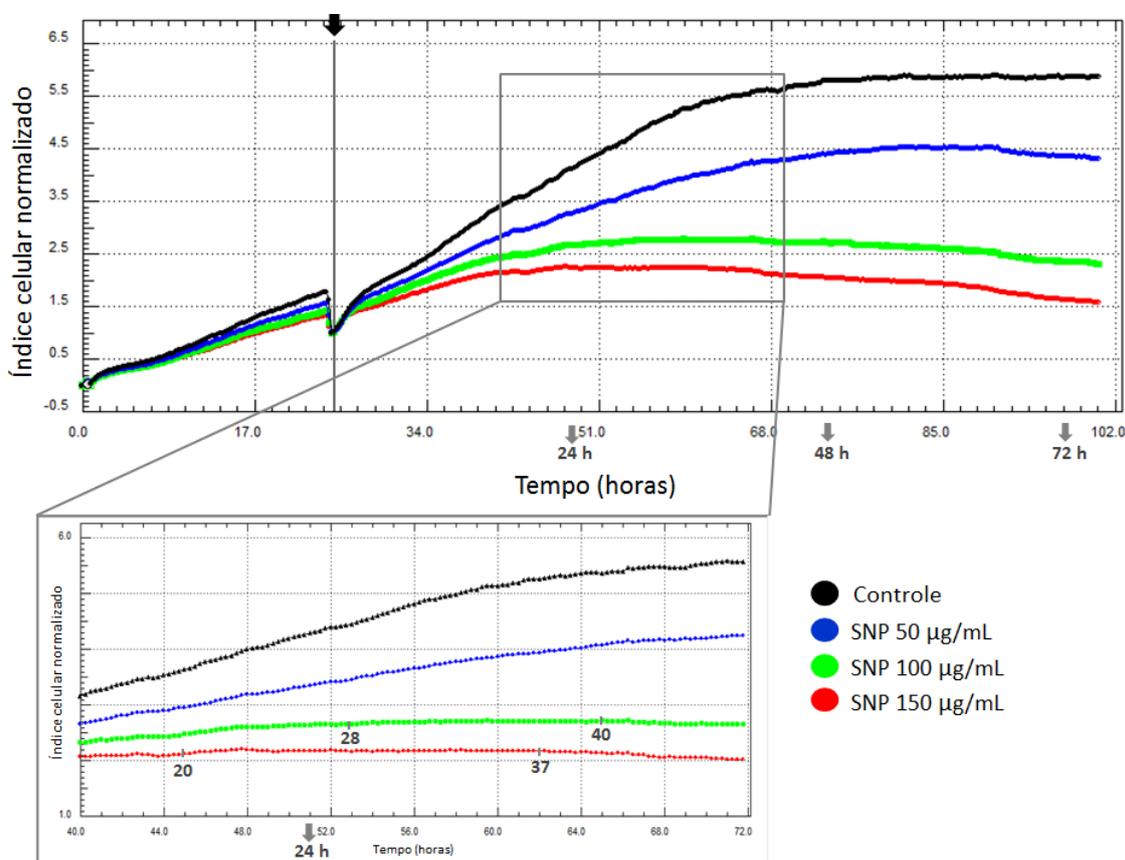


Figura 13. Índices celulares em tempo real de células A549 controle e tratadas com as nanocápsulas de selol (SNP) 50 µg/mL, 100 µg/mL e 150 µg/mL durante 100 horas de monitoramento. A linha vertical cinza indicada por uma cabeça de seta representa o tempo de adição dos tratamentos (24 h após o plaqueamento), a partir do qual o índice celular foi normalizado. As setas cinza nos tempos de 49 h, 73 h e 97 h correspondem aos tempos de tratamento de 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente. A imagem inferior apresenta um maior detalhamento do ensaio de monitoramento dinâmico no intervalo de 15 h a 47 h. Os intervalos de tempo de 20 h a 37 h e de 28 h a 40 h indicam os períodos

em que os índices celulares das concentrações de 150 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente, permaneceram constantes.

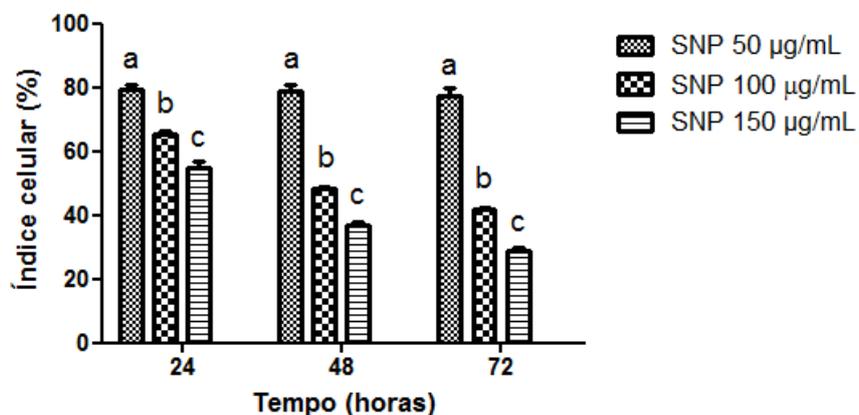


Figura 14. Índices de células A549 tratadas com a formulação de nanocápsulas de selol (SNP) nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. O índice celular foi calculado em relação ao grupo controle. As diferentes letras representam diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações avaliadas em cada tempo ($p < 0,05$). As barras apresentam a média \pm erro padrão.

Esses dados corroboram os resultados do ensaio do MTT, da contagem celular em contador automático e a confluência das células observada em microscopia de luz, a qual também demonstrou mais intensa redução na confluência das células A549 comparada às células normais, ambas tratadas com SNP (Figura 15). Além disso, o tratamento das células A549 com SNP apresentou uma proporção significativamente maior de células bloqueadas na fase G2/M do ciclo celular comparada às células A549 controle (Tabela 5). Esses experimentos não foram realizados com o selol livre, uma vez que este formou gotículas que interferiram com a qualidade dos dados.

Os experimentos subsequentes com SS, S e SNP foram realizados com a concentração de 100 µg Se/mL, uma vez que esta foi a menor concentração nos tratamentos S e SNP que reduziu significativamente a viabilidade das células A549.

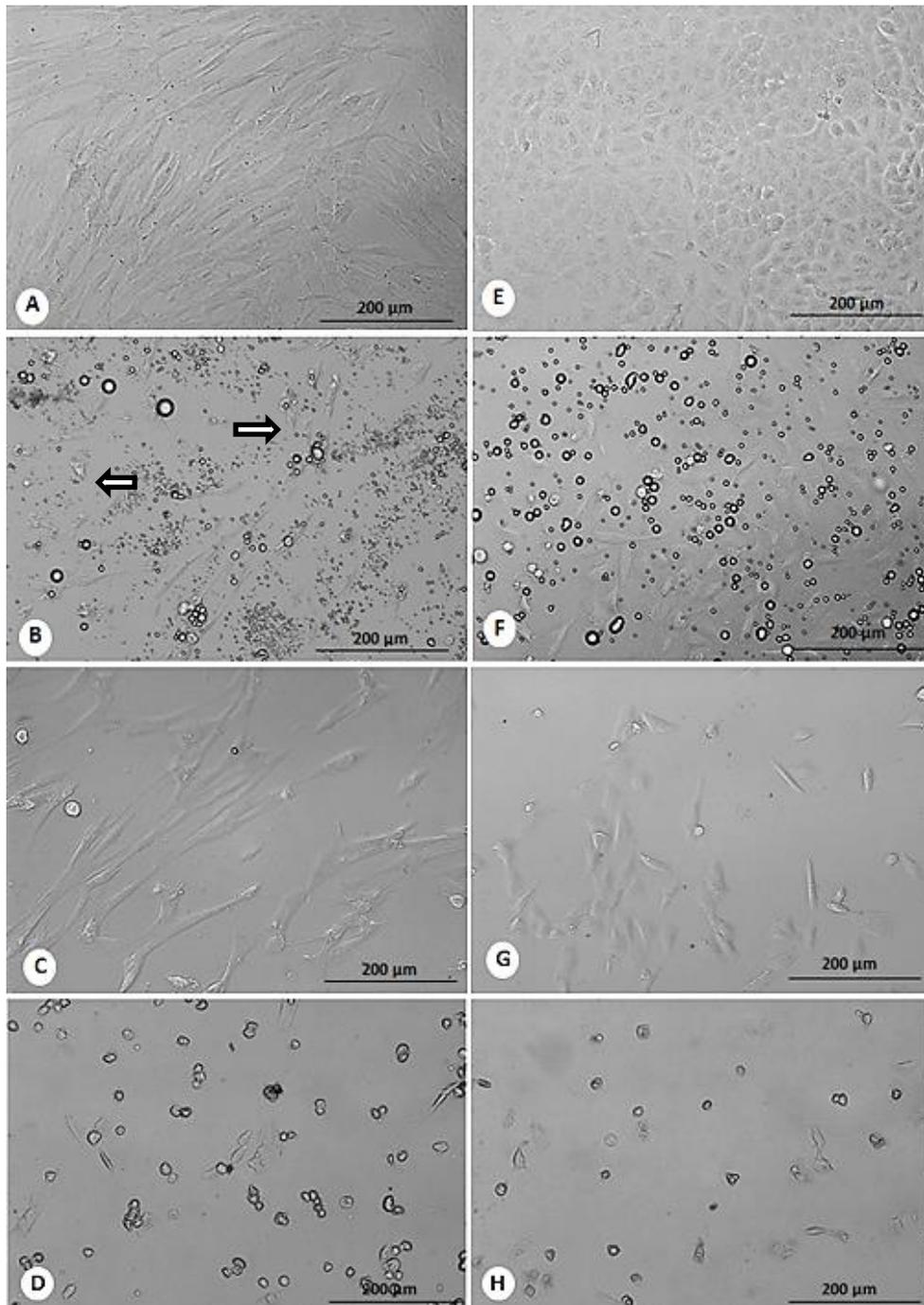


Figura 15. Morfologia e confluência das células normais (A, B, C, D) e A549 (E, F, G, H) não tratadas (A, E), expostas ao selol livre (S) (B, F) e em nanocápsulas (SNP) (C, G) por 72 h. Morfologia e confluência das células tratadas com o selenito de sódio em 24 h (D, H). Retração das projeções citoplasmáticas nas células normais após o tratamento com o selol livre (setas) (B). Estruturas esféricas brancas com bordas pretas correspondem às gotículas de selol livre (B, F). Aumento 200 x.

Tabela 5. Efeito do tratamento com nanocápsulas de selol (SNP) na distribuição das células A549 nas fases do ciclo celular.

A549	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Controle 48 h	69,6 ± 2,9	18,4 ± 2,3	12,2 ± 1,3
SNP 48 h	56,6 ± 3,8	26,5 ± 0,9	16,9 ± 3,7 *
Controle 72 h	70,7 ± 3,9	18,8 ± 2,9	10,6 ± 1,7
SNP 72 h	56,2 ± 1,3	25,0 ± 1,9	18,7 ± 2,7 *

* $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e apresentados como a média ± erro padrão da média.

6.4. Aspectos morfológicos sugerem baixa taxa de morte celular

A avaliação por microscopia de contraste de fase revelou que o selol em encapsulado e o selol livre não induziram alterações morfológicas nas células A549. O tratamento SNP também não induziu alterações morfológicas nas células normais, visto que a maioria delas apresentou-se fusiformes e com projeções citoplasmáticas, conforme esperado. Por outro lado, o selol livre induziu visíveis retrações citoplasmáticas (setas) nas células normais (Figura 15). Alterações morfológicas bem evidentes foram induzidas por SS em ambos os tipos celulares (Figura 15, D e H).

S e SNP induziram exposição da fosfatidilserina para o lado externo da membrana plasmática (anexina V⁺) e prejudicaram a integridade da membrana (PI⁺) somente em uma discreta porcentagem de células A549. Em 72 h de tratamento, somente 11,2% ± 0,6% ($p < 0,01$) e 12,9% ± 2,3% ($p < 0,001$) de células A549 foram positivas para PI e/ou anexina V após os tratamentos S e SNP, respectivamente (Figura 16). Nas células A549 controle, sem tratamento, esta porcentagem foi de 2,9% ± 0,5%.

Alguns sinais ultraestruturais de morte celular foram observados nas células A549 após o tratamento com o selol livre ou encapsulado. Alterações mitocondriais e intensa vacuolização foram aparentes (Figura 17). Citoplasma vacuolizado sugestivo de necrose também foi observado. Essas mudanças morfológicas sugerem que apoptose e necrose podem ser induzidas pelo tratamento com o selol. A maioria das células normais não apresentou qualquer alteração morfológica após o tratamento com SNP (Figura 18). No entanto, essas células apresentaram grandes endossomos preenchidos por um conteúdo que se assemelha às gotículas de selol e que foram frequentemente

detectados nas células expostas ao selol livre. A endocitose da gotícula de selol livre em ambas as células estudadas provocou compressão das organelas adjacentes. As células tratadas com SNP não apresentaram nanopartículas de selol visíveis.

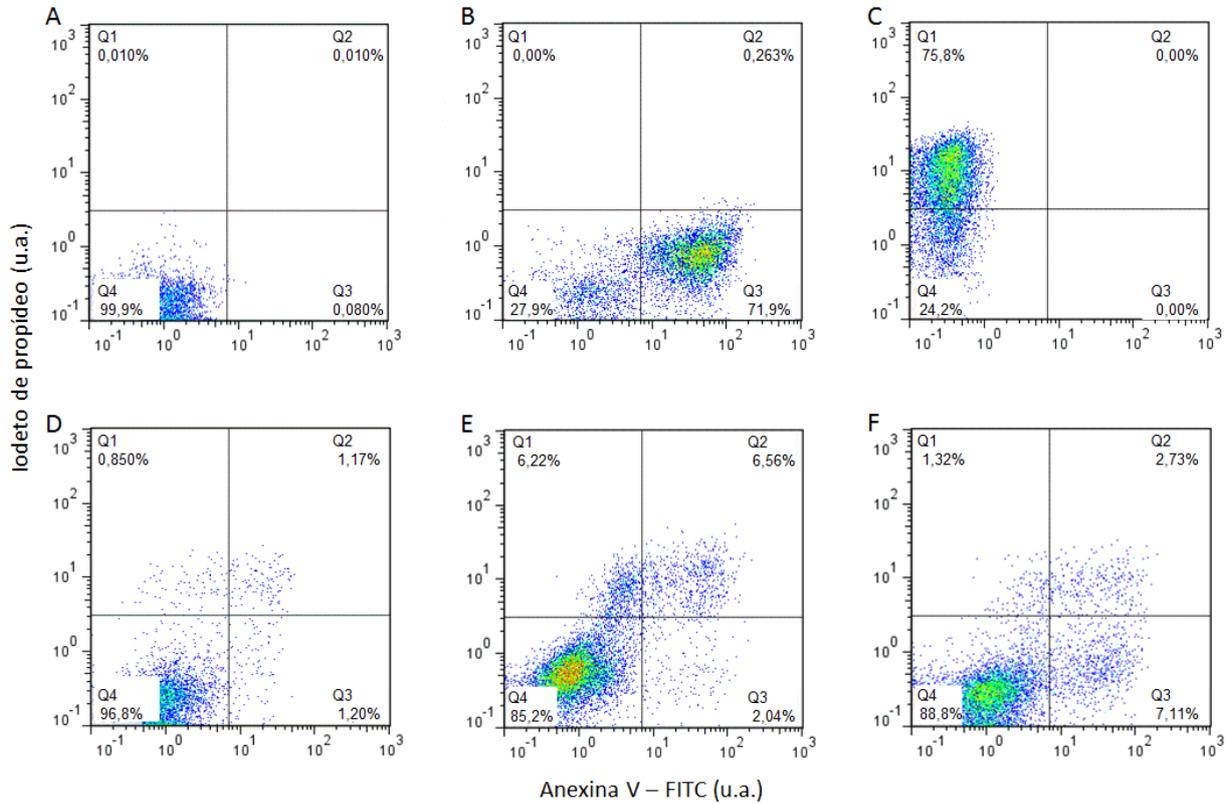


Figura 16. Influência do selol livre (S) e encapsulado (SNP) na membrana plasmática de células de adenocarcinoma de pulmão (A549). Células PI⁺: Q1. Células anexina V⁺: Q3. Células duplo positivas: Q2. Células negativas para PI e anexina V: Q4. Controle negativo (A). Controle anexina V⁺ (B). Controle PI⁺ (C). Células sem tratamento (D). Células tratadas com selol livre (E) e encapsulado (SNP) (F) por 72 h (100 µg/mL). Os dados são representativos de três experimentos independentes.

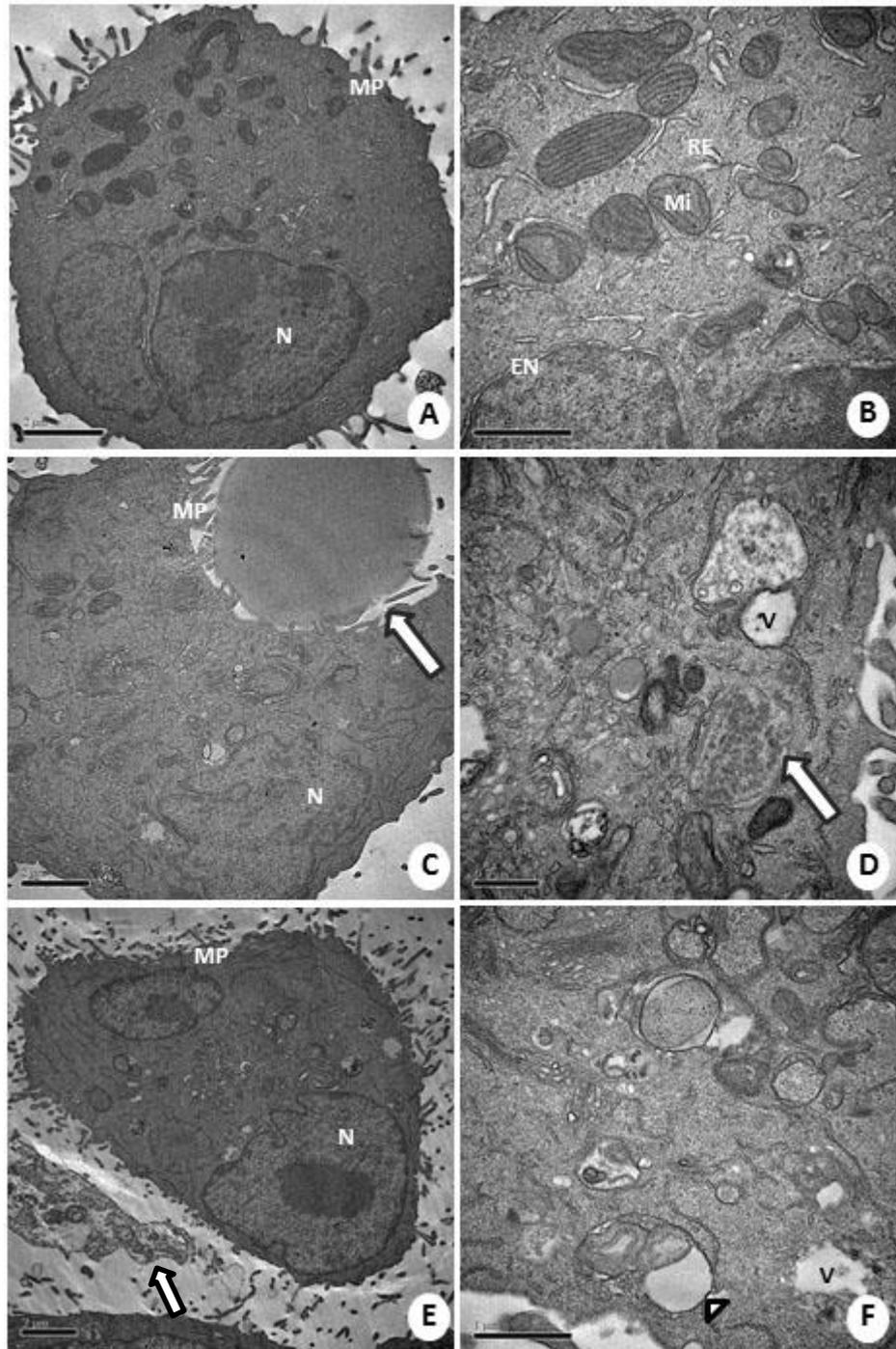


Figura 17. Morfologia ultraestrutural das células A549: células não tratadas (controle) (A, B), tratadas com selol livre (C, D) e nanocápsulas de selol (E, F). Note a integridade das mitocôndrias (Mi), retículo endoplasmático (RE), membrana plasmática (MP), núcleo (N), envelope nuclear (EN) e citosol das células controle. Em C demonstra-se a endocitose de uma gotícula de selol (seta) e em D a seta aponta para um endossomo, uma característica frequente nesse grupo. Características citoplasmáticas de células necróticas (E) (seta). Intensa formação de vacúolos (V) e mudança na morfologia das mitocôndrias (cabeça da seta) podem ser evidenciadas em D e F. Em C, D, E e F as células mostradas foram tratadas com 100 $\mu\text{g Se/mL}$.

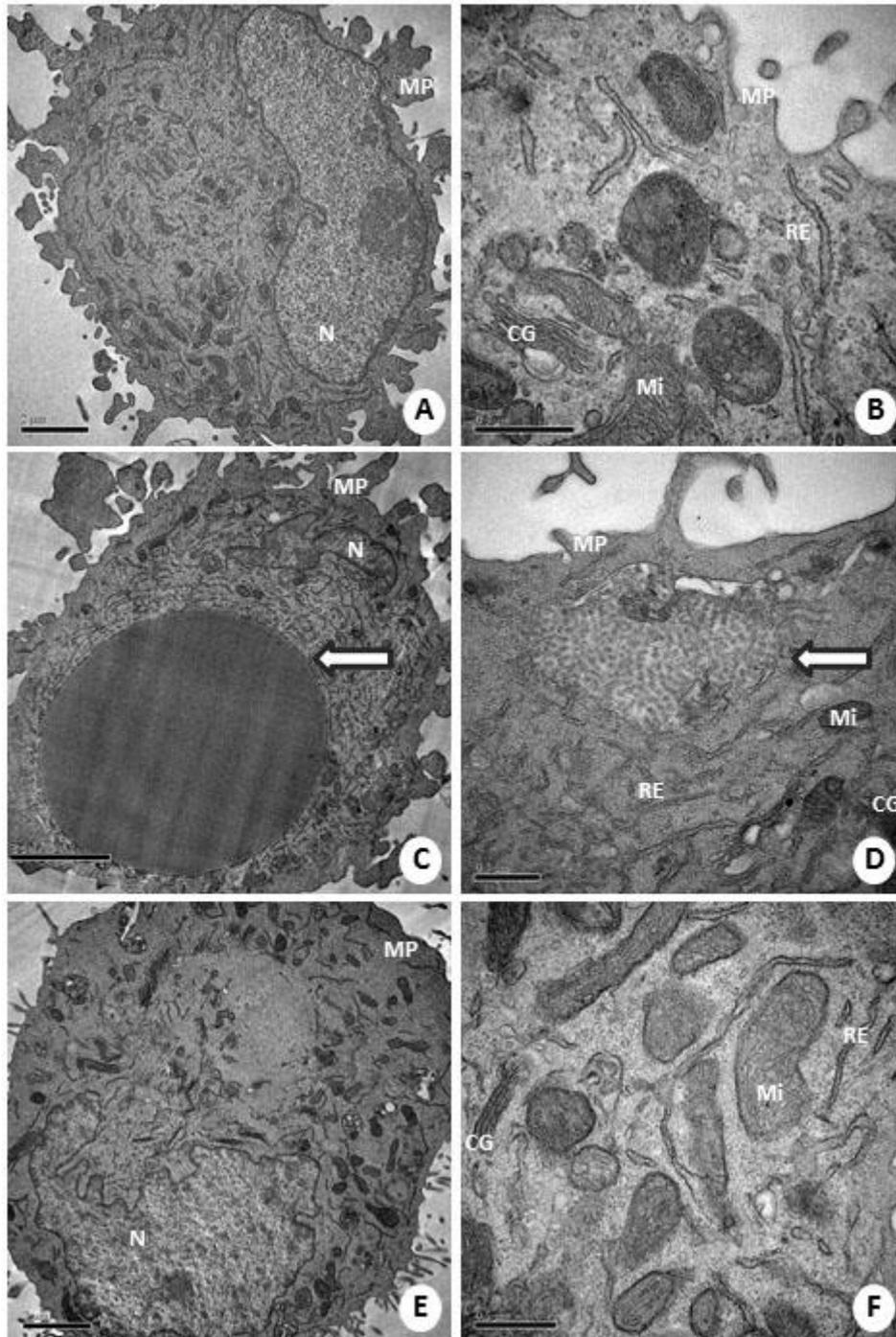


Figura 18. Morfologia ultraestrutural das células não tumorais: células não tratadas (controle) (A, B), tratadas com selol livre (C, D) e nanocápsulas de selol (E, F). Em A e B é possível observar que mitocôndria (Mi), retículo endoplasmático (RE), complexo de golgi (CG), núcleo (N) e membrana plasmática (MP) das células controle apresentaram morfologia normal, como esperado. Em C nota-se uma gotícula de selol livre englobada (seta) e em D um endossomo (seta) característico das células tratadas com o selol livre. O tratamento com as nanocápsulas não alterou a morfologia ultraestrutural das células normais (E, F). A concentração de Se para os tratamentos das células em C, D, E e F foi 100 $\mu\text{g/mL}$.

6.5. Dano ao DNA e alterações no potencial de membrana mitocondrial

O tratamento com SNP causou um aumento na porcentagem de células A549 apresentando potencial de membrana mitocondrial reduzido ($\Delta\Psi_m$) comparado às células controle em 48 h ($14,5\% \pm 4,2\%$, $p < 0,05$) e 72 h ($22,8\% \pm 5,4\%$, $p < 0,001$) (Figura 19). A figura 19, B apresenta o $\Delta\Psi_m$ das células A549 controle e tratadas com SNP em 72 h. Esses resultados são compatíveis com os danos mitocondriais evidenciados pela análise ultraestrutural.

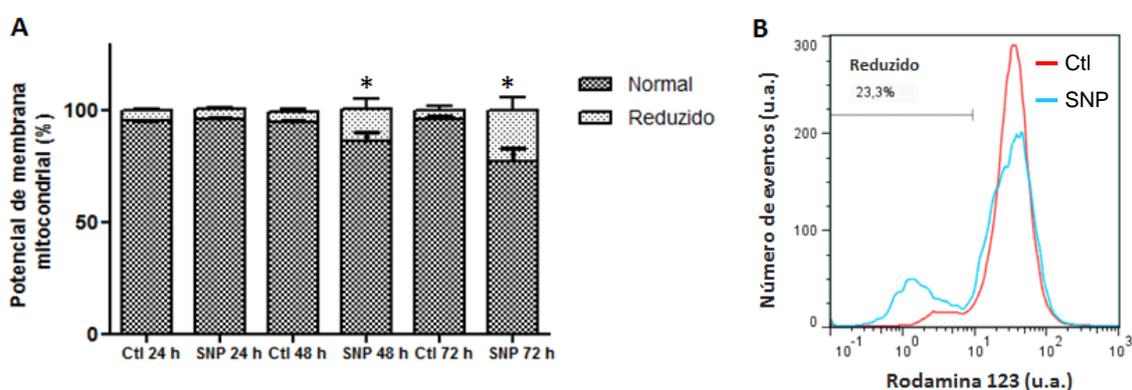


Figura 19. Potencial de membrana mitocondrial das células A549 não tratadas (Ctl) e tratadas com as nanocápsulas de selol (SNP) 100 μg Se/mL por diferentes tempos. * $p < 0,05$ para Ctl 48 h vs SNP 48 h; $p < 0,001$ para Ctl 72 h vs SNP 72 h. Os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes (A). O gráfico representativo apresenta todos os eventos analisados de uma amostra de células controle (linha vermelha) e uma amostra de células tratadas com SNP (linha azul) em 72 h (B).

Após o tratamento com SNP, a fragmentação de DNA aumentou em 48 h ($19,8\% \pm 1,1\%$ vs $3,6\% \pm 1,0\%$ para controle, $p < 0,001$) e 72 h ($24,0\% \pm 2,5\%$ vs $4,6\% \pm 1,0\%$ para controle, $p < 0,001$) (Figura 20). Além disso, foi também observada uma clara redução na porcentagem de células na fase G1 e um aumento na porcentagem de células na fase G2/M (Figura 20, B).

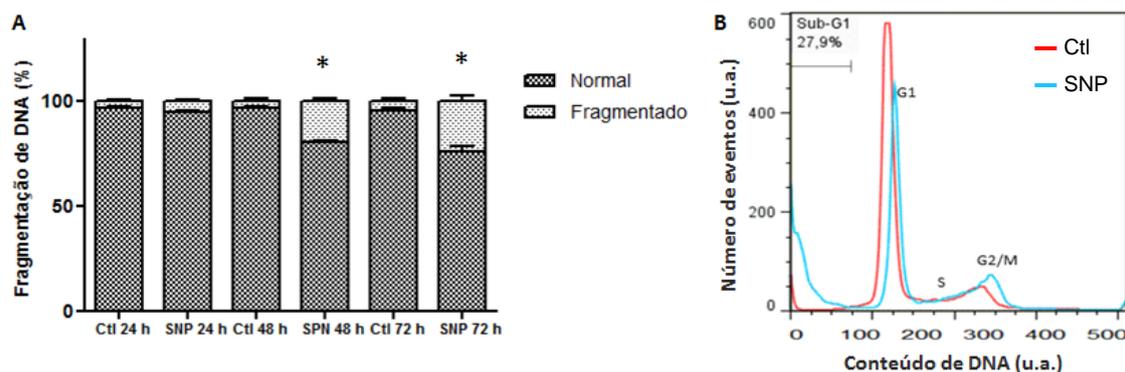


Figura 20. Fragmentação de DNA das células A549 não tratadas (Ctl) e tratadas com as nanocápsulas de selol (SNP 100 $\mu\text{g Se/mL}$) por diferentes tempos. * $p < 0,001$ por Ctl 48 h vs SNP 48 h; $p < 0,001$ por Ctl 72 h vs SNP 72 h. Experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (A). O histograma representativo apresenta as populações sub-G1, G1, S, G2/M, para ambos Ctl (linha vermelha) e SNP (linha azul) em 72 h. A população sub-G1 foi considerada positiva para a fragmentação de DNA (B).

6.6. Produção de EROs por células A549 tratadas com SNP

A exposição das células A549 à formulação SNP resultou em um aumento da produção de EROs dependente do tempo. Como mostrado na figura 21, A, as células A549 tratadas com SNP produziram EROs em tempos mais longos de exposição (24 h, 48 h e 72 h). No entanto, nas células promielocíticas/mieloblastos (HL60) não foi evidenciada produção de EROs na mesma concentração e tempos (Figura 21, B). Vale ressaltar que as células HL60 tratadas com PMA (controle positivo) foram positivas para a produção de EROs.

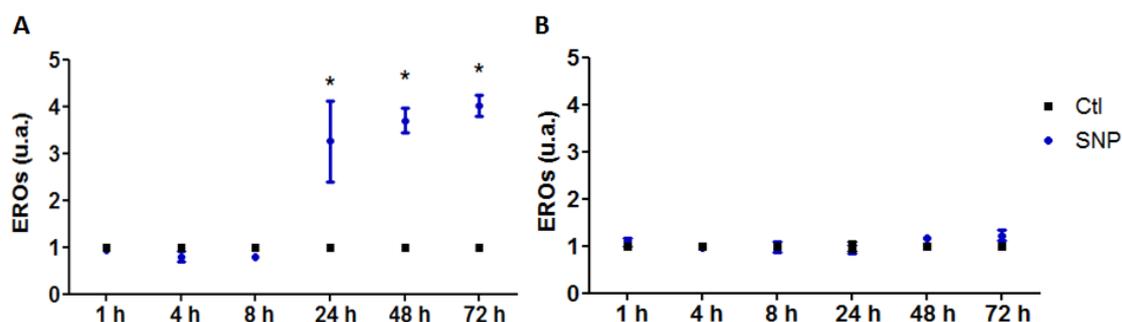


Figura 21. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células de adenocarcinoma de pulmão (A549) (A) e células promielocíticas/mieloblastos (HL60) (B) tratadas com as nanocápsulas de selol na concentração de 100 µg/mL (SNP). A produção de EROs das amostras tratadas com SNP foram normalizadas em função das amostras controle sem tratamento (Ctl). As barras representam a média ± erro padrão. * $p < 0,001$.

6.7. Bloqueio da proliferação e morte celular provocados pelas nanocápsulas de selol

Alterações sutis nos níveis dos transcritos do gene β -actina (*ACTB*) nas amostras tratadas com SNP em relação às amostras não tratadas foi evidenciada nesse estudo, não sendo, portanto, utilizado como gene constitutivo (Figura 22).

O aumento do período de tratamento demonstrou que as expressões de *CCNB1* (ciclina B1) e *CDC25C* declinaram drasticamente após 48 h (aproximadamente 17x (*CCNB1*) e 21x (*CDC25C*)) e 72 h (aproximadamente 25x (*CCNB1*) e 50x (*CDC25C*)) comparados ao grupo controle, ao passo que os níveis de RNAm de *WEE1* reduziram apenas à metade em ambos os tempos. Como podem ser evidenciadas na figura 22, as expressões gênicas de *CCNB1* e *CDC25C* foram reduzidas à metade no tratamento de 24 h. Contrariamente, nenhuma alteração significativa foi evidenciada nos níveis dos transcritos gênicos *CCND1* (ciclina D1) e *CCNE1* (ciclina E1) (FC (fold change) $< 2,0$).

Adicionalmente, os níveis dos transcritos relacionados à apoptose *BAX* (proteína X associada à família BCL-2, pró-apoptótica) e *BCL-2* (gene anti-apoptótico da família BCL-2) aumentaram após 48 h (2x e 3x para *BAX* e *BCL-2*, respectivamente) e 72 h (2x para ambos *BAX* e *BCL-2*) comparados com os controles dos respectivos tempos. Essas

alterações foram acompanhadas pelos aumentos das expressões gênicas dos genes relacionados ao estresse oxidativo *GPXI* (glutathiona peroxidase 1) (5x e 7x em 48 h e 72 h, respectivamente) e metabolismo de drogas *CYP1A1* (gene da superfamília citocromo P450) (4x em ambos 48 h e 72 h).

Os níveis de RNAm do gene da catalase foram avaliados a fim de verificar se as células estariam respondendo a um estresse oxidativo associado a essa enzima (Robertson *et al.*, 2012). Os transcritos do gene sirtuína 3 foram analisados com o intuito de verificar se a diminuição da proliferação celular provocada pelo selol estaria associada a uma diminuição do metabolismo energético coordenado pela principal desacetilase mitocondrial (sirtuína 3) (Li *et al.*, 2013). Como pode ser observado na figura 22, não foram evidenciadas alterações significativas nas expressões gênicas das enzimas *CAT* (catalase) e *SIRT3* (sirtuína 3), ($FC < 2,0$).

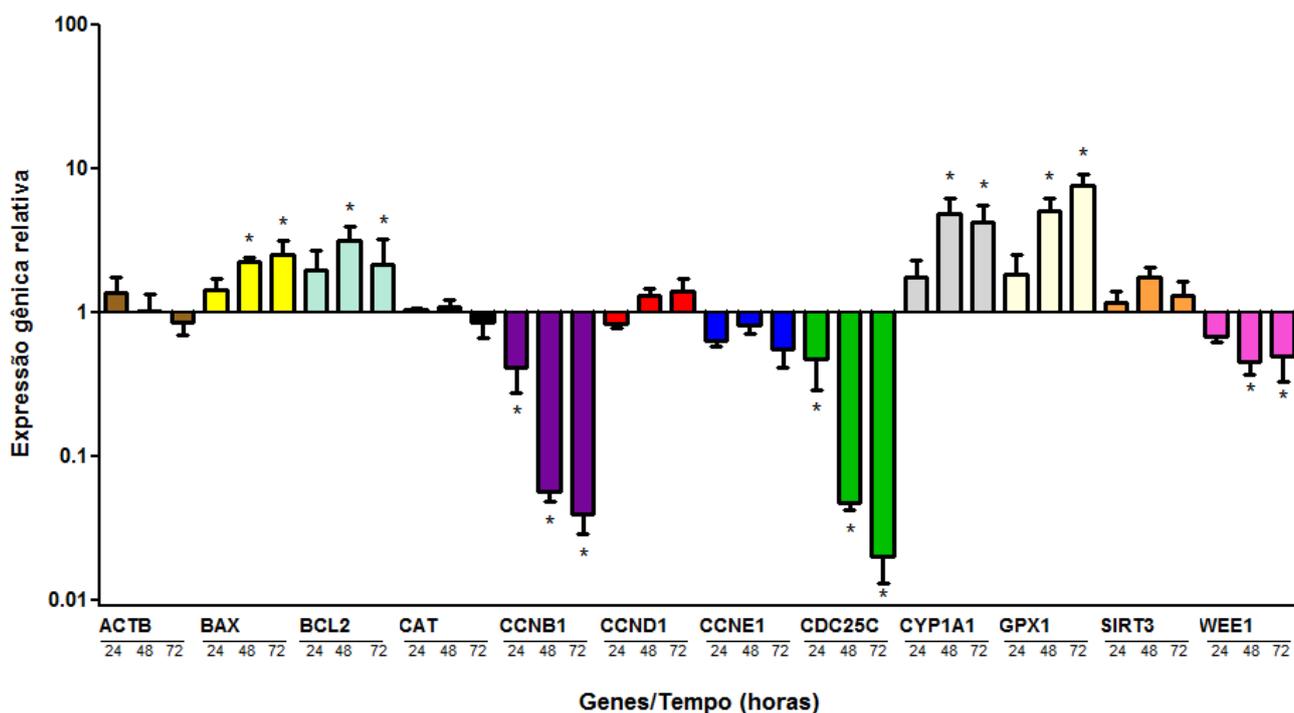


Figura 22. Expressão gênica relativa após o tratamento das células A549 com a formulação de nanocápsulas de selol (SNP 100 µg/mL) por 24 h, 48 h e 72 h. * *fold change* (FC) > 2,0.

6.8. Perda de peso corpóreo e óbito de animais em processo de indução de tumor

Durante o período de administração do uretano (1 mg/kg uma vez por semana, durante 4 semanas), observou-se que os camundongos encontravam-se debilitados e apresentaram perda de peso até a semana que se sucedeu à última aplicação do carcinógeno (Figura 23). A partir desse momento, ganho de peso foi observado nos animais em processo de indução, bem como nos animais não induzidos, até a semana equivalente ao início dos tratamentos (19ª semana).

No transcorrer das fases de iniciação e desenvolvimento do tumor, observou-se uma taxa de mortalidade de 20% dos animais, contabilizando ao final de 19 semanas 26 (80%) animais com tumor. Diferentemente, a taxa de sobrevivência dos animais sem tumor foi de 100% (5 animais).

A avaliação pré-clínica dos animais após a eutanásia revelou que os tumores induzidos por uretano corresponderam a múltiplos nódulos distribuídos por todos os lóbulos pulmonares (Figura 24). Além disso, os demais órgãos não apresentaram nódulos tumorais e/ou danos teciduais superficiais.

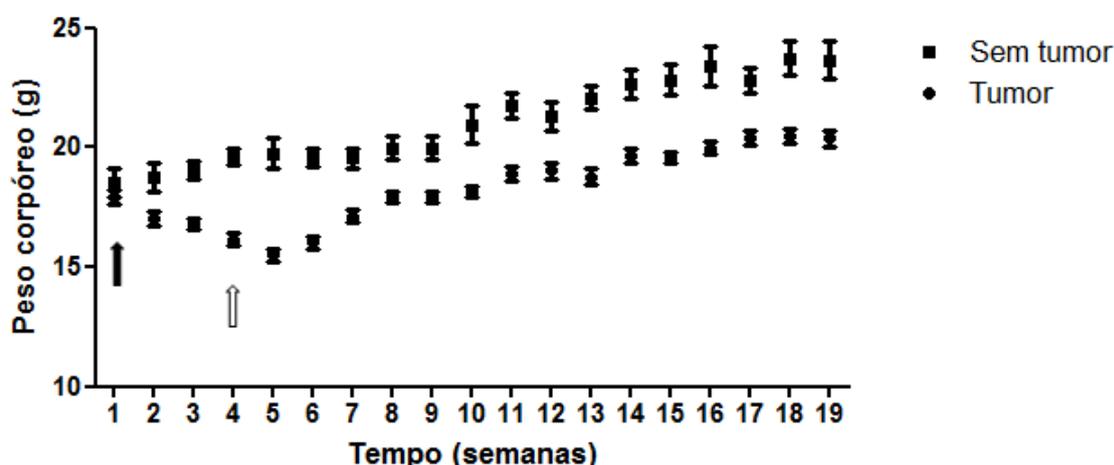


Figura 23. Evolução do peso corpóreo dos camundongos A/J em processo de indução do tumor (tumor) comparado aos animais A/J não induzidos (sem tumor). Os pesos dos animais foram verificados semanalmente a partir da primeira aplicação (seta preta) do uretano. A última aplicação do uretano é indicada pela seta branca.

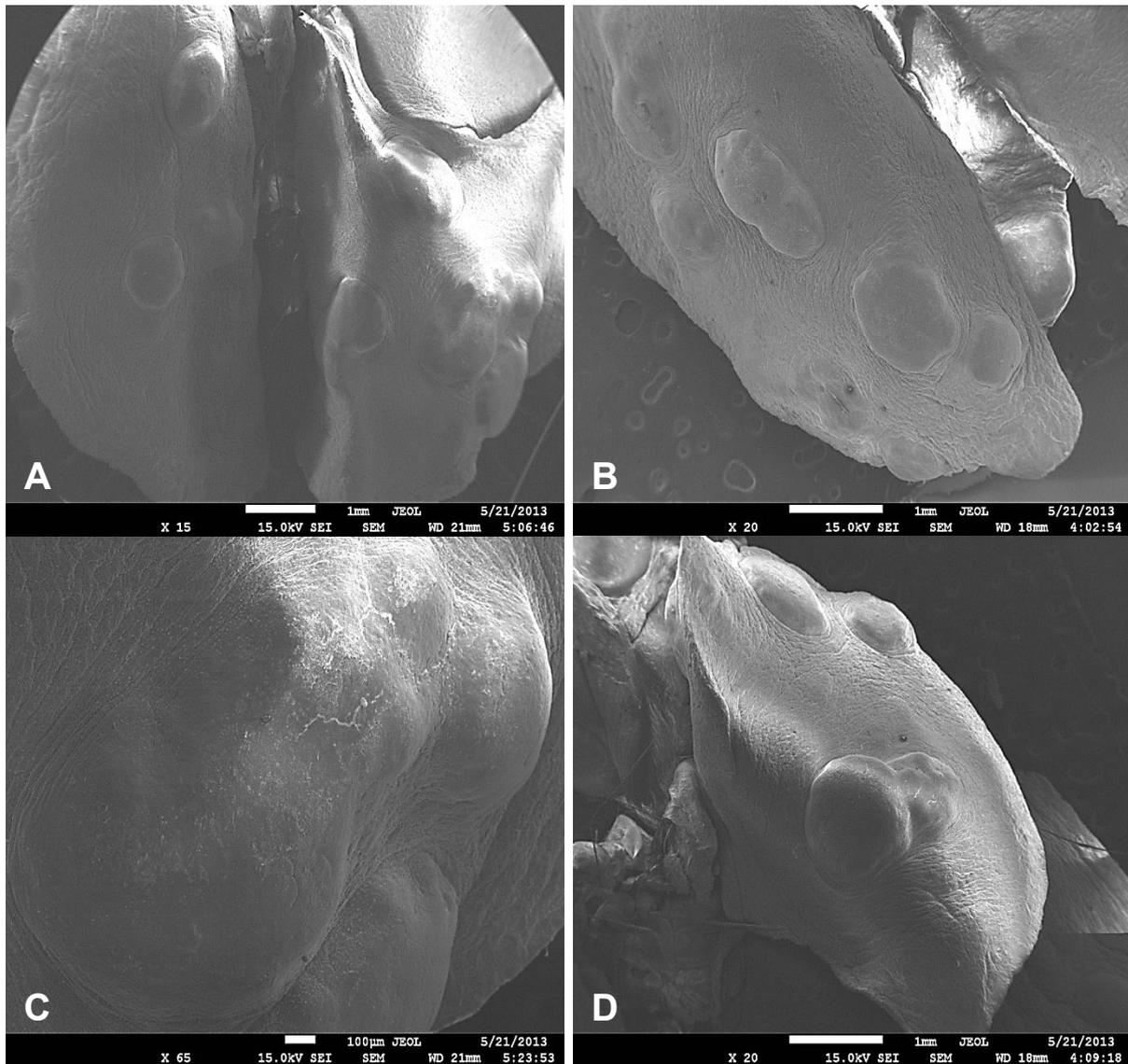


Figura 24. Nódulos tumorais induzidos por uretano em pulmões de camundongos A/J sem tratamento. Os pulmões foram visualizados por microscopia eletrônica de varredura. Aumentos de 15 x (A), 20 x (B), 65 x (C) e 20 x (D). C representa um maior aumento de A. B e D representam dois lóbulos distintos de um mesmo animal. Em C podemos visualizar irregularidades na superfície do tumor indicativas de crescimento tumoral desordenado.

6.9. Efeito das nanocápsulas de selol sobre o tamanho e o número de nódulos tumorais

A quantificação das lesões macroscópicas superficiais, conforme representadas na figura 25, revelou que não houve diferença no número de nódulos pulmonares entre

os animais controle (PBS) e tratados com as nanocápsulas SNP (PBS vs SNP 5 mg/kg ($p>0,05$) e PBS vs SNP 10 mg/kg ($p>0,05$)) (Figura 26). Os camundongos controle apresentaram $29 (\pm 7)$ nódulos em média. Os animais tratados com a SNP 5 mg Se/kg e 10 mg Se/kg apresentaram médias de $25 (\pm 9)$ e $28,43 (\pm 10)$ nódulos por animal, respectivamente. Entretanto, como apresentado na figura 26, B, houve uma diminuição da área dos tumores superficiais dos camundongos tratados com SNP 10 mg/kg (PBS $0,30 \text{ mm}^2 \pm 0,07$ vs SNP 10 mg/kg $0,21 \text{ mm}^2 \pm 0,08$) ($p<0,05$).

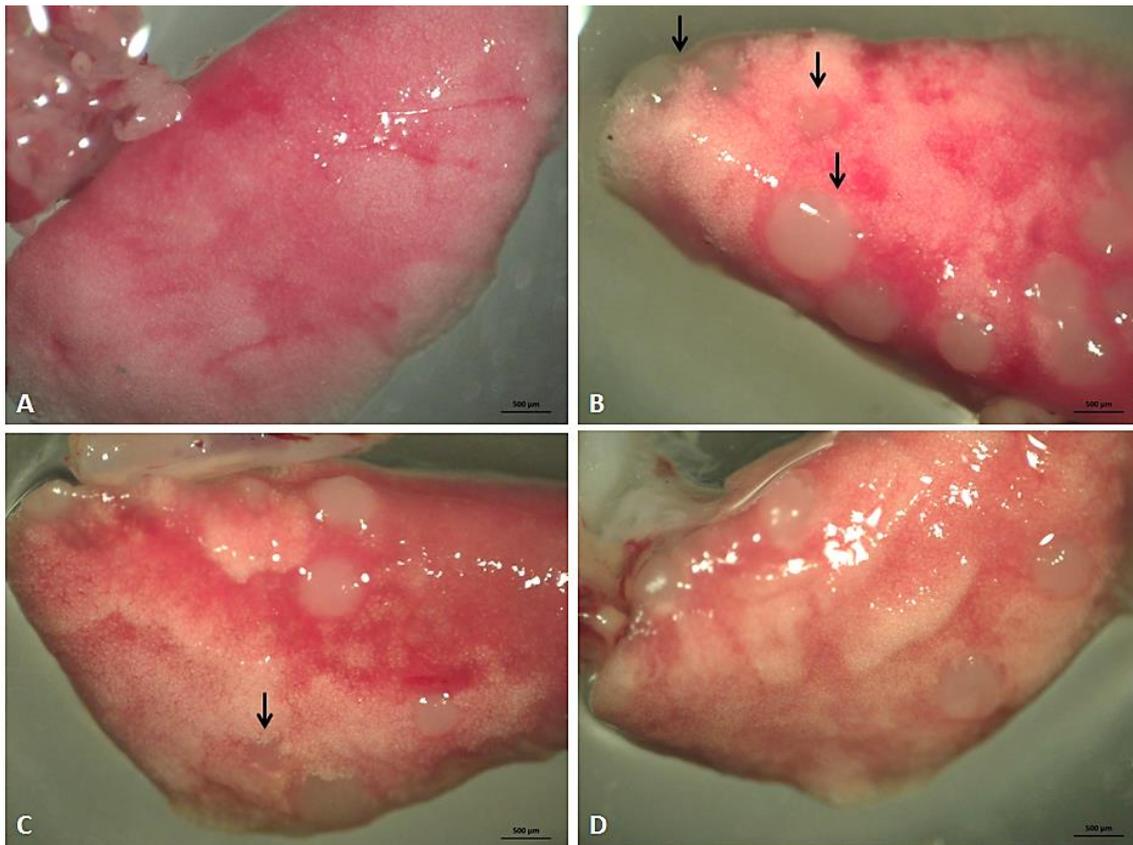


Figura 25. Fotomicrografias dos lóbulos pulmonares de um animal sem tumor (A), e animais com tumor tratados com PBS (B), SNP 5 mg/kg (C) e SNP 10 mg/kg (D). Os tumores apresentam-se como múltiplas estruturas nodulares esbranquiçadas. As setas indicam diferentes aspectos dos nódulos que foram quantificados como tumores.

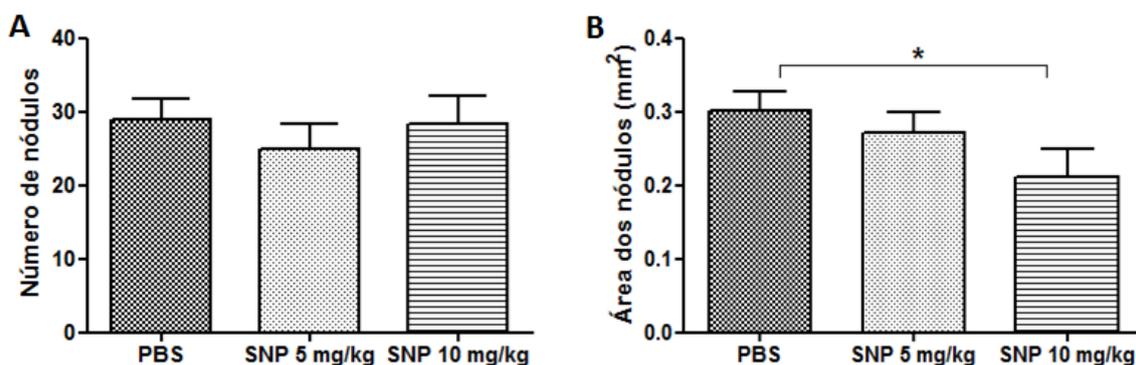


Figura 26. Número de nódulos tumorais superficiais (A) e área dos nódulos (B) em animais controle (PBS) e tratados com as nanocápsulas de selol (SNP) nas doses de 5 mg Se/kg e 10 mg Se/kg. As quantificações foram realizadas a partir das fotomicrografias digitalizadas com o auxílio do estereoscópio na objetiva de 2,5 x. Os valores foram expressos em média \pm erro padrão. * significa $p < 0,05$.

O efeito do tratamento com SNP foi também avaliado por análises em microtomógrafo, por meio de quantificações realizadas das imagens dos pulmões reconstruídas em 3D. Por esse método, foi possível visualizar os tumores localizados superficial e perifericamente (Figura 27). Conforme esperado, não foram detectados nódulos tumorais nos animais que não foram submetidos à indução de tumor (Figura 27, A). As delimitações dos pulmões e dos tumores foram estabelecidas em imagens bidimensionais, conforme demonstrado na figura 27, E e F. Os resultados obtidos da análise de volume pela microtomografia demonstraram que não houve diferença entre as porcentagens de massa tumoral dos animais tratados e não tratados com as nanocápsulas de selol ($p > 0,05$). Os animais com tumores não tratados apresentaram porcentagem tumoral média de 4,36% ($\pm 1,35$), enquanto os animais tratados com SNP 5 mg/kg e SNP 10 mg/kg apresentaram porcentagens médias de 4,83% ($\pm 0,96$) e 4,89% ($\pm 1,32$), respectivamente. Similarmente, a avaliação dos nódulos por intensidade de branco não revelou diferença de tamanho entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). As intensidades de branco médias dos tumores dos animais tratados com PBS, SNP 5 mg/kg e SNP 10 mg/kg foram 100 u.a. ($\pm 3,64$), 97,41 u.a. ($\pm 2,13$) e 98,53 u.a. ($\pm 2,58$). Adicionalmente, as intensidades de branco considerando todo o pulmão também não foram diferentes entre os tratamentos ($p > 0,05$).

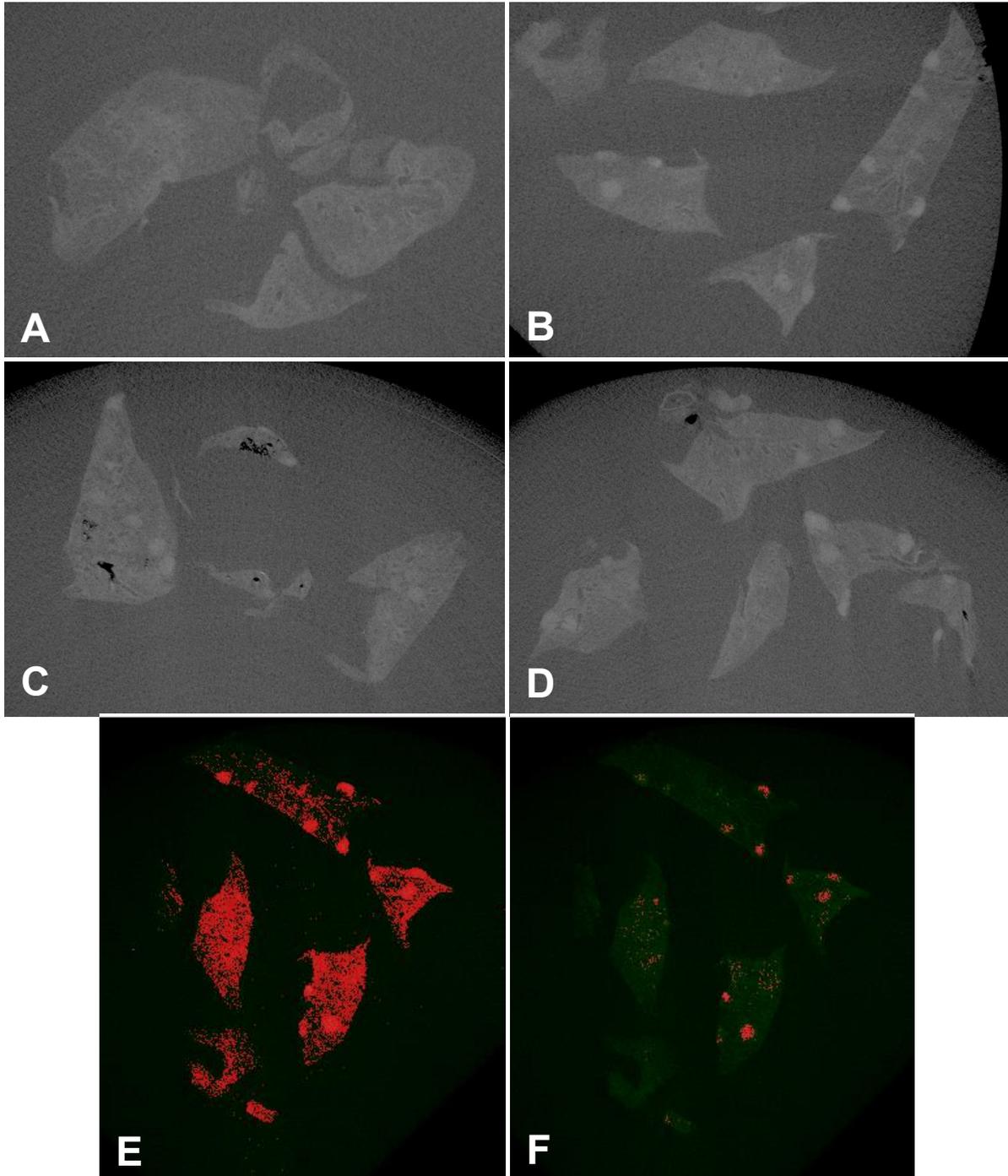


Figura 27. Imagens bidimensionais dos lóbulos pulmonares de animais sem tumor (A) e animais com tumor e tratados com PBS (B), SNP 5 mg/kg (C) e SNP 10 mg/kg (D). Os nódulos tumorais são as estruturas com maior intensidade de branco comparadas ao parênquima pulmonar saudável. Em E e F estão representadas as seleções binárias realizadas para as definições das intensidades de branco referentes ao pulmão total (E) e aos nódulos tumorais (F).

6.10. Tratamento com SNP não alterou a histopatologia dos tumores pulmonares

Os nódulos tumorais apresentaram-se bem delimitados, em sua maioria, e difusamente distribuídos pelo tecido pulmonar. Dois padrões de nódulos tumorais foram evidenciados: um padrão benigno, de apresentação papilífera e sólida, exibindo leve a moderada perda da arquitetura normal e variados graus de compressão do parênquima pulmonar adjacente; e um padrão maligno, com achados de infiltração do estroma peritumoral por ilhotas compostas por células cancerosas de fenótipo tipicamente invasivo. Nos nódulos malignos, observou-se maior frequência de pleomorfismo celular, hipercromasia nuclear e presença de figuras de mitose. Escasso infiltrado inflamatório foi observado na interface tumor-estroma.

A avaliação histopatológica dos nódulos dos animais controle (PBS) e tratados (SNP 5 mg/kg e SNP 10 mg/kg) não revelou alterações morfológicas decorrentes do tratamento com as nanocápsulas de selol. O tecido pulmonar dos animais sem tumor apresentou-se morfológicamente normal, com extensas áreas de vascularização, sacos alveolares íntegros e organização epitelial normal dos pneumócitos tipo I e II (Figura 28, B). Nos animais portadores de tumor, vascularização peritumoral e intratumoral foram bastante evidentes, não sendo detectadas áreas de necrose nos animais não tratados (PBS) (Figura 29). Similarmente, não foi detectada necrose nos animais portadores de tumor tratados com as nanocápsulas de selol (Figuras 30 e 31). Em todos os animais avaliados foram encontrados nódulos apresentando diferentes graus de alteração da arquitetura tecidual e pleomorfismos celular e nuclear, não havendo diferenças devido ao tratamento SNP (Figuras 29, 30 e 31). Além disso, nenhuma evidência de compressão ou invasão dos bronquíolos foi observada. Em decorrência dos resultados mencionados, complementou-se a análise histopatológica com a avaliação imunoistoquímica contra o marcador de proliferação celular ki67.

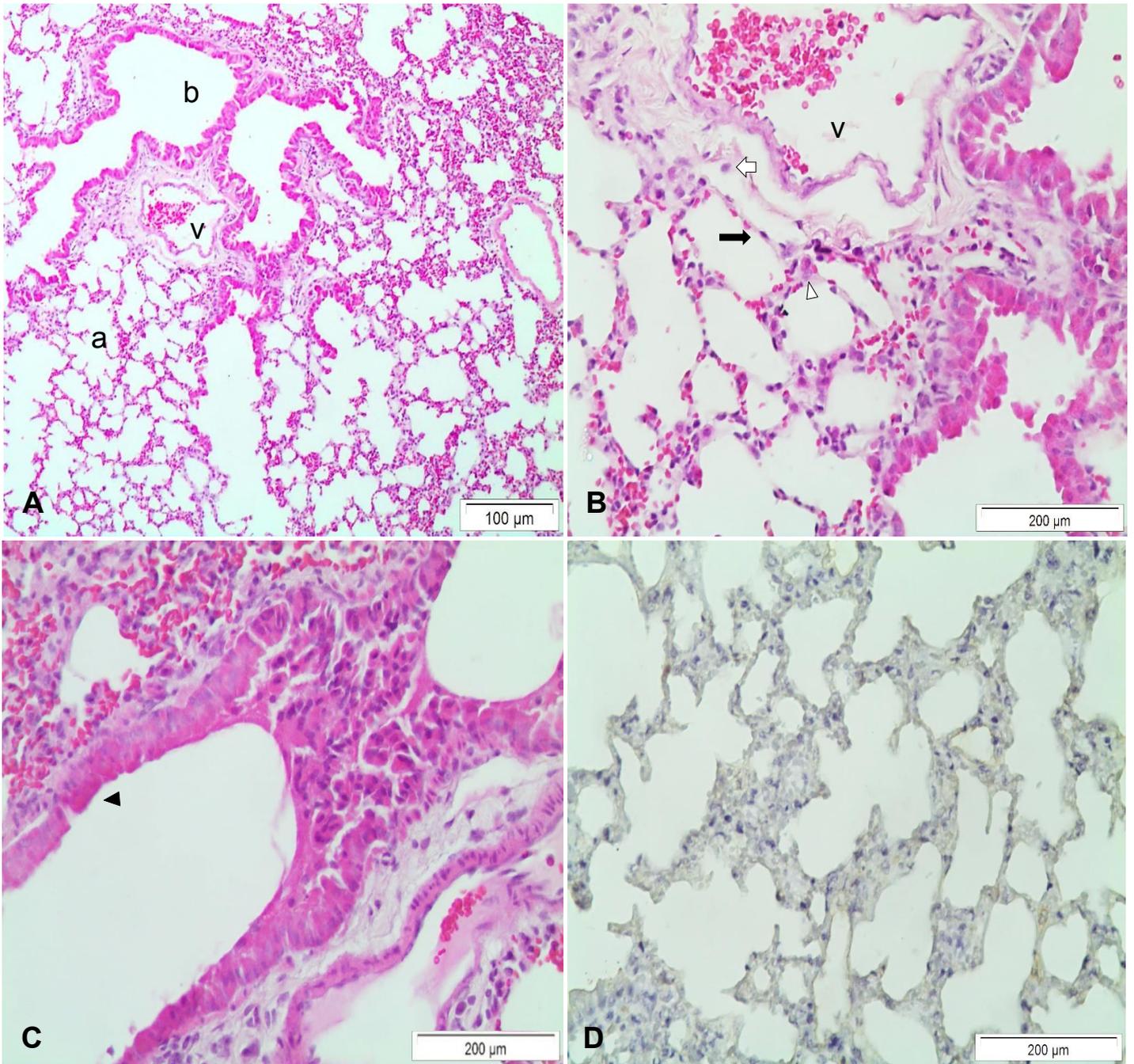


Figura 28. Fotomicrografias de parênquimas pulmonares de camundongos A/J saudáveis. A) Parênquima pulmonar normal, demonstrando-se alvéolos (a), bronquíolos (b) e vasos sanguíneos (v). B) Arquitetura típica alveolar formada por camada única de células epiteliais pavimentosas, de citoplasma escasso (pneumócito tipo I) (seta preta), células epiteliais cúbicas, de citoplasma finamente granular (pneumócito tipo II) (seta branca) e macrófagos alveolares (cabeça de seta branca). Vaso sanguíneo contendo hemácias (v). C) Epitélio de revestimento pseudoestratificado colunar não ciliado formado por células Clara encontradas no epitélio bronquiolar terminal (cabeça de seta). D) Imunolocalização da proteína ki-67, marcador nuclear de proliferação celular, nos alvéolos pulmonares. (Coloração em H&E: A, B e C; contracoloração em Hematoxilina de Mayer's: D. Aumento final de 100 x (A) e 400 x (B, C e D).

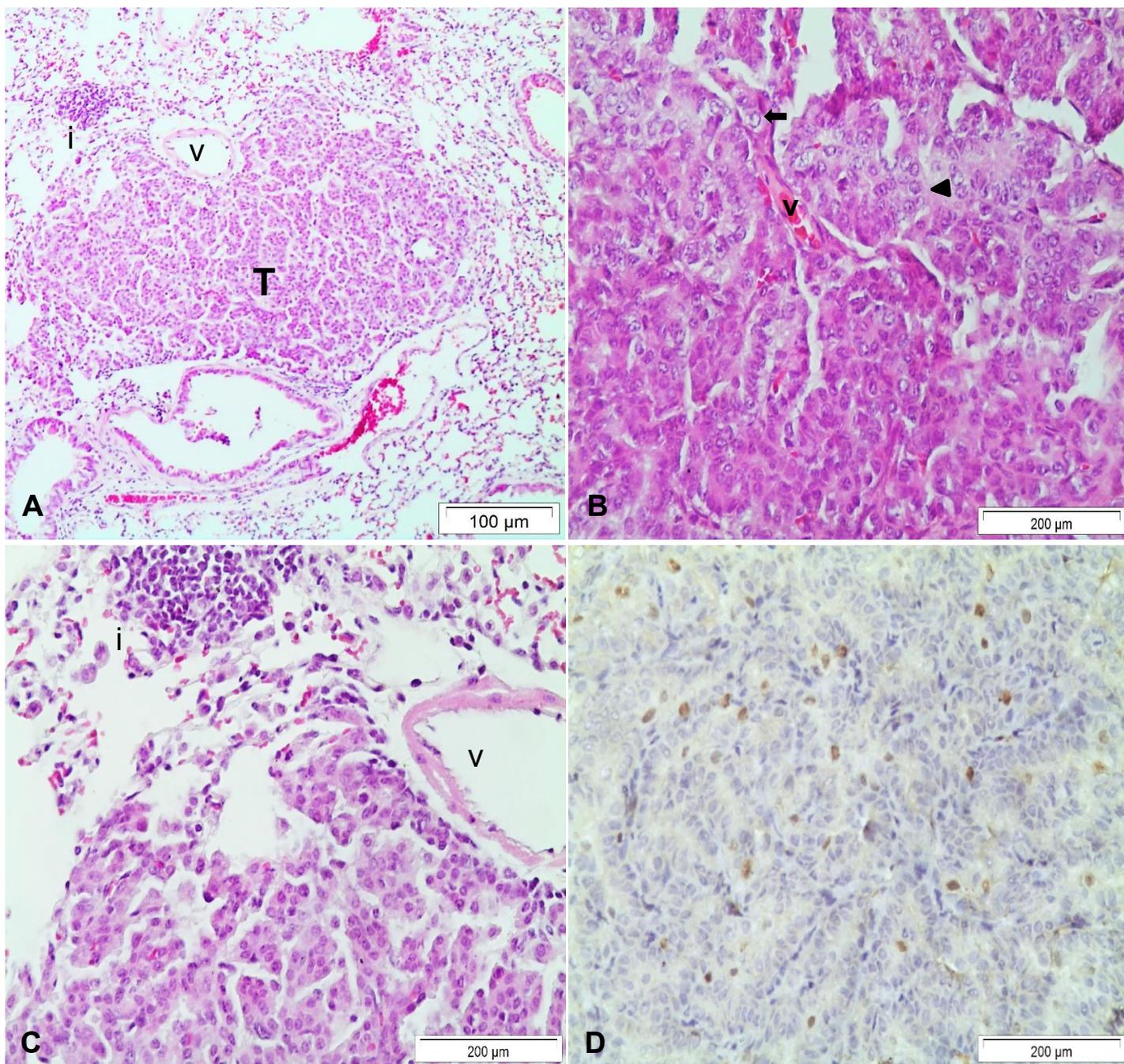


Figura 29. Fotomicrografias de tecidos pulmonares de camundongos A/J portadores de adenocarcinoma de pulmão não tratado. A) Parênquima pulmonar apresentando lesão tumoral (T) aparentemente bem delimitada, com de espaços alveolares preenchidos por células tumorais, evidente infiltrado inflamatório (i) e vascularização (v). B) Área microscópica intratumoral revelando um padrão predominantemente sólido, com alguma organização papilar. Notam-se células epiteliais neoplásicas malignas apresentando citoplasma eosinofílico abundante (cabeça de seta), núcleo hiper cromático ou vesiculoso com nucléolo evidente (seta). C) Infiltrado inflamatório (i), vaso sanguíneo (v). D) Imunolocalização da proteína ki67 em adenocarcinoma de pulmão não tratado. (Coloração em H&E: A, B e C; contracoloração em Hematoxilina de Mayer's: D. Aumento final de 100 x (A) e 400 x (B, C e D).

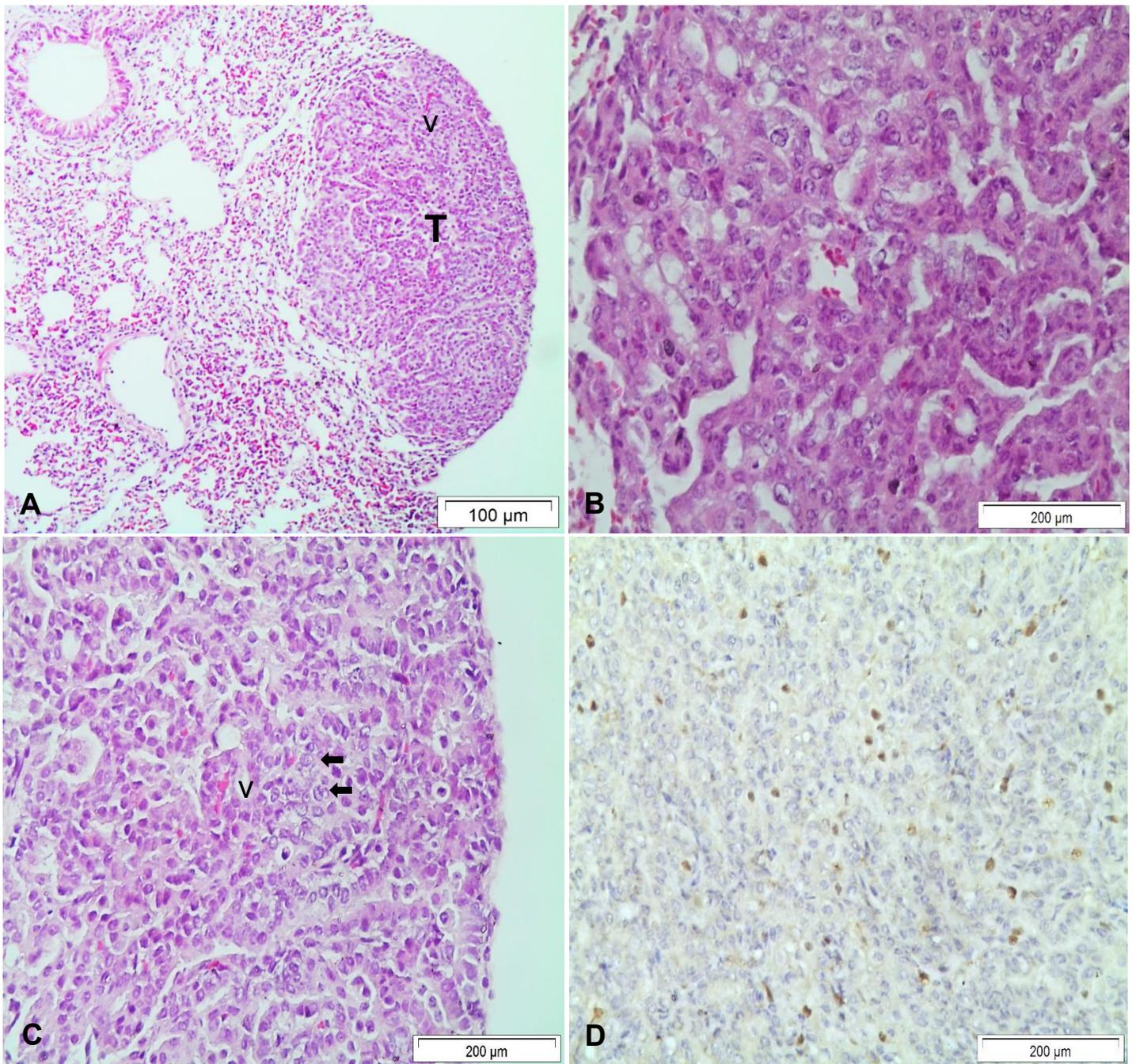


Figura 30. Fotomicrografias de tecidos pulmonares de camundongos A/J portadores de adenocarcinoma de pulmão tratados com nanocápsulas de selol (SNP) 5 mg/kg. A) Parênquima pulmonar apresentando massa tumoral (T) aparentemente bem delimitada, de localização superficial e predominantemente sólida, exibindo vascularização intratumoral evidente (v). B) Desorganização tecidual, núcleos atípicos e células com citoplasma abundante. C) Hipercelularidade, atipia nuclear com nucléolos bastante evidentes (seta) e presença de vasos sanguíneos intratumorais (v). D) Imunolocalização da proteína ki67 em células epiteliais neoplásicas de adenocarcinoma pulmonar tratadas com SNP 5 mg/kg. (Coloração em H&E: A, B e C; contracoloração em Hematoxilina de Mayer's: D. Aumento final de 100 x (A) e 400 x (B, C e D).

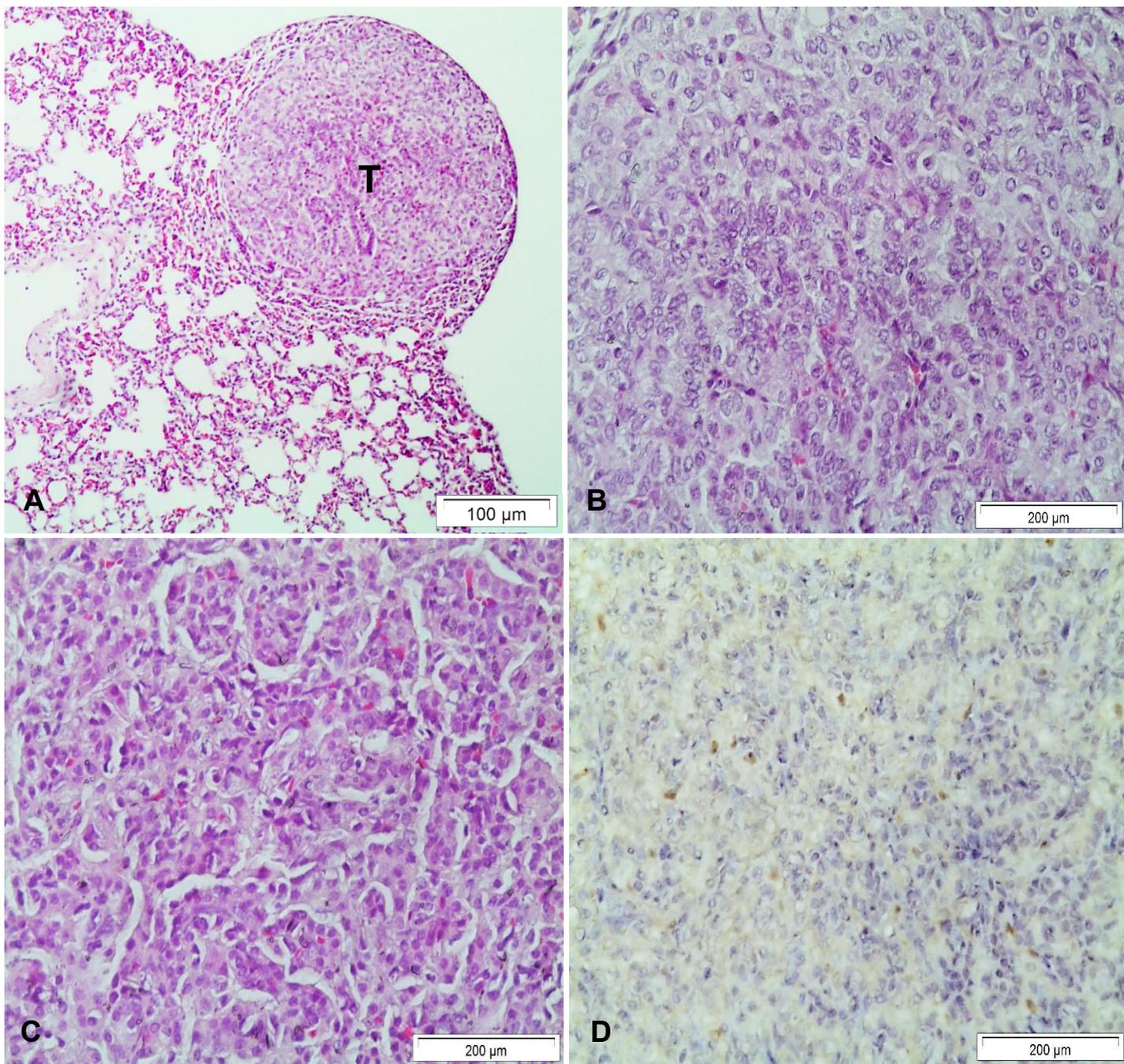


Figura 31. Fotomicrografias de tecidos pulmonares de camundongos A/J portadores de adenocarcinoma de pulmão tratados com nanocápsulas de selol (SNP) 10 mg/kg. A) Parênquima pulmonar apresentando tumor superficial de aspecto sólido (T). B e C) Regiões intratumorais apresentando diferentes graus de desorganização tecidual, atipia nuclear e razão núcleo/citoplasma. D) Imunolocalização da proteína ki67 em células epiteliais neoplásicas de adenocarcinoma pulmonar tratadas com SNP 10 mg/kg. (Coloração em H&E: A, B e C; contracoloração em Hematoxilina de Mayer's: D. Aumento final de 100 x (A) e 400 x (B, C e D).

As figuras 28 (D), 29 (D), 30 (D) e 31 (D) apresentam as imunomarcações da proteína ki67 nos nódulos tumorais dos animais sem tumor e dos animais com tumor tratados com PBS, SNP 5 mg/kg e SNP 10 mg/kg, respectivamente. Em todas as reações imunoistoquímicas realizadas, tecidos de baço foram utilizados como controles de marcações positivas e negativas (Figura 32). Conforme apresentado na figura 28 D, as secções pulmonares dos animais sem tumor apresentaram marcação basal da proteína ki67 variando de inexistente a muito baixa. Diferentemente, todos os animais portadores de tumor apresentaram marcações para a proteína ki67, que se encontrou randomicamente distribuída pelos nódulos tumorais. Os índices de proliferação (IPs) das células tumorais nos animais tratados apenas com PBS variaram de 3,21 - 7,20%, com média de 4,50% ($\pm 1,53\%$). Os tumores tratados com SNP 5 mg/kg apresentaram IP médio de 4,28% ($\pm 2,10\%$), com IPs mínimo de 2,52% e máximo de 8,68%. Em SNP 10 mg/kg, percebeu-se uma diminuição percentual no IP médio (3,68% $\pm 0,86\%$), que variou de 2,65 - 4,94%. No entanto, quando comparada aos demais grupos, essas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Figura 33).

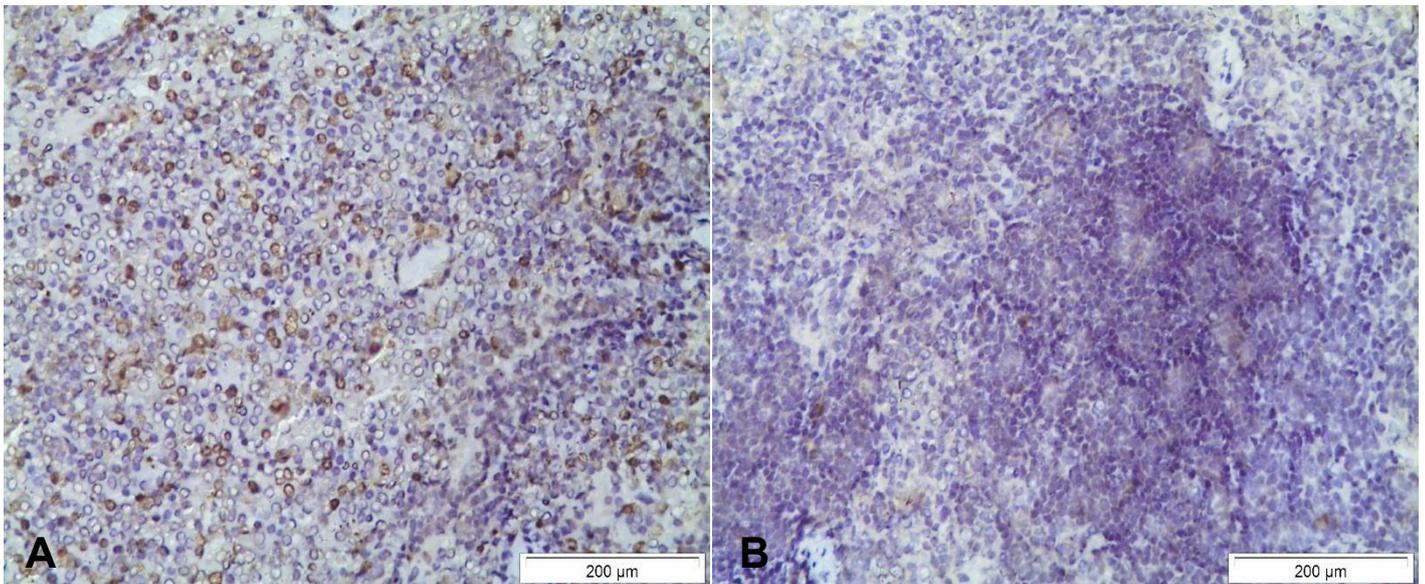


Figura 32. Fotomicrografias de amostras de baço utilizadas como controles das reações de imunoistoquímica. A) Marcação imunoistoquímica nuclear positiva da proteína ki67 em células de baço. B) Ausência de marcação no tecido de baço utilizado como controle negativo, ao qual não foi incubado o anticorpo primário anti-ki67. As proteínas foram identificadas com diaminobenzidina (marrom) e contracoradas com hematoxilina de Mayer's. Aumento final de 400 x.

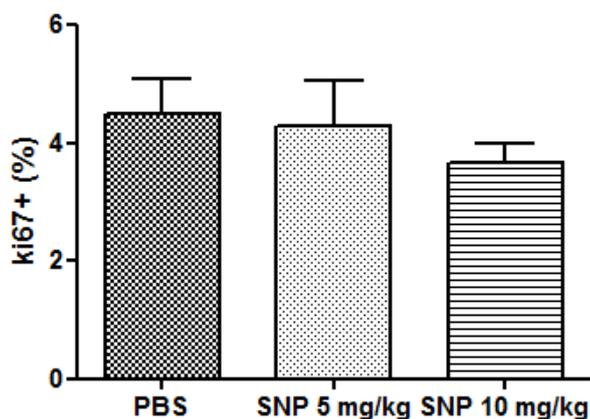


Figura 33. Expressão imunohistoquímica da proteína ki67 em amostras tumorais controle (PBS) e tratadas com as nanocápsulas de selol (SNP) nas doses de selênio de 5 mg/kg e 10 mg/kg. As barras representam a média \pm erro padrão.

6.11. Observações pré-clínicas decorrentes do tratamento com as nanocápsulas de selol

Os animais não apresentaram alterações comportamentais e pré-clínicas durante o período de tratamento, como alopecia, distúrbios intestinais e alterações motoras. Os animais sem tumor apresentaram pesos corpóreos superiores aos animais com tumor ($p < 0,05$) (Figura 34). Os animais com tumor tratados com PBS apresentaram peso médio estatisticamente semelhante aos pesos dos animais tratados com as nanocápsulas de selol (SNP 5 mg/kg e SNP 10 mg/kg) ($p > 0,05$).

Ao exame macroscópico, os órgãos fígado, baço e rins não apresentaram alterações de superfície. No entanto, maiores pesos do baço e do fígado foram registrados em decorrência do tratamento SNP ($p < 0,05$). Contrariamente, o peso absoluto médio dos rins dos animais com tumor (PBS, SNP 5 mg/kg e SNP 10 mg/kg) foi menor que dos animais sem tumor ($p < 0,05$). Dessa forma, em consequência da grande variação de peso corpóreo entre os animais com e sem tumor, os pesos dos órgãos foram normalizados em função do peso corporal. Assim, os pesos absolutos e relativos podem ser visualizados na tabela 6. Maiores pesos dos pulmões foram evidenciados nos animais portadores de tumor ($p < 0,05$). Um aumento do peso médio do fígado também foi registrado entre os animais tratados com as nanocápsulas SNP (Se 5 mg/kg e Se 10 mg/kg) ($p < 0,05$). O peso médio do baço também apresentou um significativo aumento nos animais tratados com SNP 10 mg/kg quando comparados aos

demais grupos ($p < 0,05$). Após a normalização de acordo com o peso corporal, não houve diferença nos pesos dos rins entre os grupos experimentais.

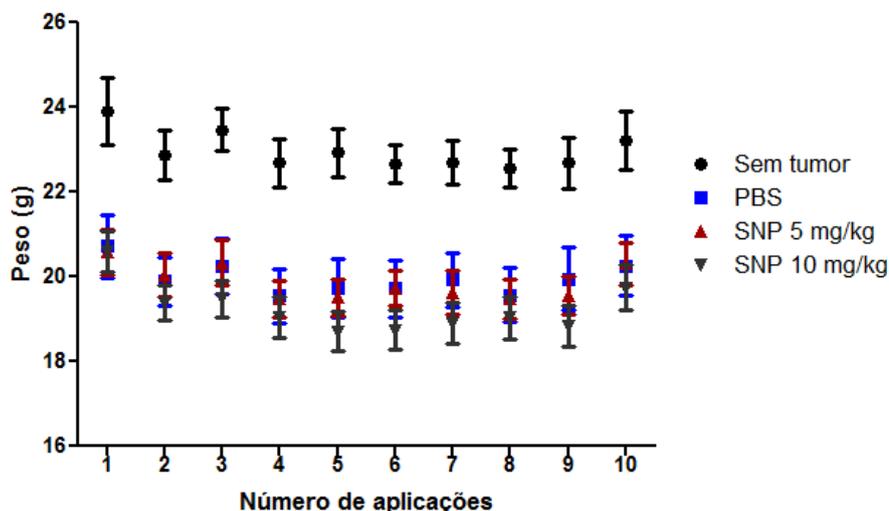


Figura 34. Pesos corpóreos dos animais sem tumor e dos animais com tumor tratados com PBS e as nanocápsulas de selol (SNP) nas doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg em função do número de aplicações dos tratamentos. O grupo sem tumor foi tratado com PBS nas mesmas condições que os animais com tumor. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão.

Tabela 6. Efeito do tratamento com as nanocápsulas de selol (SNP) sobre os pesos dos órgãos dos animais.

Grupos	Peso absoluto (mg)				Peso relativo (%)			
	Pulmão	Fígado	Baço	Rins	Pulmão	Fígado	Baço	Rins
Sem tumor	164,60 \pm 29,94	1247 \pm 109,4	76,6 \pm 6,3	332,8 \pm 18,61	0,71 \pm 0,14	5,39 \pm 0,60	0,33 \pm 0,01	1,44 \pm 0,08
PBS	183,40 \pm 23,49	1060 \pm 92,82	86,0 \pm 39,16	281,7 \pm 28,84 ^a	0,91 \pm 0,09 ^a	5,25 \pm 0,51	0,43 \pm 0,23	1,39 \pm 0,11
SNP 5 mg/kg	190,01 \pm 20,81	1400 \pm 133,3 ^b	117,3 \pm 20,89	285,0 \pm 25,27 ^a	0,93 \pm 0,07 ^a	6,90 \pm 0,59 ^{a,b}	0,58 \pm 0,10	1,40 \pm 0,06
SNP 10 mg/kg	184,90 \pm 16,18	1431 \pm 158,9 ^b	193,6 \pm 51,52 ^{a,b}	292,4 \pm 27,01 ^a	0,93 \pm 0,05 ^a	7,23 \pm 0,31 ^{a,b}	0,98 \pm 0,25 ^{a,b,c}	1,48 \pm 0,07

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. ^a e ^b indicam diferenças significantes comparadas aos grupos sem tumor e com tumor não tratado, respectivamente ($p < 0,05$). ^c indica diferença significativa entre os tratamentos com SNP 5 mg/kg e SNP 10 mg/kg ($p < 0,05$).

6.12. Baixo perfil de toxicidade de SNP

Os parâmetros bioquímicos avaliados como indicadores de nefrotoxicidade (ureia e creatinina) e hepatotoxicidade (TGO e TGP) indicaram que os animais portadores de tumor sem tratamento (PBS) assim como os animais tratados com SNP não apresentaram alterações significativas dos níveis de TGO, TPG e creatinina ($p>0,05$) comparativamente aos animais sem tumor (Tabela 7). Reduções dos níveis de ureia no sangue dos animais tratados com SNP 10 mg/kg foram evidenciadas ($p<0,05$), alteração que não é indicativa de disfunção renal.

Tabela 7. Análises de parâmetros bioquímicos indicativos de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em camundongos portadores de tumor de pulmão sem tratamento (PBS) ou tratados com as nanocápsulas de selol (SNP).

Grupos	TGO (u/L)	TGP (u/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Sem tumor	704,6 ± 581,3	396,2 ± 306,7	54,20 ± 4,09	0,12 ± 0,04
PBS	558,3 ± 421,2	341,4 ± 284,5	48,14 ± 8,57	0,13 ± 0,05
SNP 5 mg/kg	610,9 ± 379,2	347,0 ± 350,6	45,29 ± 6,82	0,11 ± 0,04
SNP 10 mg/kg	551,6 ± 300,7	250,9 ± 253,0	37,43 ± 4,89 ^a	0,10 ± 0,00

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. TGO: transaminase oxalacética; TGP: transaminase pirúvica. ^a indica diferença significativa comparada aos animais sem tumor ($p<0,05$).

A análise do hemograma dos animais após 10 aplicações do selol encapsulado em nanocápsulas revelou que o tratamento não causou alterações significativas no plaquetograma e no leucograma em relação aos animais sem tumor e aos animais portadores de tumor não tratado (PBS) (Tabelas 8 e 9). Especificamente, o volume plaquetário médio (MPV) é comumente utilizado como um bom indicador da taxa de renovação das plaquetas e da atividade normal da medula óssea (Grotto *et al.*, 2004; Comar & Silva, 2009). Os animais tratados com SNP apresentaram MPV estatisticamente semelhante ao dos demais grupos sem tumor e sem tratamento ($p>0,05$).

Tabela 8. Leucograma de camundongos A/J portadores de tumor de pulmão não tratados (PBS) e tratados com as nanocápsulas de selol (SNP).

Grupos	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Neutrófilos + monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
Sem tumor	2,47 \pm 0,39	1,26 \pm 0,15	1,03 \pm 0,30	0,10 \pm 0,08
PBS	2,37 \pm 1,03	1,42 \pm 0,56	1,30 \pm 0,79	0,08 \pm 0,08
SNP 5 mg/kg	2,70 \pm 0,93	1,30 \pm 0,42	1,48 \pm 0,58	0,02 \pm 0,04
SNP 10 mg/kg	2,76 \pm 0,95	0,91 \pm 0,43	1,80 \pm 0,57	0,04 \pm 0,05

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. WBC: leucócitos totais.

Tabela 9. Plaquetograma de camundongos A/J portadores de tumor de pulmão não tratados (PBS) e tratados com as nanocápsulas de selol (PBS).

Grupos	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	MPV (fl)	P-LCR (%)	PDW (fl)
Sem tumor	820,30 \pm 154,60	6,88 \pm 0,58	10,94 \pm 4,29	7,00 \pm 0,39
PBS	680,30 \pm 195,40	7,06 \pm 0,61	11,76 \pm 5,39	6,97 \pm 0,40
SNP 5 mg/kg	714,40 \pm 123,40	7,23 \pm 0,32	10,57 \pm 2,79	7,36 \pm 0,44
SNP 10 mg/kg	628,60 \pm 106,20	7,65 \pm 0,21	11,70 \pm 2,71	7,57 \pm 0,65

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. PLT: número de plaquetas; MPV: volume plaquetário médio; P-LCR: porcentagem de plaquetas grandes; PDW: distribuição de tamanho das plaquetas.

Os resultados do eritrograma revelaram que o tratamento com as nanocápsulas de selol (SNP 10 mg/kg) levou à diminuição estatisticamente significativa do volume corpuscular médio (MCV) (HCT/RBC) ($p < 0,05$), apesar de não terem sido detectadas reduções estatísticas no volume ocupado pelas hemácias no sangue (HCT) ($p > 0,05$) bem como no número total de hemácias (RBC) ($p > 0,05$) (Tabela 10). Os animais portadores de tumor tratados com SNP 5 mg/kg apresentaram reduções na contagem de hemácias totais (RBC) e no índice de hemoglobina corpuscular média (MCH) comparados aos índices dos animais sem tumor e os animais portadores de tumor sem tratamento ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento com SNP 5 mg/kg causou reduções no hematócrito e na concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) comparados aos índices normais (sem tumor). Entretanto, essas reduções significantes associadas ao tratamento com SNP 5 mg/kg não foram evidenciadas no tratamento com SNP 10 mg/kg ($p > 0,05$). A dosagem de hemoglobina, por sua vez, mostrou-se reduzida nos

animais com tumor que foram tratados com ambas as doses da formulação de nanocápsulas de selol (SNP 5 mg/kg e SNP 10 mg/kg) ($p < 0,05$).

Tabela 10. Eritrograma de camundongos A/J portadores de tumor de pulmão não tratados (PBS) e tratados com as nanocápsulas de selol (SNP).

Grupos	RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	HGB (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	RDW (%)
Sem tumor	7,64 \pm 0,70	11,20 \pm 0,97	28,14 \pm 2,60	36,84 \pm 0,49	14,64 \pm 0,30	39,74 \pm 0,58	14,48 \pm 0,54
PBS	6,94 \pm 0,85	10,10 \pm 1,23	26,16 \pm 3,43	37,63 \pm 0,52	14,56 \pm 0,40	38,66 \pm 1,04	16,03 \pm 2,00
SNP 5 mg/kg	6,40 \pm 0,50 ^{a, b}	8,87 \pm 0,74 ^a	23,51 \pm 1,67 ^a	36,73 \pm 0,90	13,84 \pm 0,39 ^{a, b}	37,71 \pm 1,03 ^a	15,24 \pm 1,07
SNP 10 mg/kg	6,77 \pm 0,56	8,94 \pm 1,56 ^a	24,57 \pm 1,89	36,28 \pm 0,48 ^b	13,97 \pm 0,58	38,45 \pm 1,38	18,34 \pm 3,81

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. RBC: número de hemácias; HGB: hemoglobina; HCT: hematócrito; MCV: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCHC: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: variação da distribuição do número de eritrócitos. As letras ^a e ^b indicam diferenças significantes comparadas aos grupos de animais sem tumor e animais com tumor não tratados (PBS), respectivamente ($p < 0,05$).

Devido às variações encontradas no eritrograma, decidiu-se avaliar a capacidade hemolítica da formulação SNP. Visto que o método utilizado para a avaliação do potencial hemolítico é colorimétrico, a turbidez proveniente das nanocápsulas interferiu na determinação da taxa de hemólise e, portanto, a avaliação do experimento deu-se apenas de forma qualitativa. Conforme demonstrado na figura 35, o contato das células com um agente hemolítico (C+) provocou liberação do conteúdo interno e incapacidade de formação de um precipitado celular ao serem centrifugadas em baixa velocidade de aceleração. Contrariamente, na ausência de um agente hemolítico (C-), as hemácias se precipitaram no fundo da placa e o sobrenadante tornou-se límpido e ausente em pigmentos internos das hemácias. Comparativamente, pôde-se perceber que a formulação SNP apresentou baixo potencial hemolítico em todas as concentrações avaliadas, podendo ser observada, inclusive nas concentrações mais elevadas de selênio (1000 $\mu\text{g/mL}$ e 400 $\mu\text{g/mL}$), a presença de precipitado celular após a centrifugação. Nas menores concentrações foi possível também visualizar o aspecto dos sobrenadantes, os quais se apresentaram levemente avermelhados.

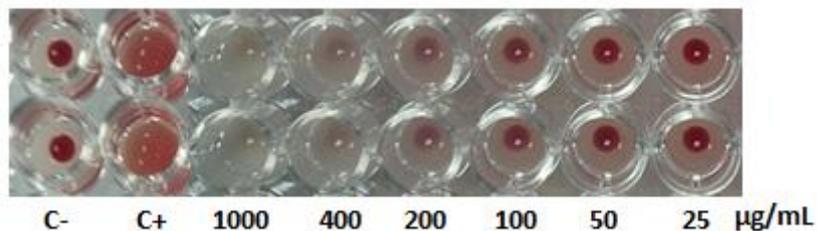


Figura 35. Avaliação do potencial hemolítico das nanocápsulas de selol em função de diferentes concentrações de selênio. As diferentes concentrações foram avaliadas em duplicata. Controle negativo (C-); controle positivo (C+).

6.13. Ciclo celular e fragmentação de DNA de células da medula óssea

Diante das evidências de bloqueio da proliferação celular provocado pelas nanocápsulas de selol, foram avaliados após o término dos tratamentos o perfil de distribuição das células da medula óssea nas diferentes fases do ciclo celular e o grau de fragmentação de DNA.

A avaliação do ciclo celular nos diferentes grupos experimentais demonstrou que o tratamento com as nanocápsulas de selol não provocou alterações na divisão celular das células da medula óssea ($p > 0,05$) (Figura 36, A). Similarmente, não foi evidenciada diferença na distribuição das células pelas fases do ciclo celular ao comparar os animais sem tumor com os animais com tumor e sem tratamento (PBS) ($p > 0,05$). Referente à fragmentação de DNA, foram detectadas porcentagens de fragmentação relativamente baixas (Figura 36, B). Apesar disso, percebeu-se uma menor fragmentação de DNA nos animais com tumor tratados com PBS (PBS) ($5,24\% \pm 1,45\%$) que nos animais sem tumor ($7,59\% \pm 1,68\%$) ($p < 0,05$) e com tumor tratados com SNP 10 mg/kg ($8,85\% \pm 3,22\%$) ($p < 0,05$). Entretanto, a fragmentação de DNA dos animais tratados com SNP 10 mg/kg não diferiu da taxa de fragmentação dos animais sem tumor ($p > 0,05$). Constatou-se também que a fragmentação de DNA evidenciada nos animais tratados com SNP 5 mg/kg ($6,07\% \pm 1,86\%$) ($p > 0,05$) foi estatisticamente similar à fragmentação de DNA dos demais grupos experimentais.

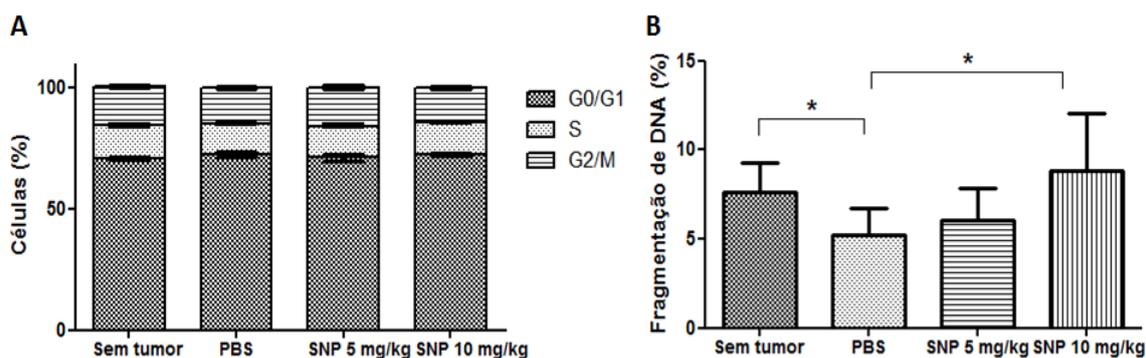


Figura 36. Efeito do tratamento com as nanocápsulas de selol (SNP) na proliferação (A) e fragmentação de DNA (B) das células da medula óssea. As doses de selênio dos tratamentos SNP foram 5 mg/kg e 10 mg/kg. Os grupos controle utilizados foram animais sem tumor e animais com tumor sem tratamento (PBS). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. * indica $p < 0,05$.

6.14. Nanocápsulas de selol não ativam o sistema complemento

A interação das nanocápsulas de selol com o sistema complemento foi avaliada por western blot com marcação da proteína C3 nas formas íntegra e clivada (C3b). A figura 37, A apresenta os resultados do western blot de amostras de soro humano incubadas com zimosan (C+), PBS (C-), SNP 100 $\mu\text{g/mL}$ e SNP 10 $\mu\text{g/mL}$. Nesse estudo constatou-se que os níveis de C3b do soro incubado com SNP nas concentrações de selênio de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ não foram estatisticamente diferentes do nível de C3b basal do controle negativo (PBS) ($1,00 \pm 0,25$) ($p > 0,05$) (Figura 37, B). Entretanto, percentualmente, percebeu-se uma discreta diminuição nos índices de C3b dos tratamentos SNP 100 $\mu\text{g/mL}$ ($0,76 \pm 0,07$) e 10 $\mu\text{g/mL}$ ($0,82 \pm 0,06$) comparados à amostra controle negativo. O controle positivo zimosan (1 mg/mL) (C+) apresentou índice de C3b relativo correspondente a $8,81 \pm 2,18$.

Devido à diminuição percentual dos níveis de C3b nas amostras de soro tratadas com SNP comparadas ao controle negativo, optou-se por avaliar o efeito das nanocápsulas de selol sobre a ativação do sistema complemento causada por um agente ativador do sistema complemento, nesse caso o zimosan (1 mg/mL). Dessa forma, duas condições foram avaliadas: 1) uma amostra de soro foi incubada com SNP 100 $\mu\text{g/mL}$ por 1 h a 37°C ; em seguida, adicionou-se o zimosan (1 mg/mL) e nova incubação de 1 h foi realizada; 2) incubação simultânea de SNP 100 $\mu\text{g/mL}$ e zimosan (1 mg/mL) por 1 h

a 37°C. Em ambas as condições, os procedimentos seguintes à incubação foram realizados conforme descrito no tópico 5.6.11. Como resultado, evidenciou-se que a incubação simultânea do zimosan com as nanocápsulas de selol (SNP 100 µg/mL) ao soro causou diminuição dos níveis de C3b (1,46) comparado ao soro incubado apenas com zimosan (8,81). Similarmente, a incubação prévia do soro com SNP 100 µg/mL seguida da incubação do zimosan também apresentou redução no índice de C3b (2,97). Dessa forma, percebeu-se que a ativação do sistema complemento causada pelo zimosan foi reduzida na presença das nanocápsulas de selol.

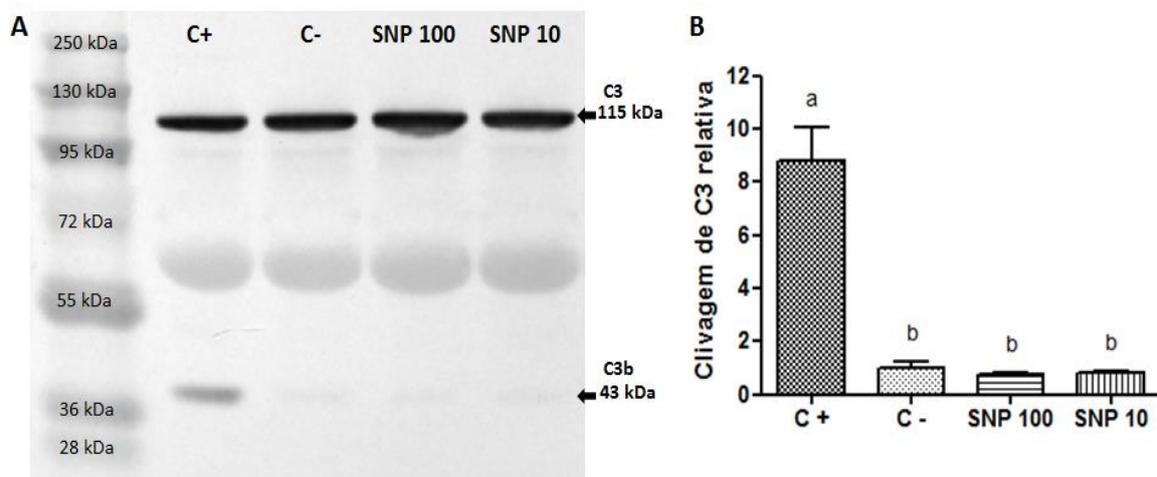


Figura 37. Avaliação da ativação do sistema complemento, por meio das dosagens das proteínas C3 e C3b no soro humano, após incubação com as nanocápsulas de selol (SNP). A) Western blot de amostras de soro humano incubadas com SNP e marcadas com anticorpo contra as formas íntegra e clivada da proteína C3. Padrão de peso molecular (linha 1), clivagem de C3 do controle positivo (linha 2), marcação de C3 clivada (C3b) do controle negativo (PBS) (linha 3) similar aos grupos SNP 100 µg/mL (linha 4) e SNP 10 µg/mL (linha 5). Os pesos moleculares das proteínas C3 íntegra e clivada estão indicados com as setas. B) Determinação de C3b relativa à proteína C3 total em soro exposto a SNP 100 µg/mL e SNP 10 µg/mL. Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparadas aos controles positivo e negativo.

6.15. Nanocápsulas de selol apresentam baixo potencial inflamatório

Entre as citocinas estudadas, somente IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α foram detectáveis nas amostras de PBMC incubadas com as nanocápsulas de selol (SNP 10 $\mu\text{g/mL}$ e SNP 100 $\mu\text{g/mL}$) em quantidades superiores à capacidade de detecção mínima do equipamento (> 0 pg/mL), sendo, por esse motivo apresentadas na Tabela 11. Conforme o esperado, todas as citocinas estudadas foram detectadas em altos níveis nos controles positivos (C+). Assim, as dosagens das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e TNF- β nas amostras tratadas com as nanocápsulas de selol foram consideradas invariáveis comparadas aos controles não tratados (Ctl), e bastante inferiores aos controles positivos.

Conforme demonstrado na tabela 11, somente as intensidades altas de IL-8 nos tratamentos com SNP foram consideradas alterações expressivas comparadas às amostras controle (Ctl). Os níveis das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6 e TNF- α nos tratamentos com SNP foram bastante inferiores aos níveis dos controles positivos e semelhantes aos níveis dos controles não tratados (Ctl). Nesse ensaio, a variação imunológica individual e o baixo n experimental impossibilitaram o emprego de análises estatísticas para a comparação entre grupos.

Tabela 11. Determinação dos níveis de citocinas após os tratamentos das células mononucleares do sangue periférico com a formulação de nanocápsulas de selol (SNP).

Amostras	Grupos	IL-1 β (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
1	C+	642,8 \pm 53,0	720,5 \pm 511,5	>18748,2	4497,3 \pm 85,9	15277,6 \pm 2898,2
	Ctl	<0	<0	<0	531,4 \pm 16,9	<0
	SNP 10	10,6 \pm 0,9	<0	9,30	2347,0 \pm 503,6	9,4 \pm 0,3
	SNP 100	<0	<0	<0	1625,2 \pm 231,7	1,0 \pm 0,0
2	C+	942,3 \pm 207,3	846,8 \pm 35,0	>18748,2	3693,0 \pm 117,4	12399,2 \pm 236,8
	Ctl	<0	<0	<0	1040,7 \pm 258,7	9,4 \pm 0,3
	SNP 10	<0	<0	<0	1366,0 \pm 47,8	2,0 \pm 0,0
	SNP 100	<0	<0	<0	1455,4 \pm 37,0	1,8 \pm 0,0
3	C+	1351,3 \pm 65,4	1003,1 \pm 545,6	>18748,2	3899,5 \pm 129,9	>45643,3
	Ctl	40,7 \pm 57,5	<0	65,4 \pm 92,5	50,0 \pm 70,7	11,3 \pm 16,0
	SNP 10	75,7 \pm 23,3	18,7 \pm 26,5	46,7 \pm 3,8	1820,5 \pm 2574,6	53,3 \pm 20,8
	SNP 100	<0	<0	65,7 \pm 1,7	1903,8 \pm 2692,4	61,7 \pm 8,9

C+: controle positivo; Ctl: controle não tratado; SNP 10 (SNP 10 $\mu\text{g/mL}$) e SNP 100 (SNP 100 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

6.16. Baixa reatividade das nanocápsulas de selol com proteínas plasmáticas

Possíveis interações de SNP com proteínas plasmáticas foram investigadas pelas avaliações das conformações das proteínas albumina, fibrinogênio e globulinas após incubá-las com diferentes concentrações das nanocápsulas. Para isso, avaliou-se o perfil do espectro de fluorescência emitida pelos resíduos de aminoácidos aromáticos.

O aumento da concentração de SNP aumentou a turbidez do meio, com conseqüente diminuição na intensidade de fluorescência emitida pelas proteínas. Entretanto, a turbidez não provocou alterações nos espectros de emissão. Além disso, nos controles realizados com PBS equivalentes a cada diluição de SNP também foram detectadas diminuições das intensidades de fluorescência em decorrência das diluições das proteínas, também não alterando seus espectros de emissão.

A figura 38 apresenta os espectros de emissão de fluorescência das proteínas globulina, fibrinogênio e albumina, excitadas a 280 nm, após as incubações com PBS (controle) e SNP nas concentrações de selênio de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. De acordo com os espectros apresentados, observou-se que SNP causou discretas mudanças na exposição dos resíduos aromáticos das proteínas, uma vez que os espectros foram mantidos com picos únicos e os comprimentos de onda referentes às intensidades de fluorescência máximas emitidas pelas proteínas foram deslocados em no máximo 2 nm comparando-se às moléculas nativas (controle). Os espectros de fluorescência emitidos pelas proteínas albumina e globulina foram deslocados em 2 nm no sentido de menor comprimento de onda, em todas as concentrações estudadas, ao passo que a alteração conformacional do fibrinogênio ocorreu apenas na maior concentração (100 µg/mL), também no sentido de menor comprimento de onda.

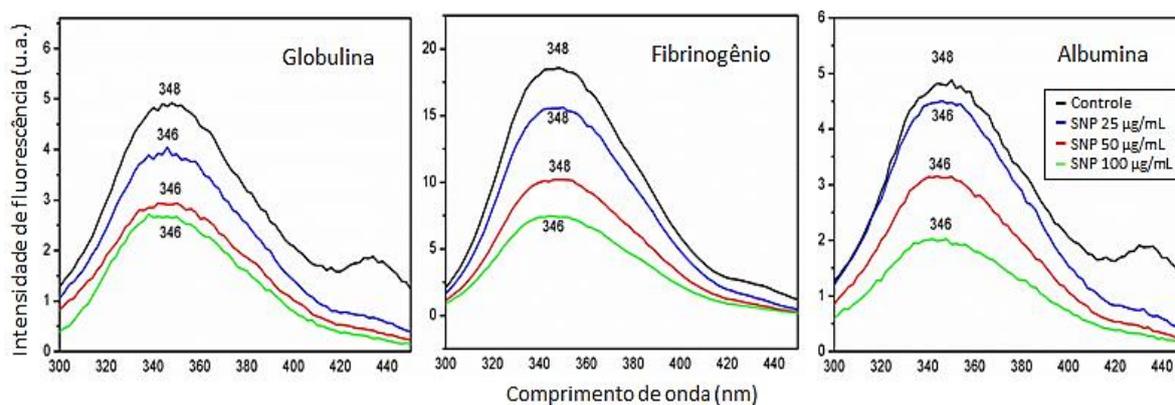


Figura 38. Espectros de emissão de fluorescência das proteínas globulina, fibrinogênio e albumina incubadas com PBS (controle) e as nanocápsulas de selol (SNP) nas concentrações de selênio de 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$. O eixo x representa a intensidade de fluorescência emitida pelos aminoácidos aromáticos das proteínas, excitadas a 280 nm. Os números sobre as curvas indicam o comprimento de onda equivalente às intensidades de fluorescência máximas dos espectros.

7. DISCUSSÕES

Os indesejáveis baixos índices terapêuticos de muitas drogas têm motivado pesquisadores a buscar novas estratégias para reduzir a toxicidade enquanto mantém ou aumenta a eficácia do quimioterápico (Patil *et al.*, 2009). Por um lado, a abundância de novas promissoras drogas anticâncer estão correntemente sobre intensa investigação (Joanitti *et al.*, 2010; Carneiro *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Por outro lado, vários estudos indicam que é possível melhorar o desempenho de drogas clássicas por associá-las a sistemas de liberação de drogas (Zhang *et al.*, 2010; Muehlmann *et al.*, 2011; Valerii *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013). Entre as novas drogas com potencial anticâncer, o selol tem sido proposto como um novo candidato anticâncer para a prevenção da carcinogênese e supressão do tecido maligno (Jastrzebski *et al.*, 1997; Suchocki *et al.*, 2007; 2010; Falqueiro *et al.*, 2011; Ksiazek *et al.*, 2013). Como o selol é altamente hidrofóbico, o primeiro passo deste estudo foi obter uma formulação de nanocápsulas de selol dispersivas em água.

A precipitação interfacial de polímero pré-formado através do deslocamento do solvente originou cápsulas de tamanhos nanométricos, com ótimo PDI (0,061) e carga de superfície negativa. Morfologicamente, as nanocápsulas apresentaram-se esféricas, com superfícies levemente rugosas e aparente deformabilidade, como indicado pelas análises em MET e MEV. Ambas as características deformabilidade e forma esférica são interessantes para a administração desta formulação por rotas parenterais (Morachis *et al.*, 2012). Estudos sobre morfologia de nanopartículas demonstram que a tensão interfacial entre as gotículas de óleo e o dispersante, característica do presente método de síntese, faz com que os núcleos das nanocápsulas sejam formados em três dimensões e a forma de equilíbrio alcançada seja esférica (Guido *et al.*, 1999; Hirsjärvi *et al.*, 2012). Além disso, o tamanho e o PDI das nanocápsulas obtidas estão de acordo com relatos de que a síntese por nanoprecipitação origina espontaneamente pequenas gotículas ou nanopartículas unimodais com distribuição de tamanho variável entre 50-300 nm (Vitale & Katz, 2003).

A estabilização interfacial desse sistema foi realizada pelo copolímero PVM/MA. Esse copolímero é pobremente solúvel em água. No entanto, quando seus grupos anidridos são hidrolisados a ácidos carboxílicos, sua hidrofobicidade

gradualmente decresce com o tempo. Durante o preparo da formulação, acredita-se que a molécula do copolímero não seja completamente exposta à água e com isso ele seja parcialmente imerso nas gotículas de selol via interações hidrofóbicas, expondo as porções hidrofílicas à fase aquosa. Portanto, o PVM/MA torna-se anfipático no curso da preparação, agindo como um surfactante. Um esquema hipotético da interação do PVM/MA ao selol é apresentado na figura 39. No corrente estudo, preconizou-se pela síntese de uma nanoformulação de selol que não utilizasse surfactante não iônico. Por isso, o método de síntese e o caráter anfipático do copolímero foram determinantes. A elevada turbulência decorrente da mistura das fases orgânica (solúvel ao composto hidrofóbico a ser encapsulado) e hidrossolúvel desencadeou a agregação do polímero à superfície do óleo, dando origem às nanocápsulas (Quintanar *et al.*, 1998; Lepeltier *et al.*, 2014). A metodologia de nanoprecipitação difere dos demais métodos de síntese de nanopartículas baseados em emulsão porque nenhuma emulsão precursora é requerida. Esse processo de preparo sem surfactante tem sido nomeado de efeito Ouzo por Vitale & Katz, 2003. Além disso, o aspecto leitoso da formulação SNP está de acordo com as descrições de que as formulações obtidas por esse método tornam-se leitosas devido à formação das gotas de óleo metaestáveis de longa vida (Vitale & Katz, 2003; Ganachaud & Katz, 2005).

De fato, o PVM/MA apresentou boa capacidade para estabilização interfacial da formulação, uma vez que esse sistema não apresentou mudanças importantes em suas características, inclusive em 120 dias após o estoque (TA ou 4°C) ou após ser submetido a estresse térmico de oito ciclos de congelamento e descongelamento. A estabilidade química da formulação também foi mantida após o armazenamento por 60 dias a 4°C, quando não foram evidenciadas alterações das viabilidades celulares comparando-se os índices de células viáveis dos dias 1° e 60° após a síntese. O potencial zeta negativo das nanocápsulas deve-se à presença de grupos carboxilatos na superfície externa.

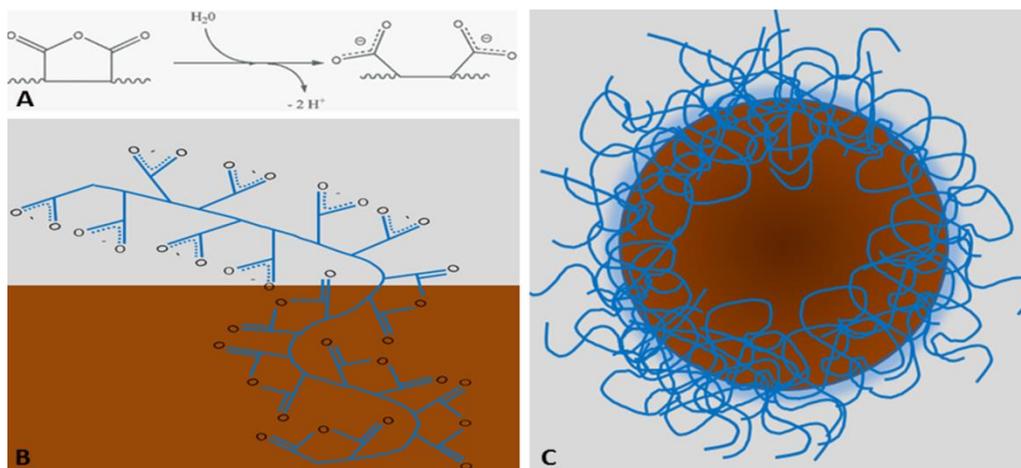


Figura 39. Representação esquemática das nanocápsulas de selol estabilizadas por moléculas de PVM/MA parcialmente hidrolisadas. A) Hidrólise de um grupo anidrido origina dois grupamentos ácidos carboxílicos (pH neutro) na fita de PVM/MA. B) Hidrólise parcial da fita do copolímero exposta à água, e anidridos não hidrolisados na porção do PVM/MA imersa no selol. C) Porções da fita de PVM/MA contendo carboxilatos são hidrofílicas e as partes contendo anidridos são hidrofóbicas e, dessa forma, o PVM/MA age como um surfactante das nanocápsulas de selol.

Em seguida, a toxicidade às células normais e a eficácia anticâncer *in vitro* foram avaliadas com as nanocápsulas de selol e comparadas aos resultados obtidos com o selol livre e o selenito de sódio. A alta toxicidade do selenito de sódio evidenciada nas células não alvo demonstra que o selenito é um efetivo agente anticâncer, entretanto não é seguro para o uso clínico em sua forma inorgânica. Portanto, muitos pesquisadores têm objetivado encontrar compostos selênicos orgânicos com maiores índices terapêuticos (Poerschke *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). O selol, um componente orgânico de selênio, significativamente reduziu a viabilidade das células de adenocarcinoma de pulmão A549, mas foi menos tóxico para as células normais que o selenito de sódio. As alterações na morfologia das células normais tratadas com o selenito de sódio foram mais proeminentes que as leves alterações decorrentes do tratamento com o selol livre. Em decorrência do tratamento com o selol livre, as alterações da morfologia normal estrelada e alongada para uma forma mais contraída indicam uma condição de estresse mais que um processo de morte (Sinha *et al.*, 2014). As células de carcinoma de pulmão do tipo escamoso NCIH 2170 não foram

responsivas ao selol nas concentrações estudadas, mas assim como os demais tipos celulares, elas apresentaram redução da viabilidade causada pelo selenito de sódio e intensa alteração morfológica. Esses resultados reforçam as evidências mencionadas previamente de que o Se (4+) organificado como selol tem significativamente menor potencial para exercer efeitos deletérios em tecidos não alvo que sua forma orgânica (Jastrzebski *et al.*, 1995; Suchocki *et al.*, 2007; Wilczynska *et al.*, 2011). Essas diferenças provavelmente associam-se às diferentes biodisponibilidades do Se (IV), que se mostra também variável entre as diferentes formas de selol 2%, 5% e 7% (Suchocki *et al.*, 2010).

Interessantemente, o encapsulamento do selol não afetou significativamente sua atividade contra as células A549 e reduziu sua toxicidade às células normais. Esses resultados associados a algumas características das nanocápsulas encorajaram a realização dos ensaios posteriores sobre sua atividade em modelos *in vivo* de adenocarcinoma pulmonar. O diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas permite a entrega do selol ao tumor via efeito EPR (permeação e retenção aumentados), uma vez que a vascularização tumoral usualmente apresenta poros de 100 a 780 nm em diâmetro (Jang *et al.*, 2003). Além disso, ligantes de direcionamento específico podem ser conjugados à superfície das nanocápsulas para aumentar a afinidade às células tumorais. Esse procedimento pode ser facilmente realizado, visto que o copolímero PVM/MA apresenta grupamentos anidridos, os quais facilmente reagem com grupamentos hidroxil ou amina primária presentes na maioria das moléculas alvo disponíveis (Arbós *et al.*, 2002).

Em relação às células normais, as células A549 foram mais susceptíveis ao selol, ambos livre e encapsulado, que pode ser parcialmente devido à sua mais intensa atividade endocítica (Bareford *et al.*, 2007). Outra possível explicação, suportada pelo presente estudo, é que as células tumorais A549 foram mais responsivas ao selol devido às maiores taxas proliferativas, uma vez que o selol parece agir primariamente como um inibidor da proliferação celular. Comparativamente às células tumorais NCIH 2170, em que não houve redução da viabilidade celular causada pelo selol, percebeu-se, semelhante às células normais, uma baixa atividade proliferativa, e, possivelmente, uma expressiva atividade antitumoral não seria desencadeada pelo efeito citostático do selol.

Sob condições de dano, os mecanismos de controle das células bloqueiam o ciclo celular nas fases G1, S, G2 e M, prevenindo erros de replicação (G1 e S) e mitose (G2 e M), estresse osmótico, produção de espécies reativas de oxigênio, dano à maquinaria celular e senescência (Thornton & Rincon, 2009; Deckbar *et al.* 2011; Goto *et al.*, 2013). Nos pontos de controle do ciclo, a célula com dano pode ser permanentemente removida ou aumentar o período de reparo (Qin & Li, 2003; Deckbar *et al.* 2011). SNP significativamente aumentou a porcentagem de células A549 bloqueadas na fase G2/M do ciclo celular e conseqüentemente reduziu o número de células vivas. Esses resultados apresentaram boa concordância com as diminuições intensificadas com o tempo nas expressões gênicas de *CCNB1* (ciclina B1), *CDC25C* e *WEE1*, e as expressões inalteradas dos transcritos gênicos de *CCND1* (ciclina D1) e *CCNE1* (ciclina E1), indicando que o selol tem ação sobre o bloqueio do ciclo celular no ponto de controle G2/M e não apresenta atividade sobre os pontos de controle G1 e S. Na fase G2, a proteína wee1 encontra-se no estado ativo e fosforila e mantém em estado inativo o complexo ciclina B1/CDK1, também chamado de fator promotor da mitose. Ao final de G2, *cdc25c* é um regulador positivo de CDK1, ativando o complexo ciclina B1/CDK1. Portanto, a pronunciada redução na expressão de *CDC25C* em comparação a *WEE1* evidenciada no presente estudo está em conformidade com a evidência de que o bloqueio do ciclo em G2/M pode requerer ativação de wee1 em adição à inativação de *cdc25c* (Hsieh *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Ghiasi *et al.*, 2013). A análise conjunta dos resultados *in vitro* aponta para a importância das nanocápsulas de selol no controle da proliferação celular e a necessidade de associação a outras drogas para a erradicação do tumor. O bloqueio do ciclo celular tem tido importância substancial nos mecanismos de radioproteção das células normais e radiosensibilização ao dano às células tumorais, o que pode ser atribuído, ao menos em parte, à ativação dos mecanismos de reparo nas células normais e à maior exposição ao dano em células tumorais, frequentemente deficientes em mecanismos de reparo (Tian *et al.*, 2013; Menon *et al.*, 2013).

De acordo com o monitoramento celular em tempo real, a taxa de morte celular em função da capacidade de reposição das células tornou-se aumentada a partir de períodos longos de tratamento (aproximadamente 40 h). Esses resultados foram corroborados pelos níveis aumentados dos transcritos relacionados à morte celular apoptótica (*BAX* e *BCL-2*) evidenciados em 48 h e 72 h, indicando que o tratamento

com SNP causa danos celulares capazes de ativar o mecanismo de apoptose. A principal função da proteína pró-sobrevivência celular Bcl-2 é regular os mecanismos intrínsecos e extrínsecos da apoptose por interagir com uma ampla extensão de moléculas, dentre elas as proteínas pró-apoptóticas Bax, Bak e BH3-apenas. No entanto, a fim de promover a apoptose, várias proteínas como Bad, Puma, Bid e Bmf interagem e regulam a proteína Bcl-2 (Vogler, 2012; Annibaldi *et al.*, 2013; Bhattacharya *et al.*, 2013). Dessa forma, a razão entre os níveis de expressão gênica de *BAX* e *BCL-2* é amplamente reconhecida como iniciadora da ativação de caspases (Hassan *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). No corrente estudo, a razão Bax/Bcl-2 foi positiva apenas em 72 h. Esses resultados sugerem que a expressão gênica se traduzida em formação do heterodímero Bax-Bcl-2 sinaliza e promove a sobrevivência celular até 48 h, período cujos sinais de sobrevivência possivelmente estariam induzindo o bloqueio do ciclo em resposta ao dano (Wang *et al.*, 2013). A partir desse tempo, apesar de pouco expressiva, os mecanismos de morte apoptótica seriam ativados. No entanto, deve-se ter cautela quanto à interpretação de morte ou sobrevivência celular a partir desses dados, visto que a diferença entre os transcritos de *BAX* e *BCL-2* foi muito baixa e direcionada apenas para a via mitocondrial; além disso, não foram realizadas análises de síntese e/ou degradação das proteínas Bax e Bcl-2 ou de suas proteínas regulatórias. Dessa forma, a alteração do potencial de membrana mitocondrial, a fragmentação de DNA e a exposição da fosfatidilserina são indicadoras de morte apoptótica que devem ser analisadas em associação aos níveis dos transcritos. Simultaneamente, esses dados sugerem que a indução da apoptose por SNP foi tardia e pouco expressiva, e parece ser uma atividade secundária ao bloqueio G2/M.

O principal mecanismo de citotoxicidade do selenito é decorrente da geração de estresse oxidativo através da ciclagem intracelular de selênio com oxigênio, glutatona e tióis, produzindo grande quantidade de superóxidos e bissulfetos (Rikiishi, 2007). Em tumores sólidos, várias enzimas antioxidantes, como catalase e superóxido dismutase, são negativamente reguladas (Fang *et al.*, 2007). Assim, a produção excessiva de radicais livres pode exaurir a capacidade antioxidante dos mecanismos de defesa, causar estresse oxidativo, desestabilizar mitocôndrias e ativar a morte ou o bloqueio do ciclo celular (Engel *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2013). No corrente estudo, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada nas células A549 comparativamente às células da linhagem promielocítica HL60. A linhagem celular HL60 é um modelo

frequentemente utilizado para avaliação de componentes oxidantes e antioxidantes, além de ser estudada como precursora de granulócitos, monócitos e macrófagos (Teufelhofer *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2012). O selol surpreendentemente não apresentou potencial oxidativo às células HL60. Por outro lado, acúmulo de EROs foi observado nas células A549 nos maiores tempos de exposição às nanocápsulas de selol. Esse resultado sugere que o potencial oxidativo induzido pelo selol é variável de acordo com o tipo celular.

Adicionalmente, o aumento dos níveis de EROs coincidente com o aumento dos transcritos de *GPXI* (glutathione peroxidase 1) nas células A549 indicam que as células responderam à exposição às nanocápsulas de selol por ativação dos sistemas de defesa antioxidante e, todavia, EROs foram também detectadas, fornecendo evidências diretas e indiretas da indução de estresse oxidativo. Apesar da detecção de estresse oxidativo, SNP não alterou a expressão gênica de *CAT* (catalase) nos tempos avaliados, em concordância com os resultados observados em um estudo com células de câncer de próstata tratadas com o selol (150 μ M) por 24 h e 48 h (Ksiazek *et al.*, 2013). A catalase participa do mecanismo primário de defesa antioxidante, importante na reação de catalisação do peróxido de hidrogênio a oxigênio e água e consequente tolerância ao estresse oxidativo (Brown *et al.*, 1999; Petković *et al.*, 2011). Glutathione peroxidase I catalisa as reações secundárias de desintoxicação do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos, usando a GSH como acceptor dos radicais livres (Zelko *et al.*, 2002; Petković *et al.*, 2011). Após o intervalo de tempo requerido para a defesa antioxidante primária, a célula é estimulada a ativar outros mecanismos de defesa, provavelmente pela exaustão de componentes da linha primária (Ksiazek *et al.*, 2013). Como os mecanismos bioquímicos que ativam a expressão gênica são extremamente dinâmicos, pode ser que a ativação de *CAT*, como parte do mecanismo da primeira linha de defesa antioxidante, tenha ocorrido em tempos anteriores aos avaliados. Por outro lado, o estresse oxidativo pode de fato não ativar a desintoxicação via catalase, fazendo-se necessária a realização de novos estudos em intervalos curtos de tratamento para confirmar o corrente resultado. Por tudo isso, sugere-se que SNP provoca a produção de espécies reativas de oxigênio nas células A549 e, de acordo com relatos prévios, a produção de EROs pode estar associada ao processo de morte celular bem como à inibição da proliferação, como evidenciado por Chen *et al.*, 2013.

Estudos prévios têm buscado elucidar os efeitos do selol sobre células cancerosas (Suchocki *et al.*, 2007; Estevanato *et al.*, 2012; Wilczynska *et al.*, 2011; Ksiazek *et al.*, 2013). Suchocki *et al.*, 2007 demonstraram alterações mitocondriais e fragmentação de DNA em células de leucemia. Wilczynska *et al.*, 2011 e Estevanato *et al.*, 2012 observaram translocação da fosfatidilserina em linhagens celulares de carcinomas de colo e mama, respectivamente. Suchocki *et al.*, 2010 apresentaram envolvimento de EROs e inibição de *CYP1A1* em células de carcinoma de colo. Contrariamente, em células de adenocarcinoma de pulmão, o selol em encapsulado em nanocápsulas mostrou-se ativador do gene da enzima de fase I da superfamília P450 (*CYP1A1*), associada à metabolização de xenobióticos e detoxificação. Além disso, a exposição da fosfatidilserina, a alteração no potencial de membrana mitocondrial, a fragmentação de DNA e as alterações na permeabilidade da membrana plasmática foram observados em baixas porcentagens de células A549 após os tratamentos com o selol livre ou nanoencapsulado. O bloqueio do ciclo, identificado como mecanismo primário de controle das células A549, foi evidenciado pela primeira vez no presente estudo. Esses resultados, no entanto, não excluem a possibilidade de que o selol possa induzir pronunciada morte celular em maiores concentrações e/ou tempos prolongados de tratamento. Um prolongado bloqueio no ciclo pode desencadear a apoptose, de forma que a morte celular pode não ser devido a danos primários, mas pode ser também consequência de um acúmulo de danos secundários que surgem do bloqueio do ciclo celular em si (Shinomiya *et al.*, 2000).

Em estudos anteriores, o tratamento com selênio inibiu o crescimento celular, promoveu o bloqueio do ciclo celular e induziu a apoptose em diferentes células de câncer (Swede *et al.*, 2003; El-Bayoumy *et al.*, 2005; El-Bayoumy *et al.*, 2006). Além disso, a combinação dos componentes selênicos com outras drogas quimioterápicas favoreceu a uma mais pronunciada indução da apoptose, bloqueio da progressão do ciclo celular e inibição da proliferação celular (Qi *et al.*, 2012). Particularmente, o selol tem apresentado atividade anticâncer como resultado de sua influência sobre a proteína de resistência a multidrogas Pgp e provavelmente pelo aumento da produção de EROs (Suchocki *et al.*, 2007; 2010; Ksiazek *et al.*, 2013). O presente estudo propõe o efeito citostático (bloqueio G2/M) do selol como uma nova possibilidade de controle tumoral. De fato, os resultados dos ensaios *in vitro* suportam os achados prévios e contribuem

para as evidências de que o selol apresenta potencial para ser usado em quimioterapia anticâncer, principalmente como uma droga adjuvante.

Baseando-se nos resultados obtidos *in vitro*, foram desenvolvidos adenocarcinomas pulmonares em camundongos A/J para a avaliação da formulação SNP *in vivo*. O modelo da carcinogênese pulmonar induzida por uretano foi selecionado fundamentalmente por originar adenocarcinomas pulmonares em 100% dos animais A/J, e secundariamente porque o microambiente tumoral no pulmão favorece um elevado acúmulo de nanopartículas nesse sítio ao serem administradas por via endovenosa (Moghimi *et al.*, 2001; Lee & Matsushita, 2005). Além disso, o adenocarcinoma induzido por uretano apresenta características comuns ao adenocarcinoma humano (Dragani, 2003; Stearman *et al.*, 2005). Assim como as células A549, as células de adenocarcinoma pulmonar induzido por uretano são originárias de pneumócitos tipo II (Hall *et al.*, 2007). Devido à natureza proliferativa dos pneumócitos tipo II, estabeleceu-se que os tumores induzidos por uretano são oriundos desse tipo celular, e, dependendo do estágio de desenvolvimento, podem ser do tipo adenoma e/ou adenocarcinoma (Thaete *et al.*, 1978; Nomori *et al.*, 1994; Mason *et al.*, 2000; Satoh *et al.*, 2013). Em termos moleculares, a ativação mutacional do oncogene *K-RAS*, por exemplo, é um forte estímulo proliferativo suficiente para a iniciação do tumor e bastante frequente em humanos e nos animais A/J portadores de adenocarcinoma (Minowada & Miller, 2009; Lee *et al.*, 2010). Expressões gênicas de ciclinas de transição G2/M também se encontram alteradas em ambos os casos (Stearman *et al.*, 2005).

Na carcinogênese pulmonar induzida por uretano, o sucesso do desenvolvimento do tumor baseia-se na utilização de animais sensíveis ao carcinógeno, como os camundongos A/J, e idealmente com 8 a 10 semanas de vida (Reymão *et al.*, 1997; Zaynagetdinov *et al.*, 2011). Os camundongos A/J são mais susceptíveis que os demais porque apresentam fenótipo dominante do locus *Pas1* (susceptibilidade ao adenoma pulmonar 1) sobre o locus *Par2* (resistência ao adenoma pulmonar 2). Nesse locus, o gene da DNA polimerase propensa ao erro parece ser a origem do fenótipo susceptível ao tumor e a causa das mutações de ponto em *K-RAS* (Lee & Matsushita, 2005).

O processo de indução tumoral no presente estudo foi marcado pela debilidade dos animais e perda de peso corporal durante o período de administração do agente

carcinogênico. Durante a fase de desenvolvimento, 20% dos animais apresentaram óbitos associados à aplicação do uretano e/ou ao processo da carcinogênese. Essas manifestações podem estar relacionadas ao potencial do uretano em provocar aplasia de medula, fibrose de linfonodos e pneumonia agranulocítica fatal (Field & Lang, 1988).

Em conformidade com os relatos da literatura, os carcinomas induzidos por uretano apresentaram-se como múltiplos nódulos tumorais difusamente distribuídos pelo pulmão (Zaynagetdinov *et al.*, 2011; Satoh *et al.*, 2013). Por esse motivo, é comum entre os estudos avaliar os tumores macroscopicamente apenas pelas avaliações de área e quantidade de nódulos superficiais (Lee & Matsushita, 2005; Balli *et al.*, 2011). Consistente com relatos prévios, os animais desse estudo apresentaram 29 nódulos superficiais em média, com diâmetro médio de 0,30 mm²/nódulo (Lee & Matsushita, 2005; Balli *et al.* 2011). No entanto, o tamanho e o número de nódulos, assim como o estágio de agressividade tumoral são bastante variáveis de acordo com a metodologia de indução empregada, dependendo de alguns fatores como: concentração e número de doses do uretano, idade do animal, período de desenvolvimento do tumor, linhagem dos camundongos e alterações genéticas nos animais (Minowada & Miller, 2009; Lee *et al.*, 2010; Zaynagetdinov *et al.*, 2011; Kreisel *et al.*, 2012; Satoh *et al.*, 2013).

A atividade antitumoral do selol não foi, até o presente momento, avaliada em estudos animais. Dessa forma, as doses de SNP escolhidas para a realização dos tratamentos basearam-se em estudos realizados com outras formas de selenito e em estudo de dose letal causada pelo selol livre administrado por via intraperitoneal (Jazrzebsky *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2009). Assim, foram adotadas duas doses de SNP (5 mg Se/kg e 10 mg Se/kg), administradas por via endovenosa a cada 48 h. A menor área dos tumores superficiais tratados com SNP 10 mg/kg sem que tenha sido alterado o número de nódulos é sugestivo de que SNP pode ter afetado o crescimento dos tumores, e, conforme esperado, não ter apresentado atividade sobre a diminuição do número de nódulos, seja por surgimento de novos nódulos ou por remoção completa deles. No entanto, quando os tumores foram avaliados por microtomografia, não foram detectadas diferenças no volume dos nódulos tumorais totais em decorrência do tratamento com SNP. Possivelmente, o selol apresentou maior atividade sobre os tumores superficiais que os tumores centrais, conforme evidências prévias de que os tumores pulmonares induzidos por uretano aparentam desenvolver-se regularmente e caracterizam-se por um decréscimo progressivo na atividade proliferativa, provavelmente porque as células no

centro do tecido neoplásico se dividem em uma taxa menor que aquelas da periferia (Shimkin, 1961).

A comparação entre os grupos tratados e não tratados com SNP não foi possível sem as análises histológicas, sobretudo a marcação imunoistoquímica da proteína ki67. Os tumores identificados histologicamente foram do tipo adenoma e adenocarcinoma. Os índices de proliferação dos tumores tratados com SNP foram estatisticamente semelhantes aos dos animais não tratados. Além disso, a atividade proliferativa nos nódulos dos animais com tumores não tratados foi bastante baixa, que pode ser devido ao estágio inicial de malignidade. Muitos nódulos apresentavam-se como tumores benignos, e inclusive os carcinomas apresentavam em geral baixa invasividade. Minowada & Miller, 2009 demonstraram que os tumores de pulmão induzidos por uretano crescem continuamente, mas com um concomitante decréscimo na taxa proliferativa. Especificamente, o tempo de duplicação do volume tumoral foi aproximadamente 3,5 vezes mais rápido em 4-5 semanas que em 7-12 semanas após a injeção com uretano (Minowada & Miller, 2009). Como o tratamento com o selo iniciou-se na 16ª semana após a última injeção com uretano, a atividade proliferativa dos nódulos foi baixa. Além disso, outra possível explicação para o baixo índice proliferativo dos tumores desenvolvidos nesse estudo é que muitos nódulos foram diagnosticados como adenomas, nos quais também foram descritas reduzidas taxas de proliferação com o tempo (Dyson & Heppleston, 1976).

Uma limitação desse estudo foi a ausência de um estudo prévio sobre a evolução do tumor de pulmão induzido por uretano comparativamente à avaliação da atividade proliferativa por meio de marcadores moleculares, como a imunomarcação da proteína ki67. Como mencionado anteriormente, existem diversas metodologias de indução de tumor com uretano em diferentes linhagens animais e em diferentes estágios tumorais, não havendo um consenso a respeito da metodologia e tempo de análise adequados a uma maior atividade proliferativa (Bauer *et al.*, 2000; Stearman *et al.*, 2005; Balli *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Estudos prévios mostraram que a morte celular é quase indetectável no modelo de tumor pulmonar induzido por uretano (Shimkin & Polissar, 1955; Minowada & Miller, 2009). Assim, as baixas taxas de apoptose podem ter apresentado um profundo impacto no crescimento tumoral sobre um relativamente pequeno número de ciclos de divisão celular (Lamerton & Steel, 1968; Dyson & Heppleston, 1976). Na verdade, não podemos excluir a possibilidade de que o menor

tamanho dos nódulos superficiais evidenciado no presente estudo seja devido à morte celular. Indubitavelmente, o adenocarcinoma de pulmão em estágio de maior proliferação celular seria um modelo mais adequado para avaliar o potencial citostático do selol.

Outro fator que pode ter sido determinante na baixa efetividade do tratamento foi o intervalo de tempo entre as administrações de SNP. Nos ensaios *in vitro*, os maiores tempos de exposição celular à SNP desencadearam maiores respostas antiproliferativas. Flavopiridol, por exemplo, é um inibidor de CDKs que pode agir em muitas fases do ciclo celular; no entanto, sua farmacocinética deve permitir exposição suficiente do tecido alterado durante todo o ciclo celular, uma limitação que tem sido associada ao insucesso dessa molécula (Shapiro *et al.*, 2006). Comparativamente, o selenito de sódio administrado diariamente por via intraperitoneal durante 15 dias apresentou efeito anticâncer em modelo animal de câncer de colorretal (Yang *et al.*, 2009).

Infiltrado inflamatório no microambiente tumoral é um processo que pode aumentar o desenvolvimento dos cânceres de pulmão (Stathopoulos *et al.*, 2007; Balli *et al.*, 2011; Kreisel *et al.*, 2012). Células inflamatórias podem induzir angiogênese e remodelamento da matriz extracelular, além de desestabilizar células epiteliais durante a transformação maligna (Balli *et al.*, 2011). Focos de infiltrado inflamatório peritumoral foram pouco frequentes nos pulmões tratados e não tratados com SNP. Essa observação está de acordo com relatos da literatura que demonstraram que a carcinogênese induzida por uretano caracteriza-se pela baixa incidência de infiltrado inflamatório peritumoral, apresentando-se reduzida em todos os estágios do desenvolvimento (Kreisel *et al.*, 2012). Esses dados suportam a idéia de que os tumores induzidos por uretano podem desenvolver-se independentes de células inflamatórias e, além disso, o limitado infiltrado inflamatório sugere um baixo grau de malignidade.

Os efeitos indesejados causados pelo tratamento foram mensurados pela avaliação do peso corpóreo dos animais, avaliações dos principais órgãos relacionados ao metabolismo e depuração de drogas e pela toxicidade às células da medula óssea e sanguíneas. De maneira geral, as nanocápsulas de selol foram bem toleradas pelos animais submetidos a 10 aplicações da formulação, sem alterações comportamentais ou registro de óbito. A diminuição do peso corpóreo foi mínima durante o tratamento e não estatisticamente significativa. Os órgãos baço e fígado apresentaram-se aumentados em

tamanho. O baço é amplamente reconhecido na eliminação de nanopartículas do sangue, fato que pode associar-se ao aumento de tamanho do órgão (Jones *et al.*, 2013). Apesar do aumento do fígado, a função hepática foi preservada (TGO e TGP normais). Esses resultados mostram-se compatíveis com os estudos sobre a baixa toxicidade do selol e de outros compostos selênicos orgânicos (Jastrzebski *et al.*, 1995; Ip, 1998; Li *et al.*, 2009). Especialmente, redução da toxicidade por compostos selênicos nanoestruturados foi evidenciada por Zhang *et al.*, 2008. No presente estudo, os autores demonstraram que aplicações diárias de selênio de 5 mg/kg durante sete dias aumentaram os níveis de TGO e TGP. Em nosso estudo, doses de selênio de 5 mg/kg e 10 mg/kg durante 10 dias não causaram disfunções hepáticas. Análises histológicas desses órgãos são necessárias para uma melhor compreensão dos possíveis danos associados ao aumento dos órgãos.

A homeostase do sistema hematopoiético é criticamente dependente do balanço entre morte, proliferação e diferenciação celular (Mazur *et al.*, 2003). A toxicidade hematopoiética associada a terapias antineoplásicas frequentemente resulta em neutropenia, anemia, risco aumentado de infecções e atraso no tratamento (Djazayeri *et al.*, 2005). Visto que a medula óssea é um potencial órgão alvo de exposição química, a contagem das células do sangue periférico e a avaliação da proliferação ou dano ao DNA das células da medula óssea são importantes componentes dos estudos de toxicidade (Travlos, 2006). No presente estudo, o tratamento SNP não provocou alteração na proliferação das células da medula óssea. No entanto, SNP 10 mg/kg causou um aumento na fragmentação de DNA de cerca de 3% em relação aos animais com tumor não tratados. Porém, essa fragmentação foi similar à fragmentação de DNA apresentada nas células da medula óssea dos animais sem tumor. Apesar dos baixos índices registrados, percebeu-se uma relação dependente da dose de SNP sobre a fragmentação de DNA das células da medula. A fragmentação de DNA pode ser consequência de danos ao material genético, associados ou não aos processos de morte celular. Adicionalmente, as contagens diferenciais de leucócitos e plaquetas não foram variáveis devido ao tratamento SNP. Um volume plaquetário médio (MPV) baixo, independente do número de plaquetas, é indicador de danos à medula óssea, como normalmente ocorre na quimioterapia (Grotto *et al.*, 2004; Comar & Silva, 2009). No corrente estudo, não houve alterações no MPV em decorrência do tratamento com SNP. Essas evidências são sugestivas de funcionamento normal da medula óssea após múltiplas aplicações do selol em encapsulado.

De acordo com os resultados do eritrograma, parece que as alterações eritrocíticas decorrentes do tratamento SNP associaram-se a alterações no conteúdo de hemoglobina, que possivelmente levaram a diminuições no volume médio dos eritrócitos (MCV). Alterações relacionadas ao nível de hemoglobina foram também expressas nas avaliações de MCH (hemoglobina corpuscular média) e MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média), registradas apenas nos animais tratados com a menor dose de SNP. Da mesma forma, diminuição na contagem de eritrócitos foi encontrada apenas nos animais tratados com SNP 5 mg/kg. Esses resultados sugerem que as alterações nos eritrócitos não foram dependentes da dose e podem estar relacionadas a uma perda de hemoglobina. Complementariamente, o ensaio de hemólise revelou baixa capacidade hemolítica da formulação SNP, registrada pela sutil coloração avermelhada do meio de suspensão celular. Essa alteração eritrocítica pode ser explicada pela sensibilidade das hemácias ao estresse oxidativo, com consequente indução de danos às membranas celulares (Banerjee *et al.*, 2008). Como demonstrado nos ensaios *in vitro*, o selol tem potencial de produzir espécies reativas de oxigênio em alguns tipos celulares. Como os eritrócitos são células anucleadas e deficientes em componentes de reparo, suas membranas são altamente susceptíveis à peroxidação lipídica, tendo como consequências a perda de hemoglobina e a alteração no balanço de íons K⁺ entre célula e meio externo (Cazzola *et al.*, 2003; Kunwar *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2008). Assim, as alterações eritrocíticas, mesmo que pouco expressivas, podem estar associadas à hemólise oxidativa.

As propriedades de superfície das nanocápsulas de selol foram também avaliadas quanto à ativação imunológica. Um dos principais obstáculos ao uso das nanopartículas *in vivo* é a sua rápida eliminação pelas células do sistema mononuclear fagocitário, que reduz a eficácia e a aprovação das nanoformulações experimentais. Associado a isso, apenas duas nanoformulações para tratamento de câncer tem sido aprovadas para uso clínico: doxil (doxorubicina lipossomal) e abraxano (nanopartícula de paclitaxel conjugada a proteína). A conjugação de polímeros hidrofílicos à superfície dos nanocarreadores é uma alternativa que tem sido utilizada para aumentar o tempo de circulação das nanopartículas no sangue (Jones *et al.*, 2013; Gaowa *et al.*, 2014). O sistema complemento tem a função de destruir e remover substâncias não próprias, seja por lise direta ou por função leucocitária. O principal evento de ativação do sistema complemento é a clivagem de C3 em C3a e C3b (Roos *et al.*, 2001). O copolímero

PVM/MA nas nanocápsulas SNP apresenta sua porção hidrofílica voltada para o meio externo, o que possivelmente contribuiu para que as nanocápsulas de selol não ativassem o sistema complemento (Li & Lee, 2010). Entretanto, as sutis diminuições nos índices de C3b em decorrência da incubação com SNP 100 µg/mL em comparação a SNP 10 µg/mL e de ambos em relação ao controle negativo foram sugestivos de uma possível alteração nos eventos relacionados à ligação entre C3 e/ou C3b à nanopartícula. Por isso, foi avaliada a ativação do sistema complemento por incubação do zimosan ao mesmo soro que SNP. Interessantemente, as nanocápsulas SNP causou uma diminuição da ativação do sistema complemento provocada pelo zimosan. Em todos os grupos tratados com SNP foram observadas reduções nos índices de C3b em relação aos seus respectivos controles (SNP 10 µg/mL vs C⁻; SNP 100 µg/mL vs C⁻; SNP + Zimosan vs Zimosan). Esses dados em conjunto indicam que SNP não ativa o sistema complemento. A redução da ativação do zimosan pode estar associada a uma possível ligação das nanocápsulas às proteínas C3 e C3b, as quais estariam menos disponíveis à ligação ao zimosan. Um estudo realizado por Camacho *et al.*, 2011 é indicativo de tal processo, visto que foi demonstrado que o copolímero PVM/MA pode ligar-se às formas íntegra ou clivada da proteína C3. Entretanto, a deposição das proteínas do complemento na superfície da partícula não significa ativação. Em alguns casos, após sinalizações da cascata do complemento, C3 pode depositar-se não covalentemente à superfície da nanopartícula, um processo que pode não ativar o sistema complemento (Camacho *et al.*, 2011). Dessa forma, mais estudos devem ser realizados para desvendar o potencial da cobertura polimérica de PVM/MA, em especial na composição SNP, sobre o sistema complemento.

A resposta inflamatória às nanopartículas é mantida por uma relação entre as sinalizações Th1/Th2. As células Th ativam e dirigem outras células do sistema imunitário, como linfócitos T e B e macrófagos, para secretarem diferentes citocinas (Dobrovolskaia & McNeil, 2007). As células Th1 produzem principalmente IFN- γ , IL-2 e IL-12, enquanto as células Th2 liberam predominantemente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. TNF- α é secretado por ambos os tipos celulares (Liu *et al.*, 2009). Dentre todas as citocinas Th1 e Th2 analisadas no presente estudo, apenas a IL-8 foi detectada em níveis significativos após 24 h de tratamento. As citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6 e TNF- α apresentaram ativações mínimas, semelhantes aos controles negativos. Níveis de TNF- α e IL-1 β abaixo de 500 pg/mL, por exemplo, foram relatados como incapazes de ativar resposta inflamatória, sendo esse valor bastante superior aos níveis encontrados para as

mesmas citocinas no presente estudo (Subia *et al.*, 2013). Em geral, é mais provável que as nanopartículas carregadas negativamente, como a SNP, não induzam resposta inflamatória (Tan *et al.*, 1999). O aumento de IL-8 é encontrado em resposta a várias drogas, como paclitaxel e 5-fluoracil (Gales *et al.*, 2013). Nanosistemas biocompatíveis como lipossomas também podem ativar essa citocina (Li *et al.*, 2005; Yang & Choi, 2013). A significância de IL-8 no processo de resposta das células cancerosas aos quimioterápicos não é completamente compreendida. IL-8 é uma quimiocina pró-inflamatória que age como quimioatraente de leucócitos e sobre a neovascularização (Schadendorf *et al.*, 1993). O aumento de IL-8 pode ser observado após distintos estímulos. Alguns estudos relatam que IL-8 é um indicador responsivo inicial de exposição celular às nanopartículas, relacionando-se à habilidade das nanopartículas de serem internalizadas via fagocitose ou endocitose, causarem estresse e desencadearem a inflamação (Kim & Choi, 2012; Murray *et al.*, 2013). Sua ativação também tem sido observada em resposta à sinalização antioxidante e ativação de NF- κ B (Schau *et al.*, 2012). A produção de IL-8 no microambiente inflamatório peritumoral pode agravar o estado inflamatório e favorecer a sobrevivência e a migração das células tumorais (Gales *et al.*, 2013). No corrente estudo, o aumento de IL-8 pode estar associado à ativação por NF- κ B, um importante mediador inflamatório responsável por ativar também as citocinas IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- α (Umezawa *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2009; Bunz *et al.*, 2012). Essas citocinas, embora produzidas em níveis não ativadores no presente estudo, apresentaram pequenas variações nos animais tratados com SNP. Ativação de NF- κ B e de citocinas Th1 por nanopartículas de PVM/MA foi relatada por Tamayo *et al.*, 2010. Esses resultados sugerem que as nanopartículas SNP provocam pequenas alterações na expressão de citocinas Th1 em níveis insuficientes para ativar uma resposta pró-inflamatória, registrando-se um aumento expressivo apenas de IL-8 dentre as citocinas pró-inflamatórias estudadas.

O plasma humano contém mais que 3700 proteínas diferentes, das quais as mais abundantes são albumina, fibrinogênio e globulinas (Aggarwal *et al.*, 2009). Após administração endovenosa, o sangue é o primeiro ambiente fisiológico com o qual as nanopartículas interagem. Inicialmente, as proteínas mais abundantes são adsorvidas à superfície das partículas; no entanto, com o tempo elas são substituídas por proteínas de maiores afinidades (Vroman *et al.*, 1980). Durante a adsorção às nanopartículas, as proteínas podem sofrer rearranjos estruturais, chamados de alterações conformacionais, os quais variam de acordo com as propriedades físico-químicas das nanopartículas e as

características do microambiente fisiológico, como o pH e a disponibilidade de íons (Simón-Vázquez *et al.*, 2014). Particularmente, as alterações conformacionais das proteínas do soro podem ter consequências negativas, tais como perdas de função, modificações na interação com outros elementos ou mesmo iniciação de inflamação e/ou alergias (Podila *et al.*, 2012). Muitos estudos relatam adsorção de proteínas plasmáticas a nanopartículas, especialmente a nanopartículas poliméricas, tendo sido por esse motivo alvo de investigação no presente estudo (Aggarwal *et al.*, 2009; Nel *et al.*, 2009; Simón-Vázquez *et al.*, 2014). As pequenas alterações na exposição dos resíduos aromáticos das proteínas albumina, fibrinogênio e globulinas causadas por SNP são sugestivas da baixa reatividade das nanocápsulas com as proteínas plasmáticas. O deslocamento do pico de fluorescência é indicativo de algum rearranjo estrutural, e no corrente estudo o deslocamento máximo evidenciado foi de 2 nm, sugestivo de leve ou nenhuma alteração na conformação das proteínas estudadas (Dockal *et al.*, 2000). A perda da estrutura compacta de alfa hélice para folha beta, por exemplo, causa descompactação da albumina e alteração no espectro de fluorescência, com consequente alteração na solubilidade em água e a exposição dos sítios ativos (Simón-Vázquez *et al.*, 2014). Conforme evidenciado com as nanocápsulas SNP, nanopartículas poliméricas hidrofílicas e carregadas negativamente usualmente provocam menores alterações nas conformações das proteínas que as nanopartículas neutras ou catiônicas (Gessner *et al.*, 2002; 2003).

Por tudo isso, o presente estudo propõe a realização de novos ensaios direcionados para o potencial citostático do selol, os benefícios das nanocápsulas em comparação à forma livre e seu emprego concomitante a outros fármacos, adotando-se como estratégia o prolongamento da terapia combinada para a manutenção de um perfil de efeito colateral tolerável. A idéia de prolongar a terapia é frequentemente almejada para se alcançar a sobrevida livre da progressão da doença ou um aumento na sobrevida global. Essa idéia é muito comum em tumores sólidos, como cólon, próstata e mama. No entanto o câncer de pulmão é comumente mais agressivo e resistente à quimioterapia, tornando-se mais desafiadora a entrega de fármacos mantendo-se a tolerância ao tratamento (Gentzler & Patel, 2014).

8. CONCLUSÕES

O presente estudo relatou o desenvolvimento de uma formulação de nanocápsulas de selol estável e monodispersa.

Além disso, os resultados obtidos permitem concluir que:

1. A formulação de nanocápsulas de selol mantém a atividade do selol livre contra células de adenocarcinoma pulmonar *in vitro* enquanto provoca menor redução da viabilidade celular sobre células normais.
2. A atividade citotóxica do selol difere entre tipos celulares, sobretudo entre subtipos de carcinoma de pulmão de células não pequenas, não sendo efetivo na redução da viabilidade celular da linhagem de carcinoma de pulmão de células escamosas.
3. O selol age primariamente como um agente citostático em células de adenocarcinoma de pulmão, produz espécies reativas de oxigênio e pode ativar mortes celulares apoptóticas ou necróticas.
4. A formulação de nanocápsulas de selol apresenta baixos potenciais inflamatório e hemolítico, não ativa o sistema complemento e provoca nenhuma ou leves alterações conformacionais em proteínas plasmáticas.
5. Em camundongos portadores de adenocarcinoma de pulmão, o selol encapsulado em nanocápsulas provocou diminuição da área dos nódulos tumorais superficiais, no entanto, sem reduzir o número desses nódulos, assim como o volume dos nódulos tumorais totais e a atividade proliferativa.
6. As nanocápsulas de selol não causaram danos relevantes às células da medula óssea.
7. Alterações no eritrograma foram detectadas devido aos tratamentos com as nanocápsulas de selol, as quais não foram acompanhadas de alterações no leucograma e plaquetograma.
8. Tamanhos aumentados do fígado e do baço foram evidenciados devido aos tratamentos com as nanocápsulas de selol, no entanto sem alterações bioquímicas indicativas de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, assim como emagrecimento dos animais.

Tomados em conjunto, os resultados apontam para a utilização das nanocápsulas de selol em adenocarcinomas pulmonares em estágios proliferativos, bem como prolongados tempos de exposição e/ou maiores doses de selênio, a fim de melhor verificar o potencial citostático da formulação e possíveis toxicidades sistêmicas.

9. REFERÊNCIAS

Aggarwal, C.; Langer, C. J. Older age, poor performance status and major comorbidities: how to treat high-risk patients with advanced nonsmall cell lung cancer. **Curr Opin Oncol.**, v. 24, p. 130-136, 2012.

Aggarwal, P.; Hall, J. B.; McLeland, C. B.; Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 61, n. 6, p. 428-437, 2009.

American Cancer Society: Cancer facts and figures 2008, American Cancer Society, Atlanta, 2008.

Annibaldi, A.; Heulot, M.; Martinou, J.; Widmann, C. TAT-RasGAP317–326-mediated tumor cell death sensitization can occur independently of Bax and Bak. **Apoptosis**, 2013. DOI 10.1007/s10495-013-0958-8.

Arbós, P., Arangoa, M. A., Campanero, M. A., Irache, J. M. Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 129–136, 2002.

Arthur, J. R.; McKenzie, R. C.; Beckett, G. J. Selenium in the immune system. **J Nutr**, v. 133, p. 1457S-1459S, 2003.

Azzoli, C. G.; Temin, S.; Aliff, T.; Baker, Jr S.; Brahmer, J.; Johnson, D. H., Laskin, J. L.; Masters, G.; Milton, D.; Nordquist, L.; Pfister, D. G.; Piantadosi, S.; Schiller, J. H.; Smith, R.; Smith, T. J.; Strawn, J. R.; Trent, D.; Giaccone, G. Focused update of 2009 American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on chemotherapy for stage IV non–small-cell lung cancer. **J Clin Oncology**, v. 29, p. 3825-3831, 2011.

Balli, D.; Zhang, Y.; Snyder, J.; Kalinichenko, V. V.; Kalin, T. V. Endothelial cell-specific deletion of transcription factor FOXM increases urethane-induced lung carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 71, n. 1, p. 40–50, 2011.

Banerjee, A.; Kunwar, A.; Mishra, B.; Priyadarsini, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 134–139, 2008.

Bareford, L. M.; Swaan, P. W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 748-758, 2007.

Bauer, A. K.; Dwyer-Nield, L. D.; Malkinson, A. M. High cyclooxygenase 1 (COX-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2) contents in mouse lung tumors. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 4, p. 543-550, 2000.

Belinsky, S. A.; Nikula, K. J.; Palmisano, W. A.; Michels, R.; Saccomanno, G.; Gabrielson, E.; Baylin, S. B.; Herman, J. G. Aberrant methylation of p16(INK4a) is

an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 11891–11896, 1998.

Bennett, V. A.; Davies, E. A.; Jack, R. H.; Mak, V.; Moller, H. Histological subtype of lung cancer in relation to socio-economic deprivation in South East England. **BMC Cancer**, v. 8, p. 139, 2008.

Bhattacharya, S.; Oksbjerg, N.; Young, J. F.; Jeppesen, P. B. Caffeic acid, naringenin and quercetin enhance glucose-stimulated insulin secretion and glucose sensitivity in INS-1E cells. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 2013. doi: 10.1111/dom.12236.

Birringer, M.; Pilawa, S.; Flohe, L. Trends in selenium biochemistry. **Nat. Prod. Rep.**, v. 19, p. 693–718, 2002.

Boelens, M. C.; Kok, K.; Vlies, P. V. D.; Vries, G. V. D.; Sietsma, H.; Timensa, W.; Postm, D. S.; Groen, H. J. M.; Berg, A. V. D. Genomic aberrations in squamous cell lung carcinoma related to lymph node or distant metastasis. **Lung Cancer**, v. 66, p. 372–378, 2009.

Brozmanová, J. Selenium and cancer: from prevention to treatment. **Klin Onkol.**, v. 24, n. 3, p. 171-179, 2011.

Brown, K. C.; Witte, T. R.; Hardman, W. E.; Luo, H.; Chen, Y. C.; Carpenter, A. B.; Lau, J. K.; Dasgupta, P. Capsaicin displays anti-proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models via the E2F pathway, **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e10243, 2010.

Brown, M. R.; Miller, F. J. Jr.; Li, W. G.; Ellingson, A. N.; Mozena, J. D.; Chatterjee, P.; Engelhardt, J. F.; Zwacka, R. M.; Oberley, L. W.; Fang, X.; Spector, A. A.; Weintraub, N. L. Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v. 85, p. 524-533, 1999.

Bunz, H.; Plankenhorn, S.; Klein, R. Effect of buckminsterfullerenes on cells of the innate and adaptive immune system: an in vitro study with human peripheral blood mononuclear cells. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 4571-4580, 2012.

Burczynski, M. E; Penning, T. M. Genotoxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ortho-Quinones Generated by Aldo-Keto Reductases Induce CYP 1A1 via Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Cancer Res.**, v. 60, p. 908–915, 2000.

Camacho, A. I.; Martins, R. C.; Tamayo, I.; Souza, J.; Lasarte, J. J.; Mansilla, C.; Esparza, I.; Irache, J. M.; Gamazo, C. Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as innate immune system activators. **Vaccine**, v. 29, p. 7130–7135, 2011.

Carneiro, M. L. B.; Nunes, E. S.; Peixoto, R. C. A.; Oliveira, R. G. S.; Lourenço, L. H. M.; Silva, I. C. R.; Simioni, A. R.; Tedesco, A. C.; Souza, A. R.; Lacava, Z. G. M.; Bão, S. N. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, p. 11, 2011.

Carney, B. K.; Silva, V. C.; Cassimeris, L. The microtubule cytoskeleton is required for a G2 cell cycle delay in cancer cells lacking stathmin and p53. **Cytoskeleton**, v.69, p. 278–289, 2012.

Castedo, M.; Ferri, K.; Roumier, T.; Métivier, D.; Zamzami, N.; Kroemer, G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. **J Immunol Methods**, v. 265, p. 39-47, 2002.

Cazzola, R.; Russo-Volpe, S.; Cervato, G.; Cestaro, B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. **Eur J Clin Invest**, v. 33, p. 924–930, 2003.

Chaudiere, J.; Courtin, O.; Leclaire, J. Glutathione oxidase activity of selenocystamine: a mechanistic study. **Arch Biochem Biophys**, v. 296, p. 328–336, 1992.

Chen, H.; Zhang, B.; Yao, Y.; Chen, N.; Chen, X.; Tian, H.; Wang, Z.; Zheng, Q. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are involved in the HL-60 cell monocytic differentiation induced by isoliquiritigenin. **Molecules**, v. 17, p. 13424-13438, 2012.

Chen, T.; Chen, M.; Chen, J. Ionizing radiation potentiates dihydroartemisinin-induced apoptosis of A549 cells via a caspase-8-dependent pathway. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59827, 2013.

Chudobova, D; Cihalova, K; Dostalova, S; Ruttkay-Nedecky, B.; Merlos-Rodrigo, M. A.; Tmejova, K.; Kopel, P.; Nejdil, L.; Kudr, J.; Gumulec, J.; Krizkova, S.; Kynicky, J.; Kizek, R.; Adam, V. Comparison of the effects of silver phosphate and selenium nanoparticles on *Staphylococcus aureus* growth reveals potential for selenium particles to prevent infection. **FEMS Microbiol Lett.**, 2013. doi: 10.1111/1574-6968.12353.

Comar, S. R.; Silva, P. H. Determinação laboratorial e aplicação clínica dos parâmetros de volume plaquetário. **RBAC**, v. 41, n. 4, p. 257-265, 2009.

Combs, G. F.; Gray, W. P. Chemopreventive agents: selenium. **Pharmacol Ther**, v. 79, p. 179–92, 1998.

Costa, R. R.; Custódio, C. A.; Arias, F. J.; Rodríguez-Cabello, J. C.; Mano, J. F. Nanostructured and thermoresponsive recombinant biopolymer-based microcapsules for the delivery of active molecules. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 7, p. 895-902, 2013.

Costantini, P.; Belzacq, A. S.; Vieira, H. L.; Larochette, N.; Pablo, M. A.; Zamzami, N.; Susin, S. A.; Brenner, C.; Kroemer, G. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. **Oncogene**, v. 19, p. 307–314, 2000.

Curran, W. J. J.; Paulus, R.; Langer, C. J.; Komaki, R.; Lee, J. S.; Hauser, S.; Movsas, B.; Wasserman, T.; Rosenthal, S. A.; Gore, E.; Machtay, M.; Sause, W.; Cox, J. D. Sequential vs concurrent chemoradiation for stage III non–small cell lung cancer:

randomized phase III trial RTOG 9410, **J Natl Cancer Inst**, v. 103, p. 1452–1460, 2011.

Danner, B. C.; Hellms, T.; Jung, K.; Gunawan, B.; Didilis, V.; Füzesi, L.; Schöndube, F. A. Prognostic value of chromosomal imbalances in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. **Ann Thorac Surg**, v. 92, p. 1038–1043, 2011.

Das, A.; Bortner, J.; Desai, D.; Amin, S.; El-Bayoumy, K. The selenium analog of the chemopreventive compound S, S'-(1, 4-phenylenebis [1, 2-ethanediyl]) bisisothioureia is a remarkable inducer of apoptosis and inhibitor of cell growth in human non-small cell lung cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, p. 158-164, 2009.

Deckbar, D.; Jeggo, P. A.; Löbrich, M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle Checkpoints. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 46, n. 4, p. 271–283, 2011.

Devesa, S. S.; Bray, F.; Vizcaino, A. P.; Parkin, D. M. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. **International Journal of Cancer**, v. 117, p. 294 –299, 2005.

Díaz, B.; Sánchez-Espinel, C.; Arruebo, M.; Faro, J.; Miguel, E.; Magadán, S.; Yagiüe, C.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J.; González-Fernández, A. Assessing Methods for Blood Cell Cytotoxic Responses to Inorganic Nanoparticles and Nanoparticle Aggregates. **Small**, v. 4, p. 2025–2034, 2008.

Djazayeri, K.; Szilvássy, Z.; Peitl, B.; Németh, J.; Nagy, L.; Kiss, A; Szabó, B.; Benko, I. Accelerated recovery of 5-fluorouracil-damaged bone marrow after rosiglitazone treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 522, p. 122–129, 2005.

Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 469 – 478, 2007.

Dockal, M.; Carter, D. C.; Rüker, F. J. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. **Biol. Chem**, v. 275, p. 3042–3050, 2000.

Dong, Y.; Zhang, H.; Hawthorn, L.; Ganther, H. E.; Ip, C. Delineation of the molecular basis for selenium-induced growth arrest in human prostate cancer cells by oligonucleotide array. **Cancer Res**, v. 63, p. 52-59, 2003.

Dongwoo, K.; Eunju, K.; Jiyeong, L.; Soonsang, H.; Wokyung, S.; Namseok, L.; Park, C. G.; Kim, K. Direct synthesis of polymer nanocapsules: self-assembly of polymer hollow spheres through irreversible covalent bond formation. **J Am Chem Soc**, v. 132, n. 28, p. 9908–9919, 2010.

Dragani, T. A. 10 Years of mouse cancer modifier loci: human relevance. **Cancer Res**, v. 63, p. 3011–3018, 2003.

Drake, E. N. Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant. **Med Hypotheses**, v. 67, p. 318–322, 2006.

Du, G.; Sun, T.; Zhang, Y.; Lin, H.; Li, J.; Liu, W.; Wang, Y.; Zhao, B.; Li, H.; Liu, Y. The mitochondrial dysfunction plays an important role in urethane-induced lung carcinogenesis. **European Journal of Pharmacology**, v. 715, p. 395–404, 2013.

Dyson, P.; Heppleston, A. G. Cell kinetics of urethane-induced murine pulmonary adenomata: II. The growth fraction and cell loss factor. **Br. J. Cancer**, v. 33, n. 1, p. 105-111, 1976.

Edge, S. B.; Byrd, D. R.; Compton, C. C.; Fritz, A. G.; Greene, F. L.; Trotti, A. American Joint Committee on Cancer . American Cancer Society. AJCC Cancer Staging Handbook: From the AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer, 2010, 649 p.

El-Bayoumy, K.; Das, A.; Narayanan, B.; Narayanan, N.; Fiala, E. S.; Desai, D.; Rao, C. V.; Amin, S.; Sinha, R. Molecular targets of the chemopreventive agent 1, 4-phenylenebis (methylene)-selenocyanate in human non-small cell lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1369-1376, 2006.

El-Bayoumy, K.; Sinha, R. Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach. **Mutat Res.**, v. 591, p. 224-236, 2005.

Engel, R. H.; Evens, A. M. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. **Front Biosci**, v. 11, p.300–12, 2006.

Estevanato, L. L.; Da Silva, J. R.; Falqueiro, A. M.; Mosiniewicz-Szablewska, E.; Suchocki, P.; Tedesco, A. C, Morais, P. C; Lacava, Z. G. M. Co-nanoencapsulation of magnetic nanoparticles and selol for breast tumor treatment: in vitro evaluation of cytotoxicity and magnetohyperthermia efficacy. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 5287-5299, 2012.

Falqueiro, A. M.; Primo, F. L.; Morais, P. C., Mosiniewicz-Szablewska, E., Suchocki, P., Tedesco, A. C. Selol-loaded magnetic nanocapsules: A new approach for hyperthermia cancer therapy. **Journal of Applied Physics**, v. 109, p. 07B306-1-07B306-3, 2011.

Fang, J.; Nakamura, H.; Iyer, A. K. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. **J Drug Target**, v. 15, p. 475–86, 2007.

Feng, S. S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new concept chemotherapy. **Expert review of medical devices**, v. 1, p. 115-125, 2004.

Field, K. J.; Lang, C. M. Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature. **Laboratory Animals**, v. 22, p. 255-262, 1988.

Fitak, B.; Grabowski, M.; Suchocki, P. Preparat przeciwnowotworowy i sposób jego wytwarzania. Pol. PL 176530, 24 jun. 1999, 6p.

Gadjeva, M; Dodds, A. W.; Taniguchi-Sidle, A.; Willis, A. C.; Isenman, D. E.; Law, S. K. The covalent binding reaction of complement component C3. **J Immunol**, v. 161, p. 985-990, 1998.

Gales, D.; Clark, C.; Manne, U.; Samuel, T. The chemokine CXCL8 in carcinogenesis and drug response. **ISRN Oncology**, v. 2013, 8p, 2013.

Ganachaud, F.; Katz, J. L. Nanoparticles and nanocapsules created using the Ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. **ChemPhysChem**, v. 9, p. 209–216, 2005.

Gaowa, A.; Horibe, T.; Kohno, M; Sato, K.; Harada, H.; Hiraoka, M.; Tabata, Y.; Kawakami, K. Combination of hybrid peptide with biodegradable gelatin hydrogel for controlled release and enhancement of anti-tumor activity in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 176, p. 1–7, 2014.

Gentzler, R. D.; Patel, J. D. Maintenance treatment after induction therapy in non-small cell lung cancer: latest evidence and clinical implications. **Ther Adv Med Oncol**, v. 6, n. 1, p. 4–15, 2014.

Gerber, D. E.; Schiller, J. H. Maintenance chemotherapy for advanced non–small-cell lung cancer: new life for an old idea. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 8, p. 1009-1020. 2013.

Gessner, A.; Lieske, A.; Paulke, B.; Muller, R. Functional groups on polystyrene model nanoparticles: influence on protein adsorption. *J. Biomed. Mater. Res*, v. 65 p. 319–326, 2003.

Gessner, A.; Lieske, A.; Paulke, B.; Muller, R. Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 54, p. 165–170, 2002.

Ghadirian, P.; Maisonneuve, P.; Perret, C.; Kennedy, G.; Krewski, D.; Lacroix, A. A case-control study of toenail selenium and cancer of the breast, colon, and prostate. **Cancer Detect Prev**, v. 24, p. 305-313, 2000.

Ghiasi, N.; Habibagahi, M.; Rosli, R.; Ghaderi, A.; Yusoff, K.; Hosseini, A; Abdullah, S.; Jaberipour, M. Tumour suppressive effects of WEE1 gene silencing in breast cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 11, p. 6605-6611, 2013.

Goldstraw, P.; Crowley, J.; Chansky, K.; Giroux, D. J.; Groome, P. A.; Rami-Porta, R.; Postmus, P. E.; Rusch, V.; Sobin, L. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. **J Thorac Oncol.**, v. 2, p. 706–714, 2007.

Goto, H.; Inoko, A.; Inagaki, M. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. **Cell Mol Life Sci.**, v. 70, n. 20, p. 3893-3905, 2013.

Govindan, R.; Page, N.; Morgensztern, D.; Read, W.; Tierney, R.; Vlahiotis, A.; Spitznagel, E. L.; Piccirillo, J. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 28, 2006.

Grotto, H. Z. W.; Noronha, J. F. A. Platelet larger cell ratio (P-LCR) in patients with dyslipidemia. **Clin Lab Haematol**, v. 26, p. 347–349, 2004.

Guido, S.; Villone, M. Measurement of interfacial tension by drop retraction analysis. **J Colloid Interface Sci.**, v. 209, p. 247-250, 1999.

Hall, J. D.; Craven, R. R.; Fuller, J. R.; Pickles, R. J.; Kawula, T. H. *Francisella tularensis* replicates within alveolar type II epithelial cells *in vitro* and *in vivo* following inhalation. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 1034–1039, 2007.

Hassan, Z. K.; Elamin, M. H.; Omer, S. A.; Daghestani, M. H.; Al-Olayan, E. S.; Elobeid, M. A.; Virk, P. Oleuropein Induces Apoptosis Via the p53 Pathway in Breast Cancer Cells. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 11, p. 6739-6742, 2013.

Hatfield, D. L.; Gladyshev, V. N. How selenium has altered our understanding of the genetic code. **Mol. Cell Biol.**, v. 22, p. 3565-3576, 2002.

Herbst, R. S.; Heymach, J. V.; Lippman, S. M. Lung cancer. **N Engl J Med**, v. 359, n. 13, p. 1367–1380, 2008.

Hickey, M. J.; Kubes, P. Intravascular immunity: the host–pathogen encounter in blood vessels. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 364–375, 2009.

Hirsjärvi, S.; Dufort, S.; Gravier, J.; Texier, I.; Yan, Q.; Bibette, J., Sancey, L.; Josserand, V.; Passirani, C.; Benoit, J. P.; Coll, J. L. Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the *in vitro* reactivity and *in vivo* biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 3, p. 375-387, 2012.

Holmberg, L.; Sandin, F.; Bray, F.; Richards, M.; Spicer, J.; Lambe, M; Klint, A.; Peake, M.; Strand, T.; Linklater, K.; Robinson, D.; Moller, D. National comparisons of lung cancer survival in England, Norway and Sweden 2001-2004: differences occur early in follow-up. **Thorax**, v. 65, n. 5, p. 436-441, 2010.

Hsieh, W.; Huang, K.; Lin, H.; Chung, J. *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 974–983, 2006.

INCA. Instituto nacional do câncer. Ministério da Saúde, Estimativa 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 03 mar. 2014.

Ip, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. **J. Nutr.**, v. 128, p. 1845–1854, 1998.

Jang, S. H.; Wientjes, M. G.; Lu, D.; Au, J. L. S. Drug delivery and transport to solid tumors. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 1337-1350, 2003.

- Jassem, J. Maintenance chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 3, p. 217 - 218, 2012.
- Jastrzebski, Z.; Czyzewska-Szafran, H.; Remiszewska, M.; Fijalek, Z.; Fitak, B. A.; Suchocki, P. Pharmacokinetics of selol, a new agent containing selenium, in rats. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 23, n. 1, p. 7-11, 1997.
- Jastrzebski, Z.; Czyzewska-Szafran, H.; Remiszewska, M.; Fijalek, Z.; Fitak, B. A.; Suchocki, P. Effect of administration route on the dynamics of Selol absorption, distribution and elimination. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 6 p. 64-66, 1995.
- Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Thun, M. J. Cancer statistics, 2009. **CA Cancer J Clin**, v. 59, p. 225-249, 2009.
- Jiang, C.; Jiang, W.; Ip, C.; Ganther, H.; Lu, J. Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake. **Molecular Carcinogenesis**, v. 26, p. 213-225, 1999.
- Joanitti, G. A.; Azevedo, R. B.; Freitas, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman–Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer Letters**, v. 293, p. 73-81, 2010.
- Jones, S. W.; Roberts, R. A.; Robbins, G. R.; Perry, J. L.; Kai, M. P.; Chen, K.; Bo, T.; Napier, M. E.; Ting, J. P. Y.; DeSimone, J. M.; Bear, J. E. Nanoparticle clearance is governed by Th1/Th2 immunity and strain background. **J Clin Invest**, v. 123, n. 7, 3061–3073, 2013.
- Kamangar, F.; Dores, G. M.; Anderson, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across 5 continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **J Clin. Oncol.**, v. 24, p. 2137-2150, 2006.
- Kerr, K. M. Pulmonary preinvasive neoplasia. **J Clin Pathol**, v. 54, p. 257–271, 2001.
- Khoee, S.; Yaghoobian, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, n. 6, p. 2392-3299, 2008.
- Khuder, S. A.; Mutgi, A. B. Effect of smoking cessation on major histologic types of lung cancer. **Chest**, v. 120, p. 1577–1583, 2001.
- Kim, I.; Byeon, H. J.; Kim, T. H.; Lee, E. S.; Oh, K. T.; Shin, B. S.; Lee, K. C.; Youn, Y. S. Doxorubicin-loaded highly porous large PLGA microparticles as a sustained-release inhalation system for the treatment of metastatic lung cancer. **Biomaterials**, v. 33, p. 5574-83, 2012.
- Kim, S; Choi, I. Phagocytosis and Endocytosis of Silver Nanoparticles Induce Interleukin-8 Production in Human Macrophages. **Yonsei Med J**, v. 53, n. 3, p. 654-657, 2012.

Kohane, D. S.; Tse, J. Y.; Yeo, Y.; Padera, R.; Shubina, M.; Langer, R. Biodegradable polymeric microspheres and nanospheres for drug delivery in the peritoneum. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, p. 450, 2002.

Kreisel, D.; Gelman, A. E.; Higashikubo, R.; Lin, X.; Vikis, H. G.; White, J. M.; Toth, K. A.; Deshpande, C.; Carreno, B. M.; You, M.; Taffner, S. M.; Yokoyama, W. M.; Bui, J. D.; Schreiber, R. D.; Krupnick, A. S. Strain-specific variation in murine natural killer gene complex contributes to differences in immunosurveillance for urethane-induced lung cancer. **Cancer Res**, v. 72, n. 17, p. 4311-4317, 2012.

Ksiazek, I.; Sitarz, K.; Roslon, M.; Anuszevska, E.; Suchocki, P.; Wilczynska, D. J. The influence of selol on the expression of oxidative stress genes in normal and malignant prostate cells. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 10, p. 225-232, 2013.

Kunwar, A.; Mishra, B.; Barik, A.; Kumbhare, L.B.; Pandey, R.; Jain, V.K.; Priyadarsini, K.I. Diselenodipropionic acid, an efficient peroxy radical scavenger and a GPx mimic, protects erythrocytes (RBCs) from AAPH-induced hemolysis. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, p. 1482–1487, 2007.

Lamerton, L. F.; Steel, G. G. Cell population kinetics in normal and malignant tissues. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 18, p. 245–283, 1968.

Lapenna, S.; Giordano, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 7, p. 547-566, 2009.

Lee, G.; Matsushita, H. Genetic linkage between Poli deficiency and increased susceptibility to lung tumors in mice. **Japanese Cancer Association**, v. 96, p. 256–259, 2005.

Lee, K. S.; Lee, Y. S.; Lee, J. M.; Ito, K.; Cinghu, S.; Kim, J. H.; Jang, J. W.; Li, Y. H.; Goh, Y. M.; Chi, X. Z.; Wee, H.; Lee, H. W.; Hosoya, A.; Chung, J. H.; Jang, J. J.; Kundu, J. K.; Surh, Y. J.; Kim, W. J.; Ito, Y.; Jung, H. S.; Bae, S. C. Runx3 is required for the differentiation of lung epithelial cells and suppression of lung cancer. **Oncogene**, v. 29, p. 3349–3361, 2010.

Lee, S. H.; Jae-Eun, P.; Yu-Ri, K.; Hee, R. L.; Son, S. W.; Meyoung-Kon, K. Effects of zinc oxide nanoparticles on gene expression profile in human keratinocytes. **Mol Cell Toxicol**, v. 8, p.113-118, 2012.

Lepeltier, E.; Bourgaux, C.; Couvreur, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices, **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 2014.
doi.10.1016/j.addr.2013.12.009

Letavayová, L.; Vlasáková, D.; Vicková, V.; Brozmanová, J.; Miroslav, C. Rad52 has a role in the repair of sodium selenite-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, v. 652, p. 198–203, 2008.

- Letchford, K.; Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 65, p. 259–269, 2007.
- Li, H.; Feng, Z.; Wu, W.; Li, J.; Zhang, J.; Xia, T. SIRT3 regulates cell proliferation and apoptosis related to energy metabolism in non-small cell lung cancer cells through deacetylation of NMNAT2. **International Journal of Oncology**, v. 43, p. 1420-1430, 2013.
- Li, L.; Braiteh, F. S.; Kurzrock, R. Liposome-encapsulated curcumin in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. **Cancer**, v. 104, p. 1322–1331, 2005.
- Li, Y.; Lee, P. I. A new bioerodible system for sustained local drug delivery based on hydrolytically activated in situ macromolecular association. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 45–52, 2010.
- Li, Z.; Carrier, L.; Belame, A.; Thiyagarajah, A.; Salvo, V. A.; Burow, M. E.; Rowan, B. G. Combination of methylselenocysteine with tamoxifen inhibits MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice through elevated apoptosis and reduced angiogenesis. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 118, p. 33–43, 2009.
- Liu, L.; Ni, F.; Zhang, J.; Jiang, X.; Lu, X.; Guo, Z.; Xu, R. Silver nanocrystals sensitize magnetic-nanoparticle-mediated thermo-induced killing of cancer cells. **Acta Bioch Bioph Sinica**, v. 43, n. 4, p. 316-323, 2011.
- Liu, X.; Wang, J.; Sun, B.; Zhang, Y.; Zhu, J.; Li, C. Cell growth inhibition, G2M cell cycle arrest, and apoptosis induced by the novel compound Alternol in human gastric carcinoma cell line MGC803. **Invest New Drugs**, v. 25, p. 505–517, 2007.
- Liu, Y.; Jiao, F.; Qiu, Y.; Li, W.; Lao, F.; Zhou, G.; Sun, B.; Xing, G.; Dong, J.; Zhao, Y.; Chai, Z.; Chen, C. The effect of Gd@C82(OH)22 nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF- α mediated cellular immunity. **Biomaterials**, v. 30, p. 3934–3945, 2009.
- Liu, Y.; Huang, H.; Zeng, J.; Sun, C. Thyroid volume, goiter prevalence, and selenium levels in an iodine-sufficient area: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 13, n. 1, p. 1153, 2013.
- Macdonald, M. A; Watkin, K. L. Investigations into the physicochemical properties of dextran small particulate gadolinium oxide nanoparticles, **Acad. Radiol.**, v.13, p. 421-427, 2006.
- Maiers, D. T.; Wichlacz, P. L.; Thompson, D. L.; Bruhn, D. F. Selenate reduction by bacteria from a selenium-rich environmen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 1, 2591-2593, 1988.
- Malknson, A. M. Primary lung tumors in mice as an aid for understanding, preventing, and treating human adenocarcinoma of the lung. **Lung Cancer**, v. 32, n. 3, p. 265–279, 2001.

Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature reviews**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.

Mason, R. J.; Kalina, M.; Nielsen, L. D.; Malkinson, A. M.; Shannon, J. M. Matsumura, Y.; Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Research**, v. 46, p. 6387–6392, 1986.

Mazur, L.; Augustynek, A.; Halicka, H. D.; Deptała, A. Induction of apoptosis in bone marrow cells after treatment of mice with WR-2721 and gamma-rays: relationship to the cell cycle. **Cell Biol Toxicol.**, v. 19, n. 1, p. 13-27, 2003.

McClements, D. J.; Decker, E. A.; Weiss, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, 2007.

Menon, V. R.; Peterson, E. J.; Valerie, K.; Farrell, N. P.; Povirk, L. F. Ligand modulation of a dinuclear platinum compound leads to mechanistic differences in cell cycle progression and arrest. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 12, p. 1708–1720, 2013.

Minowada, G.; Miller, Y. E. Overexpression of Sprouty 2 in Mouse Lung Epithelium Inhibits Urethane-Induced Tumorigenesis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 40, p. 31–37, 2009.

Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 2, p. 283-318, 2001.

Morachis, J. M.; Mahmoud, E. A.; Almutairi, A. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. **Pharmacological Reviews**, v. 64, p. 505-519, 2012.

Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

Muehlmann, L.; Joanitti, G.; Silva, J.; Longo, J.; Azevedo, R. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, p. 729-737, 2011.

Murray, A. R.; Kisin, E.; Inman, A.; Young, S. H.; Muhammed, M.; Burks, T.; Uheida, A.; Tkach, A.; Waltz, M.; Castranova, V.; Fadeel, B.; Kagan, V. E.; Riviere, J. E.; Monteiro-Riviere, N.; Shvedova, A. A. Oxidative stress and dermal toxicity of iron oxide nanoparticles in vitro. **Cell Biochem Biophys.**, v. 67, n. 2, 461-476, 2013.

Mujtaba, S. F.; Dwivedi, A.; Mudiam, M. K.; Ali, D.; Yadav, N.; Ray, R. S. Production of ROS by photosensitized anthracene under sunlight and UV-R at ambient environmental intensities. **Photochem Photobiol.**, v. 87, n. 5, p. 1067-1076, 2011.

Nikitin, A. Y.; Alcaraz, A.; Anver, M. R.; Bronson, R. T.; Cardiff, R. D.; Dixon, D.; Fraire, A. E.; Gabrielson, E. W.; Gunning, W. T.; Haines, D. C.; Kaufman, M. H.; Linnoila, R. I.; Maronpot, R. R.; Rabson, A. S.; Reddick, R. L.; Rehm, S.; Rozengurt, N.; Schuller, H. M.; Schmidt, E. N.; Travis, W. D.; Ward, J. M.; Jacks, T. Classification of proliferative pulmonary lesions of the mouse: recommendations of the mouse models of human cancers consortium. **Cancer Res**, v. 64, p. 2307-2316, 2004.

Nomori, H.; Morinaga, S.; Kobayashi, R.; Torikata, C. Protein 1 and Clara cell 10-kDa protein distribution in normal and neoplastic tissues with emphasis on the respiratory system. **Virchows Arch.**, v. 424, n. 5, p. 517-523, 1994.

Patil, Y.; Panyam, J. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. **Int J Pharm**, v. 367, p. 195-203, 2009.

Paulovich, A. G.; Toczyski, D. P.; Hartwell, L. H. When checkpoints fail. **Cell**, v. 88, n. 3, 315-321, 1997.

Paz-Ares, L.; Marinis, F.; Dediu, M.; Thomas, M.; Pujol, J. L.; Bidoli, P.; Molinier, O.; Sahoo, T. P.; Laack, E.; Reck, M.; Corral, J.; Melemed, S.; John, W.; Chouaki, N.; Zimmermann, A. H.; Visseren-Grul, C.; Gridelli, C. Maintenance therapy with pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care after induction therapy with pemetrexed plus cisplatin for advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (PARAMOUNT): a double-blind, phase 3, randomised controlled trial. **The Lancet Oncology**, v. 13, p. 247-255, 2012.

Pereira, L. O.; Longo, J. P. F.; Azevedo, R. B. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p. 1079-1085, 2012.

Petković, J.; Žegura, B.; Filipič, M. Influence of TiO₂ nanoparticles on cellular antioxidant defense and its involvement in genotoxicity in HepG2 cells. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 304, 2011.

Pfister, D. G.; Johnson, D. H.; Azzoli, C. G.; Sause, W.; Smith, T. J.; Baker, S. J.; Olak, J.; Stover, D.; Strawn, J. R.; Turrisi, A. T.; Somerfield, M. R. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, p. 330-353, 2004.

Podila, R.; Vedantam, P.; Ke, P. C.; Brown, J. M.; Rao, A. M. Evidences for charge transfer-induced conformational changes in carbon nanostructure-protein corona. **J. Phys. Chem. C Nano-mater Interfaces**, v. 116, p. 22098-22103, 2012.

Poerschke, R. L.; Franklin, M. R.; Moos, P. J. Modulation of redox status in human lung cell lines by organoselenocompounds: Selenazolidines, selenomethionine, and methylseleninic acid. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1761-1767, 2008.

Potapova, T. A.; Daum, J. R.; Byrd, K. S.; Gorbsky, G. J. Fine Tuning the Cell Cycle: Activation of the Cdk1 Inhibitory Phosphorylation Pathway during Mitotic Exit. **Mol Biol Cell**, v. 20, p. 1737–1748, 2009.

Prakash, G.; Hosetti, B. B. Bio-efficacy of *Dioscorea pentaphylla* from Midmid-Western Ghats, India. **Toxicol Int.**,v. 19, n. 2, 100–105, 2012.

Qi, Y.; Fu, X.; Xiong, Z.; Zhang, H.; Hill, S. M.; Rowan, B. G.; Dong, Y. Methylseleninic acid enhances paclitaxel efficacy for the treatment of triple-negative breast cancer. **PloS ONE**, v. 7, p. e31539, 2012.

Qin J and Li L. Molecular anatomy of the DNA damage and replication checkpoints. **Radiat Res.**, v. 159, p. 139–148, 2003.

Qin, S.; Gao, J.; Huang, K. Effects of different selenium sources on tissue selenium concentrations, blood GSH-Px activities and plasma interleukin levels in finishing lambs. **Biological Trace Element Research**, v. 116, n. 1, p. 91-102, 2007.

Quintanar, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification–diffusion technique. **Pharm. Res.**, v. 15, p. 1056–1062, 1998.

Rahden-Staron, I.; Suchocki, P.; Czeczot, H. Evaluation of mutagenic activity of the organo-selenium compound Selol by use of the Salmonella typhimurium mutagenicity assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 699, n. 1-2, p. 44-46, 2010.

Ramakrishna, G.; Harms, G. F.; Erlichman, C. Metastatic Non-Small Cell Lung Carcinoma with involvement of extremity musculature: case report and review of the literature. **Mayo Clin Proc**, v. 75, p. 1333-1337, 2000.

Ramalingam, S.; Belani, C. Systemic Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Recent Advances and Future Directions. **The oncologist**, v. 13, 2008.

Reddy, S. T.; Vlies, A. J. V. D.; Simeoni, E.; Angeli, V.; Randolph, G. J.; O'Neil, C. P.; Lee, L. K.; Swartz, M. A.; Hubbell, J. A. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticles vaccines. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, p. 1159–1164, 2007.

Reymão, M. S. F.; Cury, P. M.; Lichtenfels, A. J. F. C.; Lemos, M.; Battlehner, C. N.; Conceição, G. M. S.; Capelozzi, V. L.; Montes, G. S.; Júnior, M. F.; Martins, M. A.; Bohm, G. M.; Saldiva, P. H. N. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. **Environmental Research**, v. 74, p. 150–158, 1997.

Ricklin, D.; Hajishengallis, G.; Yang, K.; Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat. Immunol.**, v. 11, p.785–797, 2010.

Rikiishi, H. Apoptotic cellular events for selenium compounds involved in cancer prevention. **J Bioenerg Biomembr**, v. 39, p. 91–98, 2007.

- Riley, J. S.; Hutchinson, R.; McArt, D. G.; Crawford, N; Holohan, C; Paul, I; Schaeysbroeck, S. V.; Salto-Tellez, M; Johnston, P. G.; Fennell, D. A.; Gately, K.; O'Byrne, K.; Cummins, R; Kay, E; Hamilton, P; Stasik, I.; Longley, D. B. Prognostic and therapeutic relevance of FLIP and procaspase-8 overexpression in non-small cell lung cancer. **Cell Death and Disease**, 2013. doi:10.1038/cddis.2013.481
- Robertson, K. L.; Mostaghim, A.; Cuomo, C. A.; Soto, C. M.; Lebedev, N.; Bailey, R. F.; Wang, Z. Adaptation of the black yeast *Wangiella dermatitidis* to ionizing radiation: molecular and cellular mechanisms. **PLoS ONE**, p. 7, n. 11, p. e48674, 2012.
- Roos, A.; Bouwman, L. H.; Gijlswijk-Janssen, D. J.; Faber-Krol, M. C.; Stahl, G. L.; Daha, M. R. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. **J. Immunol.**, v. 167, p. 2861–2868, 2001.
- Sangha, R.; Price, J.; Butts, C. A. Adjuvant therapy in non-small cell lung cancer: Current and future directions. **Oncologist**, v. 15, n. 8, p. 862-872, 2010.
- Saptarshi, S. R.; Duschl, A.; Lopata, A. L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. **Journal of Nanobiotechnology**, v.11, n. 26, 2013.
- Sanmartín, C.; Plano, D.; Font, M.; Palop, J. A. Kinase regulation by sulfur and selenium containing compounds. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 4, p. 496-523, 2011.
- Sarveswaran, S.; Liroff, J.; Zhou, Z.; Nikitin, A. Y.; Ghosh, J. Selenite triggers rapid transcriptional activation of p53, and p53-mediated apoptosis in prostate cancer cells: Implication for the treatment of early-stage prostate cancer. **International Journal of Oncology**, v. 36, p. 1419-1428, 2010.
- Satoh, H; Moriguchi, T.; Takai, J.; Ebina, M.; Yamamoto, M. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 73, n. 13, p. 4158-4168, 2013.
- Schadendorf, D.; Moller, A.; Algermissen, B.; Worm, M.; Sticherling, M.; Czarnetzki, B. M. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 5, p. 2667–2675, 1993.
- Schaeue, D.; Kachikwu, E. L.; McBride, W. H. Cytokines in Radiobiological Responses: A Review. **Radiat Res.**, v. 178, n. 6, p. 505–523, 2012.
- Scheff, R. J.; Schneider, B. J. Non-Small-Cell Lung Cancer: Treatment of Late Stage Disease: Chemotherapeutics and New Frontiers. **Semin Intervent Radiol.**, v. 30, n. 2, p. 191-198, 2013.
- Seise M.; Alhonnoro, T.; Kolesnik, M. Interactive registration of 2D histology and 3D CT data for assessment of radiofrequency ablation treatment. **J Pathol Inform**, v. 2, n. 9, 2011.

Shapiro, G. I. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, n. 11; p. 1770–1783, 2006.

Shim, H. S.; Lee, D. H., Park, E. J., Kim, S. H. Histopathologic characteristics of lung adenocarcinomas with epidermal growth factor receptor mutations in the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Lung Adenocarcinoma Classification. **Arch Pathol Lab Med**, v. 135, n. 10, p. 1329–1334, 2011.

Shimkin, M. B. Changing Concepts Concerning Cancer. **Public Health Rep.**, v. 76, n. 10, 1961.

Shimkin, M. B.; Polissar, M. J. Some quantitative observations on the induction and growth of primary pulmonary tumors in strain A mice receiving urethan. **J Natl Cancer Inst**, v. 16, p. 75–97, 1955.

Shinomiya, N.; Kuno, Y.; Yamamoto, F.; Fukasawa, M.; Okumura, A.; Uefuji, M.; Rokutanda, M. Different mechanisms between premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis in X-irradiated U937 cells. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 47, p. 767-77, 2000.

Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2013. **Ca Cancer J Clin**, v. 63, p. 11–30, 2013.

Silvestri, G. A; Spiro, S. G. Carcinoma of the bronchus 60 years later. **Thorax**, v. 61, n. 12, p. 1023-1028, 2006.

Simón-Vázquez, R.; Lozano-Fernández, T.; Peleteiro-Olmedo, M.; González-Fernández, A. Conformational changes in human plasma proteins induced by metaloxide nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 198– 206, 2014.

Sinha, K.; Pal, B. P.; Sil, P. C. Cadmium (Cd²⁺) exposure differentially elicits both cell proliferation and cell death related responses in SK-RC-45. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 3, p. 307–318, 2014.

Spallholz, J. E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. **Free Radic Biol Med**, v. 17, p. 45–64, 1994.

Stathopoulos, G. T.; Sherrill, T. P.; Cheng, D.; Scoggins, R. M.; Han, W.; Polosukhin, V. V.; Connelly, L.; Yull, F. E.; Fingleton, B.; Blackwell, T. S. Epithelial NF-kappaB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 47, p. 18514-18519, 2007.

Stearman, R. S.; Dwyer-Nield, L.; Zerbe, L.; Blaine, S. A.; Chan, Z.; Bunn, P. A.; Johnson, G. L.; Hirsch, F. R.; Merrick, D. T.; Franklin, W. A.; Baron, A. E.; Keith, R. L.; Nemenoff, R. A.; Malkinson, A. M.; Geraci, M. W. Analysis of Orthologous Gene Expression between Human Pulmonary Adenocarcinoma and a Carcinogen-Induced Murine Model. **American Journal of Pathology**, v. 167, n. 6, p. 1763-1775, 2005.

Stewart, Z. A.; Westfall, M. D.; Pietenpol, J. A. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 3, p. 139-145, 2003.

Subia, B.; Chandra, S.; Talukdara, S.; Kundu, S. C. Folate conjugated silk fibroin nanocarriers for targeted drug delivery. **Integrative Biology**, 2013.

Suchocki, P.; Jakoniuk, D.; Fitak, B. A. Specific spectrophotometric method with trifluoroacetic acid for the determination of selenium(IV) in selenitetriglycerides. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 4-5, p. 1029-1036, 2003.

Suchocki, P.; Misiewicz-Krzeminska, I.; Skupinska, K.; Niedzwiecka, K.; Lubelska, K.; Fijaek, Z.; Kasprzycka-Guttman, T. **Pharmacological Reports**, v. 62, p. 352-361, 2010.

Suchocki, P.; Misiewicz-Krzemińska, I.; Skupinska, K.; Waclawek, K.; Fijalek, Z.; Kasprzycka-Guttman, T. The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. **Oncology reports**, v. 18, p. 893-899, 2007.

Suzuki, K. T. Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. **J. Health Sci.**, v. 51, p. 107–114, 2005.

Suzuki, M.; Endo, M.; Shinohara, F.; Echigo, S.; Rikiishi, H. Differential apoptotic response of human cancer cells to organoselenium compounds. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 66, p. 475–484, 2010.

Swede, H.; Dong, Y.; Reid, M.; Marshall, J.; Ip, C. Cell cycle arrest biomarkers in human lung cancer cells after treatment with selenium in culture. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 12, p. 1248-1252, 2003.

Szebeni, J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug induced acute immune toxicity. **Toxicology**, v. 216, p. 106–121, 2005.

Tamayo, I.; Irache, J. M.; Mansilla, C.; Ochoa-Repáraz, J.; Lasarte, J. J.; Gamazo, C. Poly(anhydride) nanoparticles act as active Th1 adjuvants through Toll-like receptor exploitation. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 9, p. 1356, 2010.

Tan, S.; Li, X.; Guob, Y.; Zhang, Z. Lipid-enveloped hybrid nanoparticles for drug delivery. **Nanoscale**, v. 5, p. 860-872, 2013.

Tan, Y.; Li, S.; Pitt, B. R.; Huang, L. The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. **Hum. Gene Ther.**, v. 10, p. 2153–2161, 1999.

Tang, X.; Varella-Garcia, M.; Xavier, A. C.; Massarelli, E.; Ozburn, N.; Moran, C.; Wistuba, I. I. Epidermal growth factor receptor abnormalities in the pathogenesis and progression of lung adenocarcinomas. **Cancer Prev Research (Phila Pa)**, v. 1, p. 192–200, 2008.

Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomed Pharmacother**, v. 57, p. 134–144, 2003.

Temmermans, F.; Jansen, B.; Willekens, I.; Castele, E. V.; Deklerck, R.; Schelkens, P.; Meyd, J. Classification of microcalcifications using Micro-CT, **Proc. of SPIE**, v. 8856, 2013.

Teufelhofer, O.; Weiss, R.; Parzefall, W.; Schulte-Hermann, R.; Micksche, M.; Berger, W.; Elbling, L. Promyelocytic HL60 cells express NADPH oxidase and are excellent targets in a rapid spectrophotometric microplate assay for extracellular superoxide. **Toxicological Sciences**, v. 76, p. 376–383, 2003.

Thaete, L. G.; Gunning, W. T.; Stoner, G. D.; Malkinson, A. M. Cellular derivation of lung tumors in sensitive and resistant strains of mice: results at 28 and 56 weeks after urethan treatment. **J Natl Cancer Inst.**, v. 78, n. 4, p. 743-749, 1987.

Thanou, M.; Duncan, R. Polymer-protein and polymer-drug conjugates in cancer therapy. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 4, p. 701–709, 2003.

Theron, T.; Binder, A.; Verheye-Dua, F.; Böhm, L. The role of G2-block abrogation, DNA doublestrand break repair and apoptosis in the radiosensitization of melanoma and squamous cell carcinoma cell lines by pentoxifylline. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 76, n. 9, p. 1197–1208, 2000.

Thornton, T. M.; Rincon, M. Non-classical P38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 5, n. 1, p. 44-54, 2009.

Tian, J.; Doi, H.; Saar, M.; Santos, J.; Li, X.; Peehl, D. M.; Knox, S. J. Radioprotection and Cell Cycle Arrest of Intestinal Epithelial Cells by Darinaparsin, a Tumor Radiosensitizer. **Int J Radiation Oncol Biol Phys**, v. 87, n. 5, p. 1179-1185, 2013.

Tordello, E. D.; Vacca, I.; Ram, S.; Rappuola, R.; Serruto, D. Neisseria meningitidis NalP cleaves human complement C3, facilitating degradation of C3b and survival in human serum. **PNAS**, v. 111, n. 1, p. 427-432, 2013.

Travlos, G. S. Histopathology of bone marrow. **Toxicologic Pathology**, v. 34, p. 566–598, 2006.

Umezawa, K.; Ariga, A.; Matsumoto, N. Naturally occurring and synthetic inhibitors of NF-kappaB functions. **Anticancer Drug Des**, p. 15, n. 4, p. 239-244, 2000.

Valerii, M. C.; Benaglia, M.; Caggiano, C.; Papi, A.; Strillacci, A.; Lazzarini, G.; Campieri, M.; Gionchetti, P. Rizzello, F.; Spisni, E. Drug delivery by polymeric micelles: an in vitro and in vivo study to deliver lipophilic substances to colonocytes and selectively target inflamed colon. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 5, p. 675-685, 2012.

Vitale, S. A.; Katz, J. L. Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid–liquid nucleation: “the Ouzo effect”. **Langmuir**, v. 19, p. 4105–4110, 2003.

Vogl, T. J.; Shafinaderi, M.; Zangos, S.; Lindemayr, S.; Vatankhah, K. Regional Chemotherapy of the Lung: Transpulmonary Chemoembolization in Malignant Lung Tumors. **Semin Intervent Radiol.**, v. 30, n. 2, p. 176-184, 2013.

Vogler, M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 67–74, 2012.

Vroman, L.; Adams, A. L.; Fischer, G. C.; Munoz, P. C. Interaction of high molecular-weight kininogen, factor-Xii, and fibrinogen in plasma at interfaces. **Blood**, v. 55, p. 156–159, 1980.

Wakelee, H.; Belani, C. P. Optimizing first-line treatment options for patients with advanced NSCLC. **The Oncologist**, v. 10, p. 1-10, 2005.

Wang, B.; Dai, Z.; Wang, Z.; Bai, M.; Lin, S.; Ma, H.; Wang, Y.; Song, L.; Ma, X.; Zan, Y.; Min, W.; Cheng, Y. Saikosaponin-D increases the radiosensitivity of SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cells by adjusting the G0/G1 and G2/M checkpoints of the cell cycle. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 263, 2013.

Wang, G. F.; Lai, M. D.; Yang, R. R.; Chen, P. H.; Su, Y. Y.; Lv, B. J.; Sun, L. P.; Huang, Q.; Chen, S. Z. H. Histological types and significance of bronchial epithelial dysplasia. **Modern Pathology**, v. 19, p. 429–437, 2006.

Wang, L.; Yang, Z.; Fu, J.; Yin, H.; Xiong, K.; Tan, Q.; Jin, H.; Li, J.; Wang, T.; Tang, W.; Yin, J.; Cai, G.; Liu, M.; Kehr, S.; Becker, K.; Zeng, H. Ethaselen: A potent mammalian thioredoxin reductase 1 inhibitor and novel organoselenium anticancer agent. **Free Rad Biol Med**, v. 52, p. 898-908, 2012.

Wang, X.; Yang, L.; Chen, Z. G.; Shin, D. M. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. **CA Cancer J Clin**, v. 58, p. 97-110, 2008a.

Wang, Y. Y.; Lai, S. K.; Suk, J. S.; Pace, A.; Cone, R.; Hanes, J. Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that "slip" through the human mucus barrier. **Angew Chem. Int. Ed. Engl**, v. 47, n. 50, p. 9726–9729, 2008b.

Westra, W. H.; Baas, I.O.; Hruban, R. H.; Askin, F. B.; Wilson, K.; Offerhaus, G. J. A.; Slebos, R. J. C. K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung. **Cancer Research**, v. 56, p. 2224–2228, 1996.

Wilczynska, J. D.; Ksiazek, I.; Nowak, K.; Suchocki, P.; Flis, S.; Kiljan, M.; Anuszevska, E. Study of the effect of Selol and sodium selenite on HeLa cells in vitro. **CHEMIK**, v. 65, p. 110-114, 2011.

World Health Organization – WHO. Media center/Cancer. United Nation System: WHO, 2011.

Wu, H.; Zhu, H.; Li, X.; Liu, Z.; Zheng, W.; Chen, T.; Yu, B.; Wong, K. Induction of Apoptosis and cell cycle arrest in A549 human lung adenocarcinoma cells by surface-capping selenium nanoparticles: an effect enhanced by polysaccharide–protein

- complexes from *Polyporus rhinoceros*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 9859–9866, 2013.
- Xing, J. Z.; Zhu, L.; Gabos, S.; Xie, L. Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. **Toxicol. in Vitro**, v. 20, p. 995-1004, 2006.
- Xing, J. Z.; Zhu, L.; Jackson, J. A.; Gabos, S.; Sun, X. J.; Wang, X. B.; Xu, X. Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 18 p. 154-161, 2005.
- Yakut, T.; Schulten, H.; Demir, A.; Frank, D.; Danner, B.; Egeli, U.; Gebitekin, C.; Kahler, E.; Gunawan, B.; Urer, N.; Ozturk, H; Fuzesi, L. Assessment of molecular events in squamous and non-squamous cell lung carcinoma. **Lung Cancer**, v. 54, p. 293-301, 2006.
- Yang, E.; Choi, I. Immunostimulatory effects of silica nanoparticles in human monocytes. **Immune Network**, v.13, n. 3, p. 94-101, 2013.
- Yang, Y.; Fang, H.; Yun, R.; Lu, X.; Ying, W.; Zhushi, L.; Pan, H.; Xu, C. The Anticancer effects of sodium selenite and selenomethionine on human colorectal carcinoma cell lines in nude mice. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2009.
- Yao, S. L.; Akhtar, A. J.; McKenna, K. A.; Bedi, G. C.; Sidransky, D.; Mabry, M.; Ravi, R.; Collector, M. I.; Jones, R. J.; Sharkis, S. J.; Fuchs, E. J.; Bedi, A. Selective radiosensitization of p53-deficient cells by caffeine-mediated activation of p34cdc2 kinase. **Nat. Med**, v. 2, p. 1140–1143, 1996.
- Yoncheva, K.; Lizarraga, E.; Irache, J. M. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 411–419, 2005.
- Yoon, S. O.; Kim, M. M.; Chung, A. S. Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 20085–20092, 2001.
- Yuan, X.; Li, T.; Xiao, E.; Zhao, H.; Li, Y.; Fu, S.; Gand, L.; Wang, Z.; Zheng, Q.; Wang, Z. Licochalcone B inhibits growth of bladder cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. **Food Chem. Toxicol.**, v. 65, p. 242-251, 2014.
- Zagrodzki P.; Bik, D.; Fitak, B. A.; Suchocki, P.; Niemczuk, K. Selenoenzymes in animal tissues after supplementation with SELOL. **Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy**, v. 44, p. 215-220, 2000.
- Zaynagetdinov, R.; Sherrill, T. P.; Polosukhin, V. V.; Han, W.; Ausborn, J. A.; McLoed, A. G.; McMahan, F. B.; Gleaves, L. A.; Degryse, A. L.; Stathopoulos, G. T.; Yull, F. E.; Blackwell, T. S. A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis. **J Immunol.**, v. 187, n. 11, p.5703-5711, 2011.

Zelko, I. N.; Mariani, T. J.; Folz, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 33, n. 3, p. 337-49, 2002.

Zerbe, L. K.; Dwyer-Nield, L. D.; Fritz, J. M.; Redente, E. F.; Shroyer, R. J.; Conklin, E.; Kane, S.; Tucker, C.; Eckhardt, S. G.; Gustafson, D. L.; Iwata, K. K.; Malkinson, A. M. Inhibition by erlotinib of primary lung adenocarcinoma at an early stage in male mice. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 62, n. 4, p. 605-620, 2008.

Zhang, H.; Zhao, C.; Cao, H.; Wang, G.; Song, L.; Niu, G.; Yang, H.; Ma, J.; Zhu, S. Hyperbranched poly (amine-ester) based hydrogels for controlled multi-drug release in combination chemotherapy. **Biomaterials**, v. 31, p. 5445-5454, 2010.

Zhang, J. B.; Wang, H.; Yan, X.; Zhang, L. Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. **Life Sciences & Medicine**, v. 76, p. 1099-1109, 2005.

Zhang, J.; Wang, X.; Xu, T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with Se-methylselenocysteine in mice. **Toxicol Sci**, v. 101, n. 1, p. 22-31, 2008.

Zhang, W.; McQuitty, E. B.; Olsen, R.; Fan, H.; Hendrickson, H.; Tio, F. O.; Newton, K.; Cagle, K.; Jagirdar, J. EGFR Mutations in US hispanic versus non-hispanic white patients with lung adenocarcinoma. **Arch Pathol Lab Med.**, 2013. doi: 10.5858/arpa.2013-0311-OA

Zhao G, Zhu Y, Eno CO, Liu Y, Deleeuw L, Burlison JA, Chaires JB, Trent JO, Li C. Activating the Pro-apoptotic Bcl-2 Protein Bax by a Small Molecule Induces Tumor Cell Apoptosis. **Mol Cell Biol.**, 2014.

Zhao, R.; Xiang, N.; Domann, F. E.; Zhong, W. Expression of p53 enhances selenite-induced superoxide production and apoptosis in human prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 4, p. 2296-304, 2006.

Zhong, W.; Oberley, T. D. Redox-mediated effects of selenium on apoptosis and cell cycle in the LNCaP human prostate cancer cell line. **Cancer Res**, v. 61, p. 7071-7078, 2001.

10. ANEXOS

10.1 Parecer do comitê de ética animal


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

Brasília, 07 de novembro de 2011.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “EFEITO ANTINEOPLÁSICO DE NANOPARTÍCULAS DE PVM/MA CONTENDO SELOL OU CLORETO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA”, UnBDOC n.º 63966/2011, sob responsabilidade da Profa. Sônia Nair Bão, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Aline Pic-Taylor
Coordenadora do CEUA

10.2 Parecer do comité de ética em investigación clínica



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral

Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia
Edificio Administrativo de San Lázaro
15781 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tlf: 881 546425 Fax: 881 541804
ceic@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALICIA

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 11/07/2013 el estudio:

Título: Estudio de la interacción de nanomateriales con antígenos: una aproximación sistemática para el desarrollo de nanovacunas

Promotor: África González Fernández

Código de Registro CEIC de Galicia: 2013/272

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, y la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del CEIC de Galicia

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio en los centros y con los investigadores siguientes

Centros	Investigadores Principal
Universidade de Vigo	África González Fernández

En Santiago de Compostela, a 16 de julio de 2013

La Secretaria



Paula M. López Vázquez