

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ALINE LIRA XAVIER

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CÉRIO ASSOCIADAS AO
ÓXIDO DE ZINCO

JOÃO PESSOA - PB

2015

ALINE LIRA XAVIER

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CÉRIO ASSOCIADAS AO
ÓXIDO DE ZINCO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

COORIENTADORA:

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

João Pessoa - PB

2015

X3a Xavier, Aline Lira.
Avaliação da toxicidade e atividade antitumoral de nanopartículas de óxido de cério associados ao óxido de zinco/
Aline Lira Xavier.-- João Pessoa, 2015.
149f. : il.
Orientadora: Marianna Vieira Sobral
Coorientadora: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Óxido de zinco. 3. Óxido de cério.
4. Nanopartículas. 5. Toxicidade. 6. Atividade antitumoral.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

ALINE LIRA XAVIER

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CÉRIO ASSOCIADAS AO
ÓXIDO DE ZINCO**

APROVADA EM ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
Orientadora – UFPB**

**Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Coorientadora – UFPB**

**Profa. Dra. Leônia Maria Batista
Examinador interno – UFPB**

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Examinador interno – UFPB**

**Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
Examinador externo – UFPB**

**Profa. Dra. Temilce Simões de Assis
Examinador externo – UFPB**

À minha mãe Josefa Matias Lira Xavier, que sempre
entendeu as minhas muitas ausências.
Conscientemente, sacrifiquei por este trabalho
acadêmico o tempo que poderia ter dedicado a você.
Tenho a esperança que ele renda bons frutos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, a quem devo tudo que sou e tudo que tenho.

Aos meus pais **Vanildo da Silva Xavier** (*in memoriam*) e **Josefa Matias Lira Xavier**, por todo o amor, dedicação, ensinamentos, conselhos e incentivos por toda a minha vida, se tive a oportunidade de estudar e chegar até aqui, foi graças a vocês.

Ao meu irmão **Wagner Xavier**, pela amizade, apoio e torcida nessa caminhada.

Ao meu namorado **Bruno Ataíde**, pelo amor, apoio, incentivos e compreensão sempre.

A Profa. Dra. **Marianna Vieira Sobral**, pela orientação e principalmente pelo exemplo de pessoa e professora. Sua responsabilidade, inteligência, simpatia e dedicação ao que faz, a torna uma pessoa única pela qual tenho imensa admiração.

A Profa. Dra. **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz** que em 2004 me deu a oportunidade de iniciar minhas atividades na área da pesquisa científica, fazendo parte da minha vida acadêmica desde então.

A Universidade Federal da Paraíba, instituição maior, pelo desenvolvimento na minha carreira profissional.

Ao Dr. **Carlos Christiano Lima dos Santos** e Prof. Dr. **Dawy Keyson de Araújo Almeida**, pela colaboração no fornecimento da amostra em estudo.

Aos amigos e alunos de pós-graduação do Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR), **Monalisa Brito, Tatianne Mota, Tatyanna Kelvia, Déborah Pessoa, Viviane Medeiros, Ana Paula Moura, Daiene Lunguinho, Heloísa Fernandes e Thaísa Leite**, pela ajuda, incentivo e torcida durante toda essa caminhada, e, em especial, a **João Carlos Pita** pelos nove anos de amizade e incontáveis parcerias na pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica, **Renata Abrantes, Jamilly Oliveira, Ryldene Marques, Fernando Neto, Bruna da Silva e Rebeca Valença** pela enorme ajuda em todos os momentos.

A Profa. Dra. **Maria Salete Trigueiro de Araújo** e ao Prof. Dr. **Alexandre Rolim** pela valiosa colaboração na realização dos estudos histopatológicos.

Ao Prof. Dr. **Robson Veras** pela ajuda na citometria de fluxo.

Ao doutorando **Fagner Leite** pela colaboração nos estudos imunológicos.

Ao técnico **Jean Aguiar** pela disposição, paciência e boa vontade para sempre nos ajudar, quando preciso, nas análises hematológicas e bioquímicas.

Aos professores doutores **Leônia Batista, Liana Clébia, Fábio Sampaio, Isac Medeiros, Temilce de Assis e Hemerson Magalhães** pela gentileza de participar da avaliação desse trabalho.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Prof. Dr. **Josean Fechine**, pela atenção concedida sempre que necessário.

A todos os professores ministrantes das disciplinas do doutorado, pelos ensinamentos científicos.

A todos os amigos do doutorado, turma 2011, pelo companheirismo e incentivo.

As secretárias da pós-graduação, **Caroline Medeiros Mangueira e Dayana Brandão** pelos serviços prestados.

A todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em especial **Crispim Duarte**, pelo apoio e prestatividade em todos os assuntos relacionados com experimentação animal.

Aos amigos farmacêuticos da Maternidade Frei Damião, **Penha Jales, Renata Leite, Cicilia Florêncio, João Paulo Guedes, Edison Vieira, Verônica Barros e Marlete Nóbrega** e do Instituto Cândida Vargas, **Renata Moura, Ritta Vilar, Lucimara Andrade, Rosa Viana, Alessandra Estevam, Mara Vasconcelos,**

Marília Paranhos, Michelle Pedrosa, Lilia Gomes e Marli Viana pelo apoio e compreensão em todas as trocas de plantões, e ajustes de escala de trabalho contribuindo dessa forma para a realização desse trabalho.

E a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção desse trabalho.

Muito obrigada!

“A beleza não está na partida nem na chegada, mas na travessia.”

Guimarães Rosa

RESUMO

A nanomedicina consiste na utilização de nanomateriais no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas e de diagnóstico. Todavia, apesar das vantagens e diferentes aplicações das nanopartículas, estas também possuem potenciais efeitos tóxicos que devem ser devidamente avaliados antes de sua utilização. Óxidos de metais e, em especial, nanopartículas de óxido de metais possuem várias aplicações. Dentre eles o óxido de zinco e nanopartículas de óxido de cério já demonstraram diversas atividades farmacológicas tanto de forma isolada, quanto em associação entre si. Especialmente para nanopartículas de óxido de cério, vários estudos mostram seu potencial antitumoral. O câncer é uma doença genética complexa que constitui um importante problema de saúde pública em todo mundo, sendo uma das principais causas de morte no Brasil. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade e atividade antitumoral *in vivo* de nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco (NCZ). Inicialmente foi avaliada a toxicidade pré-clínica aguda, por via oral, com estimativa de DL50 para NCZ acima de 2000 mg/kg sendo, portanto, a amostra considerada de baixa toxicidade nas condições experimentais avaliadas. Em seguida foi realizada a avaliação da toxicidade pré-clínica de doses repetidas (28 dias) de NCZ, por via oral. O tratamento resultou em diminuição significativa no consumo de água e ração, ureia, índice do timo e tempo de auto-limpeza e levantamentos, assim como resultou em um aumento significativo na atividade enzimática de ALT e AST, contagem total de leucócitos e ambulação. No estudo de toxicidade aguda por via intraperitoneal de NCZ a DL50 foi estimada em torno de 300 mg/kg possibilitando a escolha das doses a serem utilizadas no estudo de atividade antitumoral. NCZ apresentou significativa atividade antitumoral em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE) nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, considerando os parâmetros massa e volume tumoral, bem como total celular. Na investigação de seu mecanismo de ação foi observado que NCZ aumentou a porcentagem de células na fase sub-G1, reduziu a microdensidade vascular peritoneal, bem como aumentou a concentração de IL-1, IL-10, TNF- α e IFN- γ . Foi avaliada ainda, a toxicidade de NCZ nos animais com CAE submetidos ao tratamento antitumoral de nove dias, sendo observada uma diminuição significativa no consumo de ração e na concentração sérica de ureia, assim como resultou em aumento significativo na atividade da ALT, concentração sérica de creatinina e hemoglobina corpuscular média. De acordo com os resultados obtidos, é possível inferir que NCZ apresenta baixa toxicidade e significativa atividade antitumoral *in vivo* com mecanismo de ação provavelmente relacionado a uma interferência na progressão do ciclo celular com indução de apoptose, aumento da resposta imune antitumoral e ação antiangiogênica.

Palavras-chave: Óxido de zinco. Óxido de cério. Nanopartículas. Toxicidade. Atividade antitumoral. Carcinoma Ascítico de Ehrlich.

XAVIER, A. L. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CÉRIO ASSOCIADAS AO ÓXIDO DE ZINCO**. 2015. 149f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - CCS/UFPB, João Pessoa - PB.

ABSTRACT

Nanomedicine is the use of nanomaterials in developing new therapeutic and diagnostic procedures. However, despite the advantages and different applications of nanoparticles, they also have potential toxic effects that should be properly assessed before use. Metal oxides and, in particular, metal oxide nanoparticles have many applications. Among them, cerium oxide nanoparticles and zinc oxide have shown different pharmacological activities, both alone, and in combination with each other. Cancer is a complex genetic disease which is a major public health problem worldwide, one of the leading causes of death in Brazil. This study aimed to evaluate the toxicity and antitumor activity in vivo of cerium oxide nanoparticles and zinc oxide association (NCZ). Initially it was evaluated the acute preclinical toxicity orally with estimated NCZ LD50 above 2000 mg/kg, therefore, the sample is considered to have low toxicity in our experimental conditions. Subsequently it was performed the evaluation of repeated doses toxicity study (28 days) of NCZ by oral route. The treatment resulted in a significant decrease in the consumption of water and feed, significant increase in enzyme activity of ALT and AST, significant decrease of urea, significant increase in the total white blood cell count, significant decrease in thymus index, significantly increased of ambulation and a decrease in time of self-cleaning and withdrawals. The study of acute toxicity by intraperitoneal route, the LD50 of NCZ was estimated at about 300 mg/kg enabling the choice of doses to be used in the study of antitumor activity. NCZ showed significant antitumor activity in Ehrlich ascites carcinoma model (EAC) at doses of 10, 20 and 40 mg/kg, considering the mass, tumor volume and total cell parameters. In the investigation of its mechanism of action was observed that NCZ increased the percentage of cells in sub-G1 phase, decreased microvessel peritoneal vascular, as well promoted an increased in the concentration of IL-1, IL-10, TNF- α and IFN- γ . It was also evaluated the toxicity of NCZ in animals with EAC submitted to antitumor treatment for nine days. It was observed a significant decrease in feed intake, significant increase in ALT activity, significant decrease in serum urea concentration, significant increase in serum creatinine and significant increase in the mean corpuscular hemoglobin. According to the results, we can infer that NCZ has low toxicity and significant antitumor activity in vivo with mechanism of action probably related to interference with the progression of the cell cycle, inducing apoptosis, increased immune response and antiangiogenic action.

Keywords: Zinc oxide. Cerium oxide. Nanoparticles. Toxicity. Antitumor activity. Ehrlich ascites carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura cristalina do CeO ₂	49
Figura 2.	Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo de toxicidade e atividade antitumoral de NCZ.....	57
Figura 3.	Histopatologia dos rins e fígado de camundongos submetidos ao tratamento agudo (v.o.) com NCZ.....	72
Figura 4.	Histopatologia do fígado e rins de camundongos submetidos ao tratamento de doses repetidas (v.o.) com NCZ.....	84
Figura 5.	Efeito do tratamento (i.p.) com NCZ e 5-FU em camundongos transplantados com CAE.....	86
Figura 6.	Porcentagem de células de CAE nas fases do ciclo celular após os diferentes tratamentos.....	87
Figura 7.	Efeito do tratamento com NCZ e 5-FU na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com CAE.....	88
Figura 8.	Concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos.....	90
Figura 9.	Histopatologia do fígado e rins de camundongos submetidos ao tratamento antitumoral com NCZ.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com dose única (v.o.) de NCZ.....	69
Tabela 2.	Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos submetidos ao tratamento com dose única (v.o.) de NCZ.....	70
Tabela 3.	Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos submetidos ao tratamento com dose única (v.o.) de NCZ.....	70
Tabela 4.	Índices dos órgãos de camundongos submetidos ao tratamento com dose única (v.o.) de NCZ.....	71
Tabela 5.	Consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	74
Tabela 6.	Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	75
Tabela 7.	Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos machos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	76
Tabela 8.	Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos fêmeas submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	77
Tabela 9.	Índices dos órgãos de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	78
Tabela 10.	Temperatura de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	78
Tabela 11.	Glicemia de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	79
Tabela 12.	Tempo de permanência na barra giratória (<i>rota-rod</i>) de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	80

Tabela 13.	Ambulação no teste de campo aberto de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ....	80
Tabela 14.	Tempo de auto-limpeza no teste de campo-aberto de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	81
Tabela 15.	Número de levantamentos em duas patas no teste de campo aberto de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	82
Tabela 16.	Número de bolos fecais no teste de campo aberto de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ.....	82
Tabela 17.	Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com NCZ e ciclofosfamida.....	85
Tabela 18.	Consumo de água e ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos.....	91
Tabela 19.	Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos.....	92
Tabela 20.	Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos.....	93
Tabela 21.	Índices dos órgãos de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-Fluorouracil
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Ativador de proteína-1
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CAE	Carcinoma ascítico de Ehrlich
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CE	Células endoteliais
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
DL50	Dose letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERK	Cinases reguladoras de sinais extracelulares
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FCE	Fator de crescimento epidérmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GHS	<i>The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HIF	Fator indutor de hipóxia

IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
NCI	Instituto Nacional do Câncer
NCZ	Nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco
NF-kB	Factor nuclear kappa B
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONCOFAR	Laboratório de Oncofarmacologia
PBS	Solução tampão fosfato
PPGO	Programa de Pós-graduação em Odontologia
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
PI	Iodeto de proprídio
RB	Proteína retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF	Fator de crescimento transformador
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEGF	Fator de Crescimento de Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1	Câncer: etiologia, epidemiologia e tratamento.....	21
2.2	Nanomedicina e o câncer.....	28
2.3	Nanotoxicologia.....	30
2.4	Estudo da toxicologia/farmacologia de nanopartículas com potencial anticâncer.....	38
2.5	Nanopartículas de óxido de cério (IV).....	49
2.6	Óxido de zinco.....	52
2.7	Nanopartículas de óxido de cério (IV) associadas ao óxido de zinco.....	52
3	OBJETIVOS.....	54
3.1	Objetivo geral.....	55
3.2	Objetivos específicos.....	55
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1	Local da pesquisa.....	58
4.2	Material.....	58
4.2.1	Nanopartículas de óxido de cério (IV) associadas ao óxido de zinco.....	58
4.2.2	Animais.....	59
4.2.3	Linhagem celular.....	59
4.3	Métodos.....	60
4.3.1	Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda.....	60
4.3.2	Avaliação da toxicidade pré-clínica de doses repetidas.....	61
4.3.3	Avaliação da genotoxicidade.....	63
4.3.4	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de	63

	Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE).....	
4.3.4.1	Avaliação da massa tumoral, volume do tumor e total celular.....	64
4.3.4.2	Análise do ciclo celular	64
4.3.4.3	Avaliação do efeito antiangiogênico.....	65
4.3.4.4	Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal.....	65
4.3.4.5	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com CAE e submetidos ao tratamento com NCZ.....	66
4.4	Análise estatística.....	66
5	RESULTADOS.....	68
5.1	Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda.....	69
5.2	Avaliação da toxicidade pré-clínica de doses repetidas.....	73
5.3	Avaliação da genotoxicidade.....	85
5.4	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de CAE....	85
5.4.1	Avaliação da massa tumoral, volume do tumor e total celular.....	85
5.4.2	Análise do ciclo celular.....	86
5.4.3	Avaliação do efeito antiangiogênico.....	87
5.4.4	Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal.....	89
5.4.5	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com CAE e submetidos ao tratamento com NCZ.....	91
6	DISCUSSÃO.....	96
7	CONCLUSÕES.....	111
	REFERÊNCIAS.....	113
	ANEXOS.....	147

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia tem se tornado o principal foco da pesquisa biomédica nos últimos anos. Nanopartículas possuem propriedades físico-químicas únicas, quando comparadas com suas macropartículas de mesma composição, o que lhe oferece uma melhora significativa em mais de uma dúzia de campos de atuação, incluindo a área automotiva, de construção, eletrônica, engenharia, alimentos e bebidas, indústria textil, química e cosmética, energia ambiental, esporte e área residencial e militar (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012).

Este argumento, juntamente com o potencial das aplicações tecnológicas desses nanomateriais, tem sido responsável por um investimento, da ordem de trilhões de dólares, por parte de governos e indústrias em todo o mundo (SANTOS, 2013).

A aplicação da nanotecnologia na área de saúde, conhecida como nanomedicina, envolve o uso de nanomateriais no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas e de diagnóstico. Isso inclui a utilização de nanopartículas em sistemas de liberação de drogas, biomarcadores luminescentes, engenharia de órgãos e tecidos, assim como os nanomedicamentos que têm emergido como uma nova opção de tratamento (GAO et al., 2014).

Todavia, apesar das vantagens e diferentes aplicações das nanopartículas, elas também possuem potenciais efeitos tóxicos que devem ser devidamente avaliados antes de sua utilização, área essa chamada de nanotoxicologia (MITTAL; PANDEY, 2014). Materiais produzidos em nanoescala podem levar a efeitos biológicos *in vivo* completamente diferentes quando comparados aos efeitos produzidos pelo material convencional de composição química idêntica e na mesma quantidade (ZHAO et al., 2014). De fato, alguns nanomateriais que foram previamente considerados biocompatíveis devido à segurança do material convencional, mostraram potencial toxicidade (AILLON et al., 2009).

Óxidos de metais e, em especial, nanopartículas de óxido de metais possuem várias aplicações. Dentre eles o óxido de zinco e as nanopartículas de óxido de cério já demonstraram diferentes atividades farmacológicas tanto de forma isolada, quanto em associação entre si. As nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco vem sendo testado na área odontológica, apresentando resultados promissores, uma vez que esses compostos, quando utilizados em associação

apresentaram atividade antimicrobiana mais potente do que a da associação do óxido de zinco com eugenol, combinação esta, tradicionalmente utilizada na prática odontológica (SANTOS, 2013). No entanto, apesar da atividade antimicrobiana apresentada pelas nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco, pouco se sabe sobre a toxicidade de associação, necessitando, portanto, de estudos nessa área.

Além da significativa atividade antimicrobiana apresentada pela associação em questão, outra atividade biológica de extrema importância apresentada por nanopartículas de óxido de cério, dentre tantas outras já descritas, é a atividade antitumoral em diferentes modelos experimentais (ALILI et al., 2011; ALILI et al., 2013; CHENG et al., 2013; GIRI et al., 2013; SACK et al., 2014; WASON et al., 2013).

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação e proliferação descontrolada de células geneticamente alteradas, sendo uma das principais causas de morte no Brasil. Estimativas apontam que a cada três pessoas, uma desenvolverá câncer em algum momento de sua vida (THORLEY; TETLEY, 2013). Terapias convencionais, incluindo intervenções cirúrgicas, radioterapia e quimioterápicos, são muitas vezes ineficazes na cura da doença (GAO et al., 2014). Além disso, os efeitos colaterais da terapia antineoplásica bem como o desenvolvimento de resistência aos diferentes tratamentos são limitações frequentemente observadas no tratamento dessa doença. Diante desse contexto e tendo em vista o rápido desenvolvimento da nanociência, diferentes medicamentos em nanoescala têm sido desenvolvidos para o tratamento do câncer.

Sabendo-se da necessidade de avaliação da toxicidade de nanoestruturas, cujos dados nessa área ainda são limitados, incluindo de nanopartículas de óxido de cério incorporadas em óxido de zinco a fim de promover sua utilização segura na odontologia, tendo em vista a necessidade da avaliação do potencial farmacológico de nanopartículas, em especial as de óxido de cério, e sabendo-se da necessidade de se encontrar alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer com maior seletividade de ação e menor toxicidade, esse trabalho se propôs a avaliar a toxicidade de nanopartículas de óxido de cério incorporadas em óxido de zinco, bem como, sua atividade antitumoral *in vivo*.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer: etiologia, epidemiologia e tratamento

O câncer é um termo genérico utilizado para definir um conjunto de doenças genéticas complexas, que resultam de alterações simultâneas em genes geralmente relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular (BRASIL, 2015).

O processo de transformação de uma célula saudável em célula tumoral geralmente é resultado de um processo multifatorial, que inclui a interação de fatores genéticos e três categorias de agentes externos: carcinógenos físicos (como ultravioleta e radiação ionizante), carcinógenos químicos (como vários constituintes da fumaça do cigarro ou contaminantes de água e alimentos) e carcinógenos biológicos (como infecções por determinados vírus, bactérias e parasitas) (WHO, 2010).

De acordo com o comportamento biológico os tumores podem ser classificados em benignos e malignos. Os tumores benignos tendem a apresentar crescimento lento e expansivo, determinando a compressão dos tecidos vizinhos, o que leva a formação de uma pseudocápsula fibrosa. Já nos casos dos tumores malignos, o crescimento é rápido, desordenado, destrutivo e infiltrativo, levando à formação de metástases, sem formação da pseudocápsula fibrosa (BRASIL, 2003; COOPER, 2000).

Outra diferença observada entre tumores benignos e malignos é a estrutura orgânica do tecido tumoral. Todas as estruturas orgânicas apresentam um parênquima, representado pelas células em atividade metabólica ou duplicação, e um estroma, representado pelo tecido conjuntivo vascularizado, cujo objetivo é dar sustentação e nutrição ao parênquima. Os tumores benignos, por exibirem crescimento lento, possuem um estroma e uma rede vascular adequada. No caso dos tumores malignos, devido à rapidez e desorganização do crescimento, pela capacidade infiltrativa e pelo alto índice de duplicação celular, eles apresentam uma desproporção entre o parênquima tumoral e o estroma vascularizado, acarretando em áreas de necrose e hemorragia, de grau variável com a velocidade do crescimento e a "idade" do tumor. O parênquima tumoral exibe grau variado de células, as dos tumores benignos, que são semelhantes e reproduzem o aspecto das células do tecido que lhes deu origem, são denominadas bem diferenciadas. As células dos tumores malignos perderam estas características, tem graus variados de

diferenciação e, portanto, guardam pouca semelhança com as células que as originaram e são denominadas pouco diferenciadas (BRASIL, 2003; COOPER, 2000).

Adicionalmente, os tumores benignos podem diferir dos malignos pelo número de mitoses no tecido tumoral. Este, expressa a atividade da divisão celular, ou seja, quanto maior a atividade proliferativa de um tecido, maior será o número de mitoses verificadas. Quanto mais diferenciado for o tumor, menor será o número de mitoses observadas e menor a agressividade do mesmo. Nos tumores benignos, as mitoses são raras e tem aspecto típico, enquanto que nas neoplasias malignas elas são em maior número e atípicas. Por fim, outra característica que diferencia tumores benignos de malignos é antigenicidade. As células dos tumores benignos, por serem bem diferenciadas, não apresentam a capacidade de produzir antígenos. Já as células malignas, pouco diferenciadas, tem essa propriedade (BRASIL, 2003; COOPER, 2000).

O termo câncer está relacionado ao desenvolvimento de um tumor maligno. As células cancerígenas são reconhecidas por apresentarem uma série de características específicas que incluem: instabilidade do genoma, sinalização auto-sustentada para proliferação celular, não responsividade a sinais supressores de crescimento, resistência à morte celular programada, imortalidade na replicação celular, indução de angiogênese, invasão e metástases, reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Uma das principais características das células tumorais é a habilidade de sustentar uma proliferação crônica. Isso ocorre de forma contrária em tecidos normais, que controlam cuidadosamente a produção e liberação de sinais de crescimento, fazendo com que a célula progrida no ciclo de crescimento e divisão celular, permitindo a homeostase do organismo e mantendo a arquitetura e função normal dos tecidos (CHENG et al., 2008).

As células tumorais são capazes de sustentar os sinais de proliferação celular de diferentes maneiras: por meio da auto-produção de fatores de crescimento que se ligam a receptores presentes em suas membranas celulares resultando em uma estimulação proliferativa autócrina; por meio de sinais estimulatórios para células sadias presentes no estroma peritumoral, as quais respondem produzindo vários fatores de crescimento (HANAHAN; WEINBERG, 2011); por meio do aumento do

número de receptores para fatores de crescimento expressos na superfície da célula, tornando-as hiper-responsivas a quantidades adequadas de fatores de crescimento, ou ainda, quando as células tumorais apresentam alterações estruturais nos receptores para fatores de crescimento permitindo que eles sejam ativados independente de ligação do ligante. A independência de fatores de crescimento também pode derivar de uma ativação constitutiva de componentes da via de sinalização (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Outra característica das células tumorais é a capacidade de evasão de programas que regulam negativamente o ciclo celular. Muitos desses programas dependem das ações de genes supressores de tumor. Os principais produtos desses genes são a proteína retinoblastoma (RB) e as proteínas p53. A RB integra sinais de várias fontes intra e extracelulares e, em resposta, decide se a célula deve progredir ou não no ciclo de crescimento e divisão celular. Assim, células tumorais com uma RB defeituosa e não funcional apresentam proliferação celular persistente. Já as proteínas p53 recebem sinais intracelulares, monitorando a ocorrência de condições adversas no processo de proliferação celular, como danos ao genoma, níveis de glicose, oxigênio, dentre outros. Uma vez que não haja condições propícias para a replicação celular, as mesmas podem parar o processo de proliferação até que as condições sejam normalizadas, ou dependendo do caso ativar o processo de apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O conceito de que a morte celular programada por apoptose atua como uma barreira natural para o câncer foi estabelecido por diversos estudos realizados nas últimas duas décadas (ADAMS; CORY, 2007; EVAN; LITTLEWOOD, 1998; LOWE et al., 2004). A elucidação do circuito de sinalização que atua no processo apoptótico revelou como a apoptose é iniciada em resposta a vários estresses fisiológicos que as células tumorais estão expostas durante a tumorigênese ou como resultado da terapia anticâncer. Desequilíbrios nessa sinalização estão presentes em células tumorais como resultado de níveis elevados de sinalização de oncogenes, e danos no DNA relacionados à hiperproliferação (ADAMS; CORY, 2007; LOWE et al., 2004). As células tumorais desenvolvem uma variedade de estratégias capazes de limitar ou burlar a apoptose, a mais comum é a perda da função da proteína supressora tumoral TP53, eliminando essa molécula essencial do circuito indutor de apoptose. Alternativamente, as células podem aumentar a

expressão de proteínas anti-apoptóticas, como é o caso das proteínas Bcl-2 e a Bcl-X_L, ou diminuir a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como a Bax, Bak, dentre outras (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As células tumorais possuem um potencial replicativo ilimitado, característica essa não observada em células normais, as quais sofrem apenas alguns ciclos de crescimento e divisão. Essa limitação que uma célula sadia tem, vem sendo associada a duas barreiras distintas para a proliferação: senescência, que é a entrada da célula em um estado não replicativo porém viável, e crise, que envolve morte celular. Em raras ocasiões, uma célula normal passa por essa última barreira adquirindo potencial replicativo ilimitado, termo conhecido por imortalização, comum para células neoplásicas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O desenvolvimento e a proliferação das células durante o crescimento normal e fisiológico dependem diretamente do adequado suprimento de oxigênio e de fatores de crescimento, além da retirada de resíduos tóxicos que poderiam comprometer a sobrevivência celular. Desde a década de 1950 já se sabe que a difusão radial do oxigênio em tecidos sólidos ocorre em apenas 150 a 200 µm a partir dos capilares. Sem adequado suprimento vascular além desse limite, há morte celular. Assim, a angiogênese, crescimento de novos vasos sanguíneos em tecidos, é um processo natural durante o desenvolvimento embrionário/fetal (organogênese) e em situações de anabolismo fisiológico (como por exemplo, na cicatrização) (GACCHE; MESHAM, 2013).

Da mesma forma que em situações fisiológicas, a angiogênese também pode ser induzida por células tumorais a fim de fornecer à massa crescente do tumor nutrientes e oxigênio, para sobrevivência e crescimento (AGRAWAL et al., 2011; FERREIRA; ROCHA, 2004).

Assim, outra característica comum entre as células neoplásicas é seu poder de invasão ativa e metástase. O processo de invasão de tecidos adjacentes ao tumor e a dispersão das células para outras regiões do corpo ocorre em várias etapas que envolvem uma sucessão de várias alterações biológicas celulares, iniciando com invasão local, em seguida com células tumorais atravessando as paredes de vasos sanguíneos e linfáticos e alcançando a luz dos mesmos até alcançar o parênquima de tecidos distantes (extravasamento) levando à formação de pequenos nódulos tumorais (micrometástases) e finalmente o crescimento dos

mesmos até a formação de tumores macroscópicos (FIDLER, 2003; TALMADGE; FIDLER, 2010).

A proliferação celular crônica e descontrolada que representa a essência das neoplasias envolve não só o descontrole da divisão celular, relacionadas à instabilidade do genoma, mas também outras características específicas, descritas pela primeira vez por Hanahan; Weinberg (2011). Dentre estas se incluem os ajustes correspondentes no metabolismo energético a fim de suprir o crescimento e divisão celular. As células tumorais possuem uma anomalia no metabolismo energético de tal forma que elas podem aumentar a captação e utilização da glicose e, portanto, a produção de energia.

A outra característica recentemente descrita baseia-se em evidências científicas que sugerem que o sistema imune opera como uma barreira à formação e progressão tumoral, no entanto, as células tumorais podem escapar dessa vigilância imunológica desativando componentes do sistema imune, por meio da secreção de fatores imunossupressores ou pelo recrutamento de células inflamatórias, ambas as ações levando à supressão da função de linfócitos citotóxicos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012, foram registrados 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo. As estimativas futuras indicam que essa incidência e mortalidade continuarão aumentando, chegando em 2030 a 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes em todo mundo. No Brasil as estimativas de 2015 apontam para a ocorrência de quase 600 mil novos casos (BRASIL, 2014). Dessa forma, as doenças tumorais neoplásicas vêm sendo indicadas como a segunda causa *mortis* mais frequente no Brasil, e juntamente com as doenças cardiovasculares e causas externas são responsáveis por 73% dos óbitos brasileiros (ALAPATI et al., 2012; MACHADO; MELO-JUNIOR, 2009).

Diferentes abordagens podem ser utilizadas para o tratamento do câncer. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos, para o tratamento da doença pode ser usada quimioterapia, imunoterapia, radioterapia, cirurgia, transplante de medula óssea, inibidores de angiogênese, terapia fotodinâmica e a laser e criocirurgia ou crioterapia. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade e mesmo assim, nem sempre estes métodos de

tratamento são úteis e os resultados clínicos aceitáveis (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Por se tratar de uma doença com elevado índice de mortalidade, vários esforços estão sendo feitos na busca de novos agentes antineoplásicos.

Novas estratégias vêm sendo estudadas na perspectiva de solucionar problemas da quimioterapia antineoplásica, como a baixa concentração de antineoplásicos em tumores, toxicidade sistêmica (EDMONSON et al., 2002; EXTERMANN et al., 2002; MA et al., 2002; TSALIC et al., 2003), ausência de seletividade para células tumorais, e o aparecimento de células tumorais resistentes aos quimioterápicos (PUSZTAI et al., 1998; BLAGOSKLONNY, 1999; KRISHNA; MAYER, 1997; FRACASSO et al., 2000).

Os antineoplásicos são fármacos quase tão heterogêneos (quando consideradas suas características químicas e mecanismos farmacológicos) quanto os tumores envolvidos (ALMEIDA et al., 2005). Os principais agentes antineoplásicos podem ser divididos em: 1) agentes citotóxicos, 2) hormônios e 3) agentes diversos.

Os fármacos citotóxicos inibem a divisão celular. Estes, por sua vez, podem ser divididos em: **i)** agentes alquilantes, que atuam através da formação de ligações covalentes com o DNA, impedindo, assim, a sua replicação, seu principal efeito é observado durante a síntese de DNA e o dano provocado desencadeia o processo de apoptose. Dentre os principais agentes alquilantes estão as mostardas nitrogenadas (ex: ciclofosfamida) e as nitrosuréias (ex: lomustina); **ii)** antimetabólitos, fármacos que bloqueiam ou subvertem uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA, podem ser classificados como antagonistas do folato (ex: metotrexato), análogos da pirimidina (ex: 5-fluorouracil) ou análogos da purina (ex: mercaptopurina); **iii)** antibióticos citotóxicos, substâncias de origem microbiana que impedem a divisão das células nos mamíferos, produzem seus efeitos principalmente através de ação direta sobre o DNA (ex: doxorrubicina); **iv)** derivados vegetais, atuam nos microtúbulos, alterando a função dos mesmos e, por conseguinte, a formação do fuso mitótico (ex: vincristina e vinblastina) (BRANDÃO et al., 2010).

Os tumores derivados de tecidos sensíveis a hormônio podem ser hormônio-dependentes. Assim, seu crescimento pode ser inibido por hormônios com ações opostas, por antagonistas de hormônios ou por agentes que inibem a síntese dos

hormônios relevantes. No tratamento de tumores desses tecidos podem ser utilizados hormônios ou análogos de hormônios, dentre eles podemos citar os glicocorticoides para leucemias e linfomas, o tamoxifeno para tumores de mama, análogos do hormônio de liberação das gonadotrofinas para tumores de próstata e de mama, antiandrógenos para câncer de próstata e inibidores da síntese de hormônios sexuais para o câncer de mama pós-menopáusico (LEAL; CUBERO; GIGLIO, 2010).

Outras classes de fármacos têm sido utilizadas para o tratamento de diferentes tipos de câncer. Dentre estes podem ser citados os inibidores da angiogênese, processo este essencial para o desenvolvimento e disseminação de tumores sólidos e hematológicos. O primeiro fármaco anti-angiogênico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) foi o bevacizumab, um anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF), utilizado atualmente para tratamento de tumores metastáticos de pulmão, mama, rins e coloretal (GIULIANO; PAGÈS, 2013).

Outra classe inclui os agentes biorredutíveis, compostos como a mitomicina C, misonidazol e tirapazamina, que necessitam de ativação metabólica para gerar metabólitos citotóxicos, processo este facilitado pela condição de hipóxia presente frequentemente nas células mais profundas nos tumores sólidos (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

Anticorpos monoclonais, ao se ligarem aos seus alvos específicos, podem ser usados como moduladores agonistas ou antagonistas de vias de sinalização celular estabilizando, diminuindo ou mesmo inibindo a proliferação celular ou induzindo a sua morte (MCCARRON et al., 2005; ANDRADY et al., 2011). Eles também podem atuar por meio da ativação de uma resposta imune antitumoral (REMER et al., 2015). Assim, os anticorpos representam uma promissora classe de fármacos em desenvolvimento contra o câncer.

O primeiro anticorpo monoclonal (mAb - *monoclonal antibody*) aprovado pelo FDA para o tratamento de um tumor foi o Rituximab, um mAb quimérico anti-CD20 IgG1, específico para o antígeno de superfície CD20, presente em neoplasias linfoides de células B como a leucemia linfóide crônica e linfomas não-Hodgkin de células B, resistentes a quimioterapia convencional (ORTIN 2005; ECCLES 2001; KLIMM et al., 2005; ANDRADY et al., 2011; KAUMAYA; FOY, 2012). Este foi seguido por outros mAbs como o trastuzumab, contra HER2 (receptor 2 do fator de

crescimento epidérmico humano), utilizado para tratar pacientes com câncer de mama expressando o antígeno HER2/neu, cetuximab específico contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (FCE) (STROME et al., 2007), e panitumumab, que se liga ao FCE e é útil para o tratamento de pacientes com câncer colorretal que possuem um aumento na expressão de FCE (RUTHANN et al., 2007; AURISICCHIO et al., 2012).

Apesar do grande progresso na terapia do câncer, como demonstrado pela ampla diversidade farmacológica surgida nos últimos anos, muitos tumores ainda são de difícil remissão (RIVA et al., 2012). Considerando ainda que o número de pessoas acometidas com a doença aumenta progressivamente no mundo inteiro, há um interesse crescente na pesquisa e desenvolvimento de produtos com atividade antitumoral, de fácil administração, alta eficácia e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Diante desse cenário, a aplicação da nanotecnologia está cada vez mais em evidência (MOGHIMI; FARHANGRAZI, 2014).

2.2 Nanomedicina e o câncer

A nanotecnologia pode ser definida como um campo científico multidisciplinar baseado no desenvolvimento, na caracterização, na produção e na aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas com tamanho em escala nanométrica (HUBBS et al., 2013).

Nanopartículas e nanomateriais são termos genéricos que englobam uma gama de estruturas nanométricas, as quais podem ser sintetizadas com diferentes formas e tamanhos. Embora a definição acordada para nanomateriais afirme que uma nanopartícula deve ser menor que 100 nm, isto é uma definição arbitrária e na área da nanomedicina o termo nanopartículas é mais flexível e inclui partículas de até 1 µm (THORLEY; TETLEY, 2013).

Em todo o mundo, empresas estão investindo substancialmente para o desenvolvimento de nanotecnologias em diversas áreas. Como resultado, o mercado de nanotecnologia atingiu cerca de \$147 bilhões em 2007 e deverá atingir cerca de \$3,1 trilhões em 2015 (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012). Mundialmente, o crescimento da nanotecnologia é exponencial, e isso pode ser

confirmado avaliando-se o número de patentes e de publicações na área (FLYNN; WEI, 2005). O rápido desenvolvimento da nanotecnologia tem proporcionado um aumento significativo de novos nanomateriais a serem utilizados em diferentes áreas, incluindo a área da saúde, alimentos, transporte, energia, eletrônica, entre outras (GRILLO; ROSA; FRACETO, 2014).

A nanomedicina, ou seja, a aplicação clínica de nanomateriais, é um importante campo de pesquisa, uma vez que as nanopartículas podem oferecer avanços promissores no tratamento de muitas doenças, seja atuando como um fármaco em si, mas também, sendo utilizadas no diagnóstico, no transporte de fármacos, como veículos que aumentam a eficácia e/ou diminuem a toxicidade *in vivo* de agentes terapêuticos, na proteção de compostos da inativação antes de atingirem o local de ação, para facilitar a captação celular do fármaco, na detecção de alterações moleculares causadoras de doenças, dentre outras funções (FAROKHZAD; LANGER, 2006; SACK et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2005)

A produção de nanomateriais para aplicações clínicas não é um fato recente, lipossomos, por exemplo, foram desenvolvidos há mais de 30 anos e são utilizados até hoje em vários medicamentos de uso clínico. No entanto, nos últimos anos a nanomedicina vem evoluindo de tal maneira que estruturas mais complexas estão sendo produzidas, capazes de serem direcionadas a tecidos específicos, possuindo mecanismos de liberação controlada de fármacos e capazes de permanecerem por mais tempo no organismo (THORLEY; TETLEY, 2013).

As nanopartículas tem impactado de forma considerável o tratamento de vários tipos de câncer, conforme evidenciado por várias nanoestruturas com atividade antitumoral e sistemas de liberação de fármacos já em uso clínico (MURTHY, 2007), vários exemplos podem ser encontrados em diferentes revisões da literatura (ALLEN; CULLIS, 2004; DUNCAN, 2003). O primeiro nanomedicamento com atividade antitumoral, Doxil[®] (doxorubicina lipossomal), chegou ao mercado em 1995 e até o presente momento é o nanomedicamento mais vendido em todo o mundo (MOGHIMI; FARHANGRAZI, 2014).

Existem vários tipos de antineoplásicos utilizados para tratar diferentes tipos de tumores, no entanto, o principal obstáculo da quimioterapia atual é a capacidade de se alcançar altas concentrações do fármaco no tumor sem causar sérios efeitos colaterais. Os avanços da nanotecnologia almejam superar esse obstáculo por meio

da criação de formulações que podem atacar diretamente as células tumorais evitando os efeitos sistêmicos (THORLEY; TETLEY, 2013).

Um dos benefícios primários dos agentes quimioterápicos formulados em escala nanométrica é que eles podem tirar vantagem do desenvolvimento desordenado do microambiente dos tumores sólidos. Estes são conhecidos por terem uma drenagem linfática insuficiente e angiogênese pobremente regulada, levando à formação de uma vasculatura desestruturada e fraca. Esses dois fatores causam um fenômeno conhecido por aumentar a permeabilidade e retenção, uma condição fisiológica que permite às nanopartículas alcançarem e se acumularem no tecido tumoral (HASHIZUME et al., 2000; MATSUMURA; MAEDA, 1986; THORLEY; TETLEY, 2013; YUAN et al., 1995). Cellax[®] (paclitaxel) é um exemplo de quimioterápico nanoformulado usado na clínica médica que apresenta bem menos efeitos colaterais que sua formulação tradicional (ERNSTING et al., 2012).

A reformulação de terapias tradicionais para a escala nanométrica também tem o potencial de superar a resistência dos tumores. Como exemplo pode-se citar um estudo recente de Wang e colaboradores (2014) que evidencia a atividade de nanopartículas de doxorrubicina sobre células multidroga resistentes de adenocarcinoma de mama.

Já é bem conhecido que tumores são capazes de se tornar resistentes aos agentes antineoplásicos por uma regulação de diferentes mecanismos, dentre estes, a reparação de danos causados pelos fármacos ou a expressão de canais transportadores de múltiplas drogas reponsáveis pelo efluxo das mesmas do citosol (LUQMANI, 2005; PERSIDIS, 1999; THORLEY; TETLEY, 2013); assim a reformulação das drogas já usadas na clínica pode aumentar sua eficácia em tumores resistentes.

2.3 Nanotoxicologia

A nanotoxicologia destina-se a avaliar os efeitos toxicológicos de nanopartículas e seus produtos para determinar se, e em que medida, elas podem representar uma ameaça ao ambiente e a saúde humana (ZHAO et al., 2014). É, portanto, definida como um ramo da bionanociência que estuda a natureza e os mecanismos dos efeitos tóxicos de materiais/partículas em nanoescala nos sistemas

biológicos, enfatizando a relação entre as propriedades físico-químicas (tais como tamanho, superfície, composição, agregação, entre outras) com o surgimento desses efeitos (Al et al., 2011; EL-ANSARY; AL-DAIHAN, 2009). Ainda, a nanotoxicologia também inclui o estudo da prevenção e do tratamento dos efeitos adversos provocados pelos nanomateriais (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012). Sendo assim, o conhecimento da nanotoxicologia é a base para o desenvolvimento de nanomateriais e nanoproductos seguros, e conseqüentemente para o direcionamento de seu uso na nanomedicina (ZHAO et al., 2014).

Apesar dos avanços e benefícios produzidos pela nanotecnologia, é provável que ela tenha se tornado uma nova fonte de risco ao ambiente e ao homem, por meio da inalação, ingestão ou penetração na pele de nanomateriais em ambientes de trabalho, ou pelo uso de produtos em escala nanométrica, incluindo aqueles com finalidades terapêuticas (ZHAO et al., 2014).

Os humanos estão sendo expostos a partículas nanométricas transportadas pelo ar de diferentes fontes, tais como, incineradores, motores a jato, fumos de polímeros, motores de combustão, usinas de energia, dentre outras, as quais podem desencadear leves ou graves problemas de saúde. Não intencionalmente, os químicos/pesquisadores envolvidos na produção de nanopartículas são susceptíveis a inalá-las. Ainda, também pode haver inalação por parte dos usuários submetidos a um regime nanoterapêutico (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012). Portanto, a exposição do meio ambiente e dos seres humanos a diferentes nanopartículas faz com que, apesar da grande utilidade desses materiais, a avaliação de sua toxicidade seja imprescindível.

Dados recentes da literatura mostram o aumento quase exponencial nos últimos 15 anos em relação ao número de artigos publicados sobre nanotoxicologia. Segundo o autor, apesar de apenas cerca de 200 trabalhos terem sido publicados sobre o tema "Nanomateriais: efeitos ambientais e na saúde" antes de 2000, esse número cresceu para mais de 10 mil desde 2001 (KRUG, 2014). Contudo, diretrizes regulatórias específicas para a avaliação da toxicidade de nanopartículas ainda estão em estágio de desenvolvimento (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012).

Esses materiais produzidos em nanoescala, considerando especialmente a reatividade de superfície aumentada, podem levar a efeitos biológicos *in vivo* completamente diferentes quando comparados aos efeitos produzidos pelo material

convencional de composição química idêntica e na mesma quantidade (ZHAO et al., 2014).

De fato, embora os estudos a respeito da magnitude e dos mecanismos de toxicidade de nanomateriais sejam conflitantes, é evidente que alguns nanomateriais que foram previamente considerados biocompatíveis devido à segurança do material convencional, mostraram potencial toxicidade (AILLON et al., 2009). Como exemplo podem ser citados os nanomateriais produzidos a partir de elementos inertes, tais como o ouro, que se tornam muito reativos em dimensões nanométricas. Também é notável que a combinação de alguns metais nanométricos pode provocar toxicidade que não era observada com a utilização dos materiais isoladamente (AI et al., 2011).

Diversos fatores influenciam a toxicidade de nanopartículas, dentre eles, o seu tamanho. Uma redução no tamanho de partículas em nanoescala resulta tanto em uma maior capacidade de atravessar as membranas celulares, atingindo a corrente sanguínea e vários órgãos, como também em um aumento exponencial na área de superfície em relação ao volume. Isto torna a superfície do nanomaterial mais reativa em si (agregação) e ao seu ambiente circundante (componentes biológicos) (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012). Assim, mais moléculas químicas e componentes biológicos podem interagir com esta superfície, o que reforça a sua reatividade e resulta em uma potencialização de seus efeitos tóxicos (AI et al., 2011; HYUK et al., 2009; CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012).

Outros parâmetros que significativamente afetam a toxicidade de nanopartículas são a forma, a área de superfície específica, a composição de nanopartículas, o estado de aglomeração/agregação, a distribuição de tamanho, a morfologia da superfície, a cristalinidade, a solubilidade, a estrutura molecular, e a superfície química, incluindo composição, carga, tensão, sítios reativos, propriedades fotocatalíticas e o potencial zeta (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012).

O grau de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade de uma superfície é uma das principais características usadas para estimar a toxicidade. Assim como o tamanho, a superfície das partículas é crítica em relação à sua absorção na mucosa intestinal, por exemplo. Sendo assim, a absorção de nanopartículas produzidas por polímeros hidrofóbicos é significativamente maior do que àquela observada para nanopartículas produzidas por polímeros hidrofílicos. Além disso, os componentes químicos da superfície da partícula têm importantes efeitos sobre como as

nanopartículas podem reagir com metais. Por exemplo, o ferro endógeno pode ser afetado por nanopartículas, o que aumenta a indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, a toxicidade (Al et al., 2011; OBERDO, 2010).

Considerando que os tecidos do organismo humano apresentam composição, estruturas e funções diferentes, as respostas tóxicas às nanopartículas são diferentes. O trato respiratório, o trato gastrointestinal e a pele representam o contato direto do organismo com as nanopartículas ambientais. O trato respiratório é convencionalmente dividido em três segmentos (trato respiratório superior, vias aéreas e pulmões) a maioria dos quais funciona como um sistema de tubulação para o transporte de ar aos pulmões. O trato gastrointestinal pode captar, transportar, digerir e absorver várias substâncias tais como nutrientes, água e vitaminas dos alimentos. Já a pele, uma barreira estrutural de proteção entre o corpo e o ambiente, desempenha um importante papel na proteção da penetração de partículas exógenas (LIANG et al., 2013).

Portanto, essas vias de exposição são consideradas as portas de entrada de nanopartículas no organismo humano. Adicionalmente, outros sistemas como o sistema nervoso central e o sistema cardiovascular podem interagir com nanopartículas exógenas circulantes ou transportadas a partir de uma das vias de exposição descritas acima (Al et al., 2011; CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012; EL-ANSARY; AL-DAIHAN, 2009; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005; ZHAO et al., 2014).

O estudo dos efeitos tóxicos de nanopartículas no trato respiratório é crescente. As nanopartículas podem percorrer grande distância pelo ar usando o movimento browniano (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012). Investigações epidemiológicas têm encontrado associações entre incidência de doenças respiratórias do tipo enfisema, bronquite crônica e asma, e mortalidade, com concentrações de nanopartículas transportadas pelo ar no ambiente (ZHAO et al., 2014).

A toxicidade por nanopartículas deve-se a deposição no trato respiratório, desde a faringe, traqueia e alvéolos, bem como a um retardo na sua eliminação (BAKAND; HAYES; DECHSAKULTHORN, 2012). O processo de eliminação ocorre por meio de i) dissolução química, para partículas solúveis, em fluidos intra ou extracelulares, nos quais os solutos e componentes solúveis podem sofrer absorção

e difusão e chegar na circulação sanguínea e/ou linfática, ou como **ii)** translocação física, para partículas insolúveis ou de baixa solubilidade. Nesse caso, a eficiência da eliminação depende do sítio de deposição no trato respiratório e do tamanho da partícula. Nas vias aéreas superiores, a eliminação dá-se por meio da atividade do sistema mucociliar, enquanto que, nanopartículas depositadas na região alveolar são eliminadas especialmente via fagocitose por macrófagos. Porém, esse processo pode ser retardado considerando que as nanopartículas se depositam de forma dispersa na superfície alveolar, o que resulta em baixo reconhecimento e respostas por macrófagos alveolares (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012; SIMKÓ et al., 2010; ZHAO et al., 2014).

Vários trabalhos mostram a toxicidade produzida por diferentes nanopartículas no trato respiratório, incluindo àquela induzida por nanotubos de carbono (JIA et al., 2005), nanopartículas de óxido de ferro (ZHU et al., 2008) e nanopartículas de dióxido de silício (ZHAO et al., 2014).

É considerado que a exposição à nanopartículas exógenas via ingestão resulta primeiramente do contato mão-a-boca nos ambientes de trabalho. Alternativamente, as nanopartículas podem ser ingeridas por meio de alimentos, água, bebidas, medicamentos ou sistemas de liberação de fármacos. Ainda, as nanopartículas que entram no organismo via trato respiratório podem atingir o trato gastrointestinal por meio da depuração via sistema mucociliar e subsequente ingestão (EL-ANSARY; AL-DAIHAN, 2009; PATTAN; KAUL, 2014). Essas pequenas partículas podem difundir-se facilmente para o sistema circulatório através do epitélio do estômago e do intestino que tem mais de 200 m² de área de superfície (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012). Então, o trato gastrointestinal também é considerado um importante alvo de toxicidade das nanopartículas, com alguns trabalhos descritos na literatura mostrando esses efeitos, dentre eles, a toxicidade gastrointestinal produzida por nanopartículas de cobre (CHEN et al., 2006) e de óxido de zinco (WANG et al., 2008).

Em relação à dermatotoxicidade, há ainda uma grande discussão sobre a absorção de nanopartículas através da pele ou simplesmente sua deposição nas camadas da pele produzindo toxicidade local (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012, LIANG et al., 2013).

Estudos com nanopartículas de dióxido de titânio, utilizadas em protetores solares, mostraram que não há absorção do mesmo e sim a sua permanência nas

camadas superficiais da pele (VOGT et al., 2014). Todavia, há evidências de que algumas nanopartículas podem penetrar até a derme e produzir toxicidade, dentre elas, podem ser citadas as nanopartículas de berílio e nanotubos de carbono (ZHAO et al., 2014). Ainda, as nanopartículas são susceptíveis de se acumularem em torno dos folículos pilosos e durante o crescimento do pelo estes folículos são abertos, fornecendo uma rota de entrada no organismo. Paralelamente, lesões/doenças de pele podem comprometer a sua função protetora e proporcionar uma via de entrada para as nanopartículas (Al et al., 2011; CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012; SIMKÓ et al., 2010; STERN; MCNEIL, 2008).

Além disso, investigações epidemiológicas também mostram a correlação entre a exposição a nanopartículas e reações cardíacas que culminam com doenças cardiovasculares (PATTAN; KAUL, 2014). Como exemplos, podem ser citados os efeitos cardiovasculares induzidos por nanotubos de carbono (LI et al., 2007) e nanopartículas de dióxido de silício, que incluem isquemia miocárdica e aumento da viscosidade sanguínea (CHEN et al., 2008).

Estudos tem suportado a ideia de que o sistema nervoso central representa um importante alvo de nanopartículas inaladas ocasionalmente ou após administração intranasal (PATTAN; KAUL, 2014; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005). Isso foi observado para nanopartículas de carbono, para nanopartículas de óxido de manganês (ELDER et al., 2006; OBERDÖRSTER et al., 2004), e nanopartículas de dióxido de titânio (WANG et al., 2008), além de nanopartículas de prata, cobre e alumínio (SHARMA; SHARMA, 2012).

Os estudos moleculares dos mecanismos de toxicidade das nanopartículas apontam que o principal mecanismo envolvido nesse efeito é a indução de estresse oxidativo (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012; MEDINA et al., 2007). Por exemplo, a citotoxicidade específica da sílica está fortemente correlacionada com a produção de EROs que é considerado um evento chave no desenvolvimento de fibrose e câncer de pulmão causado por nanopartículas deste composto (Al et al., 2011).

Os radicais livres que induzem o quadro de estresse oxidativo podem se originar de várias fontes, dentre elas, da resposta das células fagocíticas a presença das nanopartículas consideradas estranhas ao organismo, de quantidades

insuficientes de antioxidantes endógenos, da presença de metais de transição, e das próprias propriedades físico-químicas de alguns nanomateriais (AILLON et al., 2009).

Em excesso, esses radicais livres causam danos aos componentes biológicos por meio da oxidação de lípidos, proteínas, e DNA. Neste caso, estas espécies reativas podem danificar o DNA, parar o ciclo celular e induzir apoptose. Ainda, o estresse oxidativo pode ter um papel na indução ou no aumento da inflamação através de regulação positiva de fatores de transcrição, como por exemplo, o factor nuclear kappa B (NF-kB), o ativador de proteína-1 (AP-1), e vias de sinalização de cinases (cinases reguladoras de sinais extracelulares (ERKs) C-Jun, cinase N-terminal JNK e proteína cinase ativada por mitógeno p38) (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012; EL-ANSARY; AL-DAIHAN, 2009; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005; SIMKÓ et al., 2010).

A lenta depuração e o acúmulo de nanomateriais potencialmente produtores de radicais livres nos tecidos, bem como a prevalência de células fagocíticas nos órgãos do sistema reticuloendotelial, fazem de órgãos tais como fígado e baço os principais alvos do estresse oxidativo induzido por essas estruturas (AILLON et al., 2009). Além disso, os órgãos de alto fluxo sanguíneo que são expostos aos nanomateriais, tais como os rins e pulmões, também podem ser afetados (EL-ANSARY; AL-DAIHAN, 2009).

Nas células de forma geral, as interações de nanomateriais com a mitocôndria e núcleo celular são consideradas como as principais fontes de toxicidade. Por exemplo, nanomateriais, como nanopartículas revestidas de prata e ouro, fulerenos, micelas de copolímero e nanotubos de carbono, podem se acumular nas mitocôndrias e induzir apoptose e aumento de EROs, além de agir no DNA provocando danos que levam a parada do ciclo celular e apoptose, bem como mutagênese (PATTAN; KAUL, 2014).

Quando introduzidos ou absorvidos na circulação sistêmica, a interação com componentes do sangue pode levar a hemólise e a trombose. Além disso, é bem descrito que as interações de nanomateriais com o sistema imunológico produzem imunotoxicidade. No fígado, o metabolismo dos nanomateriais por enzimas do citocromo P450 pode resultar em hepatotoxicidade por intermediários reativos (AILLON et al., 2009; PATTAN; KAUL, 2014). Genotoxicidade, carcinogenicidade e

teratogenicidade também podem ocorrer como resultado dos efeitos de nanopartículas (Al et al., 2011).

Como dito anteriormente, a nanotecnologia está se desenvolvendo rapidamente nos últimos anos, e o uso comercial de nanomateriais para novas aplicações está crescendo exponencialmente. No entanto, o potencial genotóxico da maioria desses nanomateriais ainda é desconhecido (FU et al., 2014). Ainda, a avaliação do potencial genotóxico é um dos mais importantes estudos de segurança pré-clínicos necessários para a aprovação e registro de medicamentos (MUHAMMAD, 2010). Dessa forma, o estudo da genotoxicidade de drogas candidatas a agentes farmacológicos torna-se de fundamental importância.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração no campo da nanotoxicologia é o aumento da exposição ocupacional e da liberação dessas nanopartículas no meio-ambiente (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010). Um estudo pioneiro de Oberdörster (2004) demonstrou que nanopartículas de fulereno C60 são capazes de induzir alterações no cérebro de peixes, mesmo em baixas concentrações na água, desde então vários estudos vem sendo desenvolvidos com a finalidade de se investigar os efeitos nas nanopartículas sobre o meio-ambiente (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010).

A compreensão holística dos riscos ambientais e para a saúde das nanopartículas é uma tarefa bastante desafiadora, a análise dos riscos ambientais dessas partículas é muito mais difícil do que das moléculas “regulares”. Uma das características que dificultam essa análise é o fato de que as nanopartículas podem possuir diferentes tamanhos e diferentes formas, isso significa que uma única nanopartícula pode apresentar um grande número de combinações com outras substâncias, levando à diferentes propriedades físico-químicas, que por sua vez podem ocasionar diferente (eco)toxicidade, assim como, diferentes comportamentos no meio-ambiente (KAHRU; IVASK, 2013).

Considerando todos os aspectos abordados, apesar do advento da nanomedicina produzir inúmeros avanços, não é possível negligenciar o potencial de toxicidade desses produtos à saúde humana e ao ambiente. Por isso, a nanotoxicologia é uma área emergente e essencial para a aplicabilidade das nanopartículas nas mais diversas áreas de conhecimento.

2.4 Estudo da toxicologia/farmacologia de nanopartículas com potencial anticâncer

As diretrizes regulatórias específicas para a avaliação da toxicidade de nanopartículas ainda estão em estágio de desenvolvimento (CHIDAMBARAM; KRISHNASAMY, 2012). Paralelamente, modelos experimentais amplamente usados no mundo inteiro para avaliação das diferentes atividades farmacológicas de novos candidatos a fármacos, são usados na investigação dos efeitos biológicos de nanopartículas.

Modelos experimentais *in vivo* são também importantes para a obtenção de informações sobre a toxicidade de uma droga em estudo (TALMADGE et al., 2007). Nesses ensaios, amostras teste são tipicamente administradas pela via que se espera ser usada em humanos e são conduzidos de forma a se aumentar gradativamente o tempo de utilização da substância, iniciando-se pelos estudos de toxicidade aguda. Quando esse esquema é seguido, cada estudo desenvolvido provê informações úteis para um estudo de maior duração que venha a ser realizado subsequentemente (ANVISA, 2013; GAD, 2007).

Nos estudos de toxicidade aguda cada animal recebe uma única dose da amostra em estudo. Em raras ocasiões devido à limitações de volume, o animal pode receber mais de uma dose, desde que a administração do volume total não exceda 24 horas. Existem diferentes metodologias utilizadas para a realização desses estudos, o “Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”, desenvolvido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), descreve algumas recomendações para a realização desse e de outros estudos de toxicidade em geral, assim como sugere a utilização de outros guias como o “Guidelines for Testing of Chemicals” nº 425 da *The Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) (OECD, 2001).

Os estudos de toxicidade aguda da OECD geralmente estão baseados na administração da substância a um grupo de animais, e dependendo da taxa de sobrevivência desse grupo inicial, outros grupos são adicionados ao estudo recebendo doses maiores ou menores da substância teste. A sobrevivência dos animais e sinais gerais de toxicidade são observados durante um período pré-determinado de tempo (14 dias) por meio de um protocolo abrangente de

observações e análise dos animais após a administração da substância (ALMEIDA, 2006) e a dose letal 50% é obtida na forma de um intervalo de concentrações que corresponde a uma categoria da “*The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*” (GHS), um sistema internacional de padronização e harmonização da classificação de substâncias químicas.

Os resultados de um estudo bem desenvolvido de toxicidade aguda podem ajudar a prever possíveis desfechos e órgãos alvo quando a substância é exposta a humanos, ajudando a estabelecer categorias de risco e a seleção de doses a serem utilizadas em estudos clínicos (ANVISA, 2013).

No caso dos estudos de toxicidade de doses repetidas o objetivo principal é descrever e definir a toxicidade associada com a administração repetida da substância teste. Nesse tipo de estudo geralmente identificam-se os órgãos e sistemas alvo, a dose máxima que permite a administração repetida sem ocasionar mortes, e a dose máxima que não é capaz de produzir graves efeitos adversos. No estudo de doses repetidas, os animais geralmente recebem uma única dose diária da substância teste, sete dias por semana, pela via que se espera ser usada em humanos. São incluídos três a quatro grupos de animais expostos a diferentes níveis de doses da substância, e um grupo adicional exposto ao veículo utilizado na dissolução da mesma, servindo como controle. O tamanho de cada um dos grupos pode variar de cinco a dez animais/gênero/dose e os parâmetros monitorados devem incluir observações diárias de sinais de toxicidade e mortalidade, semanalmente devem ser avaliados o consumo de água e ração e a evolução ponderal, e ao fim do estudo avaliações bioquímicas do sangue (ALMEIDA, 2006; ANVISA, 2013; GAD, 2007).

Inúmeros trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de candidatos a novos fármacos, utilizam parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade (BEZERRA et al., 2008; BEZERRA et al., 2009; GONZAGA et al., 2009; LINS et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010). Nesses estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, como as transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); na função renal, como ureia e creatinina, bem como nos parâmetros hematológicos

como o eritrograma, leucograma e plaquetograma. Ainda, exames anatomopatológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função, em nível celular.

A maioria dos medicamentos utilizados clinicamente no tratamento dos mais variados distúrbios apresenta em comum a falta de seletividade de ação, o que resulta em significativos efeitos colaterais. Dentre esses efeitos colaterais indesejáveis estão àqueles resultantes de uma ação central da droga. Assim, estudos de toxicidade, muitas vezes incorporam em sua metodologia uma análise comportamental dos animais, que visa identificar efeitos sobre o sistema nervoso central, sejam eles depressores ou estimulantes, ou manifestações autonômicas, aos quais também é atribuído o termo neurotoxicidade (ALMEIDA, 2006). Dentre os testes utilizados para confirmar a ação central das drogas estão o teste do campo aberto e o teste do *rota-rod*.

O campo aberto consiste em uma arena dividida em quadrantes por meio de linhas pintadas em sua superfície. As bordas da arena são delimitadas por paredes e uma fonte de luz artificial é colocada acima do aparato. Cada animal submetido ao estudo, após, no mínimo, uma hora da administração da substância, é colocado no centro dessa arena e por cinco minutos é realizada a observação e o registro do comportamento do mesmo no que diz respeito ao número de levantamentos em duas patas (“rearing”), o número de quadrantes percorridos com as quatro patas (ambulação), o tempo de auto-limpeza (“grooming”) e o número de bolos fecais. Um aumento ou diminuição do comportamento exploratório e/ou ações repetidas levam a alterações nesses parâmetros indicando efeitos estimulantes ou sedativos da amostra em estudo, respectivamente (SÁ et al., 2013).

O *rota-rod* é um equipamento que mede a influência da amostra em estudo sobre a atividade motora do animal. O aparelho possui uma barra giratória suspensa, dividida por paredes plásticas, na qual são colocados os animais. Cada baia possui em seu piso uma prancha acoplada a um sistema de detecção de queda do animal, que pelo impacto, interrompe automaticamente o contador digital de tempo. Dispositivos de controle automático permitem que a velocidade de giros seja programada, além da contagem automática do número de quedas e o tempo de permanência dos animais na barra. Transcorridos 30 minutos da administração da substância, os animais são colocados na barra giratória e o tempo de permanência é registrado, limitando-se as observações ao tempo máximo de três minutos por

animal ou três reconduções à barra (NÓBREGA, 2012). Esse teste mede o efeito do relaxamento muscular ou de incoordenação motora produzido por drogas com atuação sobre o sistema nervoso central (SNC) (ALMEIDA, 2006).

Na área da genotoxicidade, diferentes métodos podem ser utilizados para investigação do potencial genotóxico de diferentes substâncias, dentre eles está o teste *in vivo* do micronúcleo, realizado em roedores. Ele é muito utilizado em pesquisa e avaliações de segurança para investigação do potencial de agentes físicos e químicos de causar danos genéticos (DERTINGER, 2006).

Esse teste baseia-se na observação de células que sofrem quebra de cromátides, ou alterações na distribuição de suas cromátides, devido à ação de agentes genotóxicos. Durante a anáfase (fase da divisão celular em que há a segregação dos cromossomos), os fragmentos provenientes das quebras ou cromossomos inteiros, não acompanham a migração para os pólos da célula. Conseqüentemente, na telófase (fase em que os cromossomos se descondensam e ocorre a formação de um novo invólucro nuclear em torno de cada conjunto de cromossomos), tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (COSTA E SILVA; NEPOMUCENO, 2010).

Assim, quando um produto em teste aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ele interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso, levando ao aparecimento de fragmentos de cromatina, ou cromossomos inteiros, que não se incorporaram ao núcleo das células-filhas, os micronúcleos (COSTA E SILVA; NEPOMUCENO, 2010).

Devido à relativa semelhança entre células malignas e normais do corpo, o grande desafio para o tratamento de cânceres é a distinção entre essas células, a fim de minimizar a toxicidade sobre células não tumorais do organismo. A quimioterapia continua sendo o principal método de tratamento do câncer. Esta baseia-se na busca da destruição de células neoplásicas, que têm como característica o fato de se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais (BRANDÃO et al., 2010).

Contudo, podem ocorrer efeitos secundários importantes naquelas células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema

imunológico, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (BRANDÃO et al., 2010).

A avaliação desses parâmetros é, portanto, de extrema importância na determinação de possíveis efeitos tóxicos de drogas antineoplásicas. Além disso, a avaliação toxicológica também permite a identificação de possíveis alterações, em diferentes parâmetros, ocasionadas pela presença do tumor por si só, que podem ser agravados pelo tratamento antineoplásico, tornando-se uma limitação do seu uso.

A cancerologia experimental é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos (PITA, 2010; QI; XU, 2006). Modelos de câncer em animais são sistemas que mimetizam a natureza do tumor encontrado em humanos. As metodologias mais empregadas no estabelecimento do câncer em animais de laboratório envolvem a indução química (na qual se induz a geração de um tumor por meio da administração de uma substância apropriada), ou o transplante de células tumorais (KERBEL, 2003).

O carcinoma de Ehrlich é um adenocarcinoma murino, transplantável, de rápido crescimento e comportamento agressivo (NASCIMENTO et al., 2006) que pode se desenvolver tanto na forma sólida (quando as células são inoculadas por via subcutânea), como na forma ascítica (quando as células são inoculadas por via intraperitoneal), nesse último caso levando ao desenvolvimento de uma carcinomatose peritoneal com acúmulo de líquido ascítico no abdômen (KLEIN; KLEIN, 1956; EHRLICH, 1906; VIEIRA et al., 2010). Assim, o Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE), mantido em laboratório por meio de transplantes sucessivos (repique *in vivo*), tem a vantagem de se desenvolver na forma ascítica (“líquida”), permitindo a obtenção de células tumorais isoladas (HOSSNE, 2002).

Uma célula se reproduz por meio de uma sequência ordenada de eventos que duplicam seus componentes e depois a dividem em duas. Este ciclo de duplicação e divisão é conhecido como ciclo celular. Ele compreende uma sequência complexa de eventos que garante a transmissão correta, para as células filhas, de uma cópia completa do genoma. Pode ser dividido em várias fases: S – fase em que ocorre duplicação do DNA; M – fase em que ocorre a divisão celular, dando origem à duas células-filhas; G0/G1 e G2 – fases que precedem a S e M, respectivamente (HAO; CHO, 2014; LEE; SANDHU MCARTHUR, 2015; MALUMBRES; BARBACID, 2009; OGINO et al., 2005).

Os eventos do ciclo celular são desencadeados por um sistema de controle que garante que os mesmos estejam no compasso correto, na ordem correta e ocorram somente uma vez em cada ciclo celular. No entanto, uma mutação pode interferir nesses mecanismos de controle, dar certa vantagem seletiva para uma célula, possibilitando que ela se divida mais vigorosamente que suas células vizinhas, e venha a se tornar a fundadora de um clone mutante que passe a crescer dando origem a um tumor (HAO; CHO, 2014; LEE; SANDHU MCARTHUR, 2015; MALUMBRES; BARBACID, 2009; OGINO et al., 2005).

A citometria de fluxo pode ser utilizada para identificar em qual fase do ciclo se encontra determinadas células em estudo. Antes da análise, as células são tratadas com um corante fluorescente como o iodeto de propídio (PI), com a função de marcar o DNA. A intensidade da fluorescência obtida na análise, correlaciona-se dessa maneira, com a quantidade de DNA que as células contêm. Como o conteúdo de DNA das células duplica durante a fase S do ciclo, a quantidade de células na fase G₀/G₁ (antes da fase S), na fase S, e na fase G₂/M (depois da fase S) podem ser determinadas, uma vez que a fluorescência das células na fase S e G₂/M será até duas vezes maior do que nas células na fase G₀/G₁ (fase G₀/G₁: valor de n, conteúdo de DNA, igual a 1; fase S: valor de n entre 1 e 2; fase G₂/M: valor de n maior ou igual a 2) (KRISHAN, 1975; RICCARDI; NICOLLETTI, 2006).

Antineoplásicos de uso clínico e várias nanopartículas em fase de desenvolvimento exercem seus efeitos antitumorais por induzir parada no ciclo celular e, conseqüentemente, apoptose. Apoptose é um processo de morte celular programada em resposta a muitos estímulos fisiológicos e patológicos (ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001). É reconhecida como um mecanismo importante na homeostase celular durante o desenvolvimento, sendo um processo que elimina células supérfluas, danificadas ou células mutantes (REED, 2002).

De um modo geral, a apoptose é um fenômeno rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear (ARAVINDARAM; YANG, 2010). Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e

tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Essas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; STRASSER; CORY; ADAMS, 2011). Outra característica marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base (SARASTE; PULKKI, 2000).

Fármacos capazes de inibir a angiogênese têm sido utilizados com sucesso no tratamento do câncer. Angiogênese é o processo de geração de novos vasos sanguíneos, já a angiogênese tumoral pode ser definida como um processo que resulta em uma expansão tumoral sustentada pela adição de novos vasos sanguíneos, que, na maioria das vezes, brotam de outros vasos sanguíneos pré-existentes (GACCHE; MESHAM, 2013).

Trata-se de um complicado fenômeno que ocorre em várias etapas, iniciando pela ativação de células endoteliais (CE), levando à liberação de proteases que promovem a degradação da membrana basal de CE presentes na vizinhança dos vasos pré-existentes. Subsequentemente a esse evento, CE migram para os novos espaços intersticiais formados, seguindo-se uma fase de extensa proliferação celular formando novos vasos sanguíneos. Finalmente, o fluxo de sangue se inicia e a nova vasculatura alcança estabilidade após a fase de maturação (KLAUBER-DEMORE, 2012).

Uma vez que as células tumorais adquirem a habilidade de induzir a angiogênese, a expansão tumoral é iniciada. A vasculatura criada em consequência da angiogênese tumoral é estruturada de modo a alterar o microambiente do tumor e controlar fortemente a maneira como a massa tumoral cresce, permitir a evasão da vigilância imunológica do hospedeiro, e promover metástases (GACCHE; MESHAM, 2013; KLAUBER-DEMORE, 2012).

O processo de neoangiogênese como um processo biológico é regulado por vários fatores pró e anti-angiogênicos, em especial o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator indutor de hipóxia (HIF) - 1 e fator de crescimento transformador (TGF). Toda célula epitelial destinada à formação de

novos vasos sanguíneos possui receptores para esse peptídeos angiogênicos (GACCHE; MESHAM, 2013).

Nos últimos anos várias moléculas naturais e sintéticas tem sido testadas com a finalidade de inibir a angiogênese tumoral (GACCHE et al., 2011; GACCHE et al., 2010).

Os princípios básicos sobre a imunidade antitumoral avançaram bastante a partir do final da década de 1950, quando foi desenvolvida a hipótese de que o sistema imunológico teria a capacidade de reconhecer e eliminar células tumorais geradas durante um processo de transformação celular maligna. Hoje sabe-se que o organismo é capaz de não só combater células tumorais já formadas, mas também de destruir clones de células transformadas antes mesmo que ocorra sua malignização. Contudo, o estabelecimento de um tumor pode acontecer por meio de falhas do sistema imunológico nesse combate, seja pelo aparecimento de mecanismos de escape tumoral (mecanismos de resistência à resposta imunológica), ou ainda por uma deficiência imune do organismo (AGRAWAL et al., 2011; CHOW; LUSTER, 2014).

Algumas infecções virais estão relacionadas com a patogênese de tumores (como, por exemplo, infecções por Epstein-Barr, vírus da hepatite e papiloma vírus), além disso, o surgimento de alguns tipos de tumores malignos como sarcomas, linfomas e carcinomas ocorre com maior incidência em indivíduos imunocomprometidos. Isto indica claramente que o sistema imunológico previne o desenvolvimento de tumores em indivíduos saudáveis, seja por meio da imunidade gerada contra patógenos externos ou por meio da eliminação de determinadas células com potencial oncogênico (MOMTAZ; POSTOW, 2014).

Assim, o grande desafio atual na área de imunologia tumoral é o desenvolvimento de terapias antitumorais. Estas terapias têm como objetivo principal estimular a resposta imune do organismo, levando a uma ativação da vigilância imunológica e a uma quebra do escape tumoral (POSTOW; CALLAHAN; WOLCHOK, 2015).

Diferentes citocinas podem estimular uma resposta imune antitumoral por diferentes mecanismos (XU et al., 2010). A interleucina (IL) - 1 é uma citocina que possui papel importante na inflamação, ativação imunológica, resposta à infecções e na hematopoiese. Ela é produzida por quase todas as células humanas nucleadas, embora seja predominantemente produzida por monócitos e macrófagos. Sua

liberação é induzida por antígenos, toxinas, injúria, processos inflamatórios, infecções, assim como por outras citocinas (DUTCHER et al., 2014). IL-1 ativa diretamente os linfócitos T, assim como aumenta a atividade citotóxica dessas células. Além disso, a IL-1 sozinha ou em combinação com outras interleucinas promove a proliferação e ativação de linfócitos B, assim como a secreção de anticorpos por essas células. IL-1 também é um potente indutor de outras citocinas e proteínas regulatórias, incluindo IL-6, fator de necrose tumoral - α (TNF- α) e moléculas de adesão intracelulares (DINARELLO et al., 2012). Na hematopoese, essa citocina atua sinergicamente e por meio da indução da expressão de fatores de crescimento hematopoiéticos permitindo um aumento da sobrevivência das células progenitoras e aumentando a formação de colônias multipotentes (DINARELLO et al., 2010).

De particular relevância para a terapia do câncer estão os efeitos antitumorais da IL-1. IL-1 apresenta atividade antiproliferativa direta contra certos tipos de linhagens humanas *in vitro*, incluindo células neoplásicas de melanoma, sangue, coriocarcinoma, osteosarcoma, glioblastoma, mama, pâncreas, pulmão, dentre outras, assim como atividade antitumoral *in vivo* contra vários tumores murinos incluindo tumores que não foram inibidos nos estudos *in vitro* (DUTCHER et al., 2014).

A IL-4 é uma citocina que possui muitas funções biológicas, incluindo a estimulação das células B ativadas e proliferação de células T. É um regulador chave na imunidade humoral e adaptativa. No entanto é uma citocina que tem sido frequentemente associada à atividade proliferativa e antiapoptótica de células tumorais (HALLETT; VENMAR; FINGLETON, 2012; LI et al., 2008; TODARO et al. 2007). Um estudo revelou que a resistência à apoptose, induzida por drogas, em células CD133⁺ de câncer de colon, era mediado pelo aumento da produção de IL-4. Os autores, por meio de testes preliminares, sugeriram então que essa via de pró-sobrevivência mediada pela IL-4 deveria ser um promissor alvo terapêutico. No mesmo estudo, o bloqueio de IL-4, com um anticorpo neutralizador ou uma forma mutante dessa citocina reduziu a viabilidade das células tumorais CD133⁺ e aumentou a eficácia do tratamento antitumoral com agentes antineoplásicos padrões: oxaliplatina, 5-fluorouracil e o ligante de receptor de morte TRAIL. O antagonismo de IL-4 também aumentou a eficácia e a duração da resposta quimioterápica em camundongos com tumores (TODARO et al., 2007). Estudos

desse tipo sugerem a possibilidade de uma terapia antitumoral que envolva diminuição na secreção e/ou função de IL-4 (TOOMER; CHEN, 2014).

O papel anti-inflamatório da IL-10 estimulou a suposição de que a mesma enfraqueceria a resposta imune contra tumores. No entanto, já foi demonstrado que camundongos e humanos deficientes na sinalização de IL-10, desenvolvem tumores espontaneamente e em altas taxas. Além disso, o aumento da expressão de IL-10 em modelos de câncer humano leva à rejeição do tumor e a uma imunidade tumoral de longa duração (OFT, 2014). Assim, substâncias que possam aumentar a atividade de IL-10 podem ser vantajosas no tratamento do câncer.

IL-12 é uma citocina essencial para a diferenciação das células Th1, que são necessárias para a geração da imunidade mediada por células tipo 1 contra tumores e infecções (XU et al., 2010). A atividade antitumoral e antimetastática dessa citocina tem sido extensivamente avaliada em uma variedade de modelos tumorais murinos, incluindo melanomas, carcinomas mamários, carcinoma de cólon, carcinoma renal e sarcomas (BRUNDA et al., 1993; COLOMBO; TRINCHIERI, 2002). A administração de IL-12 em camundongos com tumor pode atrasar, reduzir e, em alguns casos, inibir completamente o desenvolvimento do tumor, com eficácia terapêutica significativa em muitos tumores sólidos assim como em leucemias e linfomas. Em testes clínicos, no entanto, o efeito terapêutico é limitado, além da ocorrência de toxicidade sistêmica como esplenomegalia, leucopenia e toxicidade gastrointestinal (CAR et al., 1999). Embora as razões para a eficácia clínica da IL-12 ser limitada, não serem completamente compreendidas ainda, vários mecanismos immunosupressivos podem estar envolvidos (PORTIELJE et al., 2003). Assim, várias estratégias tem sido criadas para aumentar a eficácia terapêutica dessa citocina e ao mesmo tempo minimizar sua toxicidade (XU et al., 2010). A IL-12 trata-se, portanto, de uma das citocinas de maior potencial para a imunoterapia do câncer.

Em resposta a estímulos pró-inflamatórios, macrófagos ativados e linfócitos T produzem o TNF- α . Essa citocina estimula a inflamação por diferentes mecanismos, incluindo recrutamento de neutrófilos e monócitos e a indução da expressão de moléculas de adesão celular na superfície endotelial (BRADLEY, 2008; LIPPITZ, 2013). TNF- α está envolvido na via clássica de ativação de macrófagos, a qual possui papel central na defesa imune contra tumores e parasitas intracelulares (GALDIERO et al., 2013). O nome “fator de necrose tumoral” faz referência aos

estudos que demonstraram a capacidade dessa citocina de induzir necrose hemorrágica em sarcomas transplantados subcutaneamente em camundongos (CARSWELL et al., 1995). O TNF- α pode ser utilizado clinicamente no tratamento de melanomas e sarcomas de tecidos moles. Altas concentrações dessa citocina promovem um aumento na permeabilidade e ruptura estrutural da vasculatura tumoral, promovendo, portanto, necrose tumoral e aumentando a eficácia das drogas citotóxicas tradicionais (TOOMER; CHEN, 2014).

Interferons (IFNs) são uma família de citocinas que se ligam a receptores na membrana celular e medeiam numerosas funções relacionadas à defesa contra patógenos, função imune, sobrevivência e diferenciação celular, e angiogênese (SELIGER; RUIZ CABELLO; GARRIDO, 2008; ZAIDI; MERLINO, 2011). O IFN- γ é produzido principalmente por linfócitos T, células NKT e células *natural killer*, como um componente crucial da resposta inflamatória (SCHRODER et al., 2004). Modelos murinos demonstram várias propriedades anti-carcinogênicas para o IFN- γ (IKEDA; OLD; SCHREIBER, 2002). A supressão da sinalização de IFN- γ mediada por anticorpo revelou que essa citocina é necessária para a rejeição de tumores transplantados em camundongos. Ademais, camundongos *knockout* para o receptor de IFN- γ exibem susceptibilidade maior a tumores espontâneos e quimicamente induzidos (IKEDA; OLD; SCHREIBER, 2002; SCHRODER et al., 2004). IFN- γ é um poderoso indutor da maquinaria apresentadora de antígenos de classe I e II, evidenciando sua importância primária na produção de respostas imunes específicas antitumorais (SELIGER; RUIZ CABELLO; GARRIDO, 2008).

Ensaio *in vitro* também revelaram efeitos pró-apoptóticos, antiangiogênicos e antiproliferativos (FOJTOVA et al., 2007; IKEDA; OLD; SCHREIBER, 2002; SELIGER; RUIZ CABELLO; GARRIDO, 2008; SCHRODER et al., 2004). Além disso, uma produção diminuída de IFN- γ tem sido observada em uma variedade de tumores humanos, incluindo melanoma, câncer gástrico, câncer de pulmão, glioblastoma, carcinoma nasofaríngeo, câncer coloretal e câncer de cabeça e pescoço (LIPPITZ, 2013). Ainda, certos cânceres humanos, notavelmente o melanoma, são conhecidos por desenvolver resistência ao IFN- γ por meio de várias mutações em moléculas *downstream* da via de transdução de sinal do IFN, tais como JAK e STAT1 (FOJTOVA et al., 2007; SELIGER; RUIZ CABELLO; GARRIDO, 2008). Em resumo, todos esses diferentes dados experimentais

evidenciam o importante papel do IFN- γ na resposta imunológica ao câncer (TOOMER; CHEN, 2014).

2.5 Nanopartículas de óxido de cério (IV)

Dentre os compostos de cério, o dióxido de cério (CeO_2), também chamado de óxido de cério (IV) é o mais estável em virtude de sua estrutura cúbica do tipo fluorita (SANTOS, 2013) (Figura 1).

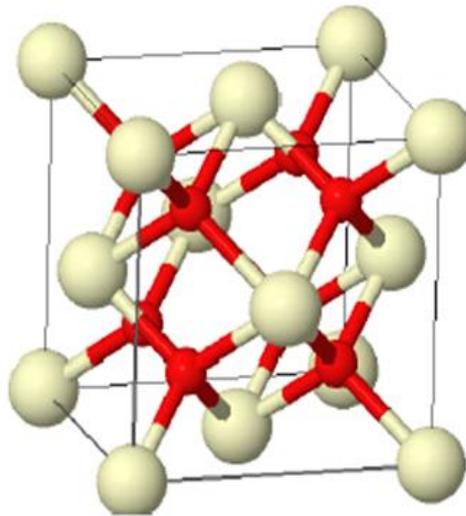


Figura 1 – Estrutura cristalina do CeO_2 (Fonte: SANTOS, 2013)

Um número grande de relatos na literatura evidenciam diversas atividades farmacológicas de diferentes nanopartículas de óxido de cério, considerando os parâmetros físico-químicos, em diferentes sistemas e órgãos. Dentre os estudos e atividades farmacológicas realizados nos últimos anos, pode-se citar estudos *in vitro* como: inibição de apoptose em diferentes tipos de células (ARYA et al., 2014; CHEN, 2013; CLARK, 2011; HOSSEINI et al., 2013), efeito antioxidante (CIOFANI et al., 2014; COLON et al., 2010; NIU; WANG; KOLATTUKUDT, 2011; PAGLIARI et al., 2012; POURKHALILI et al., 2012), assim como capacidade de induzir estresse oxidativo intracelular e aumentar os níveis de cálcio intracelular (HORIE et al., 2011).

Também foi demonstrada inibição da adipogênese em células tronco mesenquimais de ratos (ROCCA et al., 2014), efeitos benéficos no desenvolvimento

de condrócitos e na resposta celular à efeitos deletérios de interleucinas (PONNURANGAM et al., 2014) e proteção contra neurodegeneração (DOWDING et al., 2014). Ainda, estudos mostram atividade antimicrobiana contra diferentes tipos de bactérias (BABENKO et al., 2012; WANG; PEREZ; WEBSTER, 2013), atividade angiogênica (DAS et al., 2012) e indução de alterações químicas e de tamanho no transcriptoma de células neurais murinas, tendo, portanto, potencial aplicação em desordens neurodegenerativas (LEE et al., 2012). Além disso, estudos toxicológicos mostraram que algumas nanopartículas de óxido de cério não apresentam efeitos citotóxicos em osteoblastos e promovem a diferenciação osteogênica e a mineralização de osteoblastos (ZHOU et al., 2013), além de não possuir efeito genotóxico em células epiteliais oftalmológicas humanas (PIERSCIONEK et al., 2010).

Diversos estudos *in vivo* também demonstram diferentes atividades biológicas das nanopartículas de óxido de cério, tais como: eficácia contra endometriose em ratos (CHAUDHURY et al., 2013), efeito imunomodulatório em células dendríticas humanas, induzindo uma resposta TH2 (SCHANEN et al., 2013), assim como atividade antioxidante na inibição do desenvolvimento e promoção da regressão de neovascularização patológica na retina de camundongos *Vldlr knockout* (ZHOU et al., 2011), induz prevenção da degeneração da retina em ratos (CAI et al., 2014; KONG et al., 2011), inibição da expressão de genes associados com a inflamação e angiogênese na retina de camundongos *Vldlr null* (KYOSSEVA et al., 2013), promoção da regressão de neovascularização induzida por estresse oxidativo, e indução de apoptose por meio da inibição da via de sinalização ASK1-P38/JNK-NF- κ B após injeção intravítrea em camundongos (CAI; SEAL; McGINNIS, 2014).

Nanopartículas de óxido de cério também apresentaram atividade protetora em tecido pulmonar de ratos contra estresse oxidativo e inflamação induzido por hipóxia hipobárica (ARYA et al., 2013) e efeito antioxidante *in vivo* (HIRST et al., 2013). Ainda, a associação das nanopartículas de óxido de cério com selenito de sódio atenua o estresse oxidativo induzido por diabetes em ratos (POURKHALILI et al., 2011). Também foi observado efeito protetor em modelo murino de esclerose múltipla mediado por radicais livres (HECKMAN et al., 2013), atenuação da resposta hipertrófica cardíaca resultante de hipertensão pulmonar

arterial induzida por monocrotalina (KOLLI et al., 2014) assim como, hepatoproteção em hepatotoxicidade induzida por monocrotalina (AMIN, 2011).

Ao ser adicionado ao diesel, as nanopartículas de óxido de cério diminuem a propensão à aterosclerose relacionada à exposição à fumaça do mesmo (CASSEE et al., 2012). Elas também possuem efeito protetor sobre a supressão de AP-1 no cérebro após exposição à fumaça do combustível diesel (LUNG et al., 2014), aceleram a cicatrização de feridas dérmicas em camundongos por um mecanismo que envolve o aumento da proliferação e migração de fibroblastos (CHIGURUPATI et al., 2013), previnem xerostomia induzida por radiação (MADERO-VISBAL et al., 2012), são capazes de diminuir as consequências de lesão cerebral isquêmica em camundongos (ESTEVEZ et al., 2011) e não são citotóxicas após injeção intravítrea (WONG et al., 2013).

Além das diferentes atividades farmacológicas citadas, vários estudos também evidenciam atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* para nanopartículas de óxido de cério com diferentes propriedades físico-químicas, como: aumento da citotoxicidade da doxorubicina em células de melanoma humano (SACK et al., 2014), efeito protetor em células humanas normais, mas não em células tumorais, contra o dano ocasionado por EROs após radiação UV (ZHANG et al., 2014), sensibilização de células pancreáticas cancerosas à radioterapia (WASON et al., 2013), citotoxicidade em células de hepatoma humano SMMC-7721 com mecanismo de ação envolvendo estresse oxidativo e a via de sinalização da MAPK (CHENG et al., 2013), atividade antiangiogênica em câncer de ovário (GIRI et al., 2013), citotoxicidade, atividade pró-apoptótica e anti-invasiva em células de melanoma, assim como atividade antitumoral *in vivo* em camundongos, dentre outras (ALILI et al., 2011; ALILI et al., 2013).

No entanto, apesar das diferentes atividades biológicas apresentadas por essas nanopartículas, alguns estudos também relatam efeitos tóxicos, é o caso de: efeito genotóxico, por mecanismo clastogênico, em fibroblastos humanos (BENAMEUR et al., 2014), efeitos pulmonares adversos quando adicionado ao diesel utilizado como combustível (SNOW et al., 2014), prejuízos na dilatação arteriolar após exposição pulmonar às nanopartículas (MINARCHICK et al., 2013), danos genéticos, alterações bioquímicas e histopatológicas após acúmulo em altas concentrações em órgãos vitais de ratos (KUMARI; KUMARI; GROVER, 2014),

toxicidade pulmonar e extrapulmonar após administração por via inalatória em camundongos CD1 (AALAPATI et al., 2014; CHO et al., 2010; DEMOKRITOU et al., 2013), toxicidade em células pulmonares humanas relacionada com a geração de radicais livres, dano ao DNA e parada do ciclo celular (MITTAL; PANDEY, 2014), indução de fibrose pulmonar em ratos (MA et al., 2012), inflamação pulmonar e alterações funcionais em macrófagos alveolares em ratos (MA et al., 2011), danos hepáticos e estresse oxidativo após administração endovenosa (TSENG et al., 2012), toxicidade hepática em ratos após administração intratecal (NALABOTU et al., 2011), citotoxicidade e resposta inflamatória crônica após administração por via inalatória (SRINIVAS et al., 2011), além de indução de apoptose e autofagia em monócitos sanguíneos humanos (HUSSAIN et al., 2012).

2.6 Óxido de zinco

O óxido de zinco é um óxido de metal que apresenta diferentes aplicações na área industrial (AZIZ et al., 2014; PRADHAN et al., 2014) e odontológica (HERNÁNDEZ-SIERRA et al., 2008). A literatura também relata atividades biológicas para essa substância, como: atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* quando adicionado a um agente de união ortodôntica (JATANIA; SHIVALINGA et al., 2014), ativação de proteína quinase ativada por mitógeno e a via de sinalização do TGF- β 1 aumentando a integridade da barreira intestinal em leitões (SONG et al., 2014), dentre outras, incluindo o uso clínico para tratamento de diferentes afecções dermatológicas (GUPTA et al., 2014; KHATTAR et al., 2007).

Poucos estudos podem ser encontrados relatando propriedades tóxicas ou indesejáveis do óxido de zinco. Slifierz e colaboradores (2014) evidenciaram que a suplementação da ração de porcos com óxido de zinco aumenta a prevalência e a persistência de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

2.7 Nanopartículas de óxido de cério (IV) associadas ao óxido de zinco

O cimento de restauração de óxido de zinco é um material de uso odontológico utilizado há anos com essa função. Na prática odontológica outras

substâncias são adicionadas ao óxido de zinco com a finalidade de aumentar suas propriedades bactericidas e bacteriostáticas (HERNÁNDEZ-SIERRA et al., 2008).

O óxido de cério também é utilizado na área odontológica em porcelanas dentárias (O'BRIEN et al., 1998). Ele apresenta atividade antimicrobiana contra diferentes tipos de bactérias (BABENKO et al., 2012; WANG; PELLETIER et al., 2010; PEREZ; WEBSTER, 2013).

Recente relato na literatura sobre nanopartículas de óxido de cério (IV) associadas ao óxido de zinco demonstra significativa atividade antimicrobiana dessa associação. O compósito formado por óxido de cério nanométrico, nas proporções de 10, 20, 30 e 40%, mais óxido de zinco apresentou propriedades antimicrobianas contra *Streptococcus mutans* (responsável pelo processo cariogênico), superiores à associação padrão utilizada na clínica odontológica (óxido de zinco + eugenol), apresentando-se, portanto, como um material de grande potencial para uso odontológico (SANTOS et al., 2013).

No entanto, apesar de apresentar grande potencial para aplicação odontológica, não há dados na literatura que avaliem a sua possível toxicidade. Dessa forma, o presente trabalho propôs-se a avaliar a toxicidade da referida associação com o objetivo de fornecer dados relacionados à segurança de seu uso, bem como avaliar seu potencial antitumoral.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e atividade antitumoral de nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco (NCZ).

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a toxicidade pré-clínica aguda de NCZ em camundongos Swiss por via oral e intraperitoneal;
- Investigar a toxicidade pré-clínica de doses repetidas (28 dias) de NCZ em camundongos Swiss por via oral;
- Investigar a genotoxicidade *in vivo* de NCZ;
- Avaliar a atividade antitumoral de NCZ em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich;
- Analisar as alterações no perfil do ciclo celular induzidas por NCZ;
- Avaliar o efeito antiangiogênico de NCZ;
- Avaliar a participação de citocinas no mecanismo de ação antitumoral de NCZ;
- Avaliar o perfil de toxicidade de NCZ após tratamento antitumoral em camundongos transplantados com tumor de Ehrlich.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos toxicológicos e farmacológicos de NCZ foram realizados de acordo com o fluxograma abaixo (Figura 2):

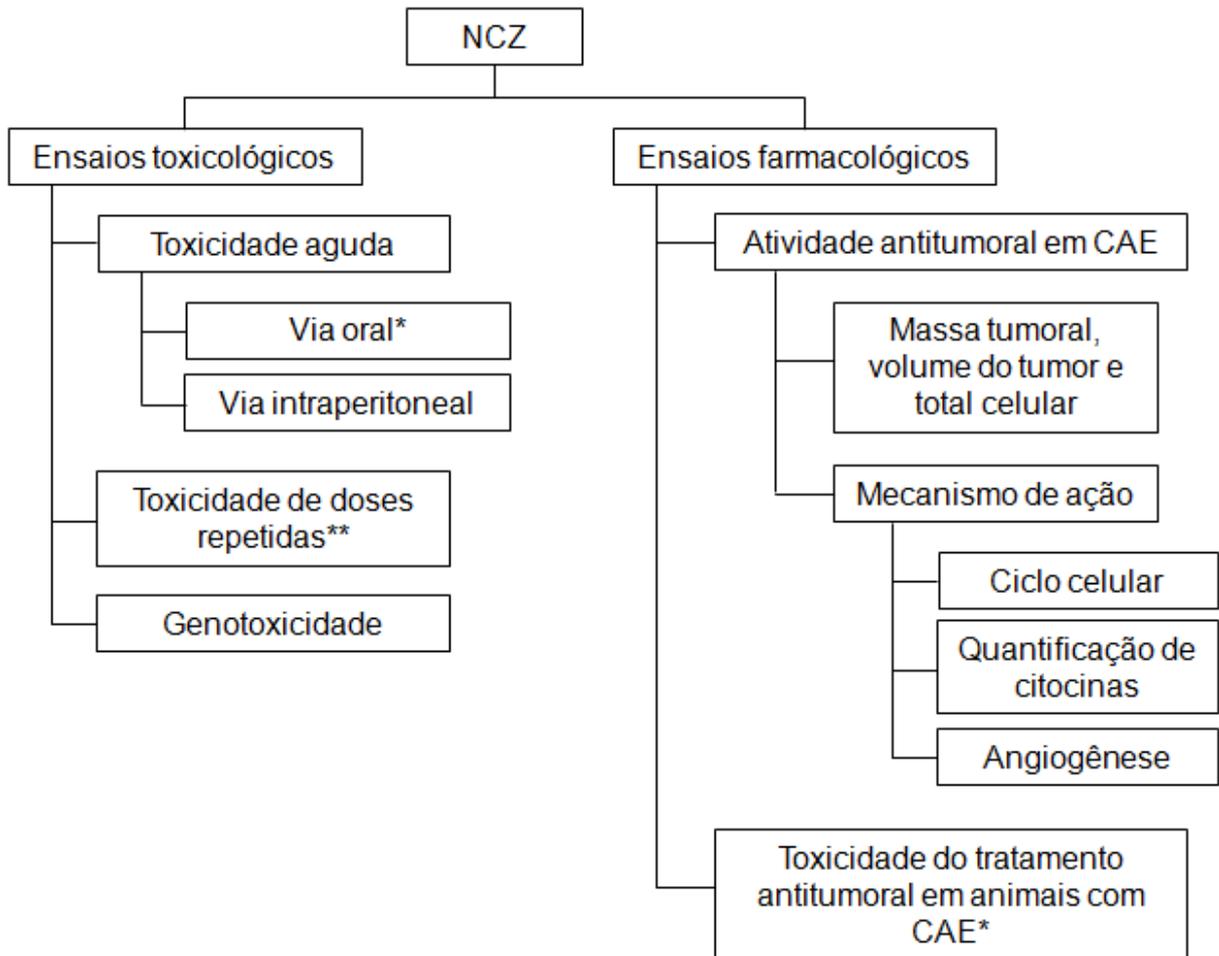


Figura 2 – Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo de toxicidade e atividade antitumoral de NCZ. *Parâmetros avaliados: avaliação ponderal e do consumo de água e ração; parâmetros bioquímicos e hematológicos; índice de órgãos e análises anatomopatológicas. **Parâmetros avaliados: avaliação ponderal e do consumo de água e de ração; parâmetros bioquímicos e hematológicos; índice de órgãos, temperatura, glicemia, tempo de permanência na barra gitaória, ambulação, auto-limpeza, levantamento em duas patas, defecação e análises anatomopatológicas.

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR) e no biotério Prof. Thomas George, ambos do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/CCS), todos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Nanopartículas de óxido de cério (IV) associadas ao óxido de zinco

A associação de nanopartículas de óxido de cério incorporadas em óxido de zinco (NCZ) foi obtida por técnicas específicas e gentilmente fornecida pelos colaboradores da química, Dr. Carlos Christiano Lima dos Santos e Prof. Dr. Dawy Keyson de Araújo Almeida (Departamento de Química/Centro de Ciências Exatas e da Natureza/UFPB).

Para produção do óxido de cério (IV), um sal precursor (sulfato de cério tetra hidratado), foi dissolvido em 100 mL de água destilada com a adição de agente alcalinizante até o pH desejado (valor de pH 14 para NaOH P.A.). A solução foi mantida sob agitação por 15 min até completa dissolução do sal precursor. Esta mistura reacional foi transferida para a autoclave de teflon, hermeticamente selada, e encaminhada ao Reator Hidrotermal de Micro-67 ondas modelo HMO 100 I9TEC. Cada sistema reacional utilizado foi tratado termicamente a 150 °C, utilizando como intervalos de tempo os valores 1, 5, 15, 30 e 60 minutos, com uma taxa de aquecimento fixada em 10 °C/min. Como resultado, observou-se um precipitado de partículas muito finas que foi coletado e, após decantação, lavado, por várias vezes, com água destilada, até pH constante, e, em seguida, foi submetido à secagem, em estufa, a temperatura de 150 °C por uma hora. O material, após secagem, foi encaminhado para as caracterizações.

Análises por microscopia de transmissão eletrônica da amostra mostraram partículas nanométricas esféricas com aproximadamente 5 nm de diâmetro. Microanálises por espectroscopia de energia dispersiva demonstraram picos

característicos relacionados ao cério e oxigênio, cujo padrão se repetiu para todas as amostras analisadas, confirmando a homogeneidade da mesma e que o óxido de cério preparado é o CeO₂, óxido de cério (IV) (SANTOS, 2013).

Para a produção de NCZ, as nanopartículas de óxido de cério obtidas foram incorporadas em óxido de zinco comercial, na proporção 1:10.

4.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), machos e fêmeas, pesando entre 28 e 32 g, com faixa etária aproximada de 60 dias, obtidos do biotério Prof. Thomas George (IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), com livre acesso à comida (*pellets* de ração da marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, colocadas nas grades metálicas das gaiolas em sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram mantidos no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFPB, sob a certidão N° 0812/10.

4.2.3 Linhagem celular

Para os ensaios *in vivo* de atividade antiumoral foi usada a linhagem de células adenocarcinoma mamário de camundongo (carcinoma ascítico de Ehrlich) mantidas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss no biotério Prof. Thomas George.

4.3 Métodos

4.3.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

O ensaio de toxicidade aguda, por via oral, em camundongos foi realizado de acordo com o “Guidelines for Testing of Chemicals” nº 425 da OECD (OECD, 2001).

Para tanto, após jejum de três horas, NCZ foi administrado, por via oral, a um único animal fêmea na dose de 2000 mg/kg (0,1 mL/10 g peso animal). Após 48 h, com a confirmação da sobrevivência do animal que recebeu a amostra, quatro outros animais foram tratados sequencialmente com a mesma dose, resultando em um total de cinco animais, fêmeas, testados. No início do estudo, um grupo controle, com cinco animais, recebeu o veículo (Tween 80 5%) nas mesmas condições.

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e autônomo, após administração de NCZ foi realizada observação cuidadosa para detecção de possíveis sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após quatro horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental descrito por Almeida et al. (1999) do Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB (ANEXO A).

Os animais foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração.

No décimo quarto dia do experimento, após jejum de seis horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (2 mg/animal – i.p.) e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada.

Para a análise dos parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT) o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Já para as análises hematológicas foi utilizado sangue total heparinizado e realizada avaliação das séries vermelha e branca (eritograma e leucograma).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados por meio de kits específicos utilizando-se o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (*Roche Diagnostic System*) e o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente. As extensões

sanguíneas foram coradas com coloração panótica e analisadas em microscópio óptico, para realização da contagem diferencial de leucócitos.

Após a coleta do sangue, todos os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e os órgãos (coração, timo, baço, fígado e rins) retirados e pesados. O índice dos órgãos foi calculado como: Índice = mg (órgão)/g (animal).

Após a pesagem dos órgãos, fígado e rins foram seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e após 24 horas, foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático, os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração com hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson, em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os procedimentos descritos foram realizados com a colaboração dos patologistas Profa. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo e Dr. Alexandre Rolim da Paz.

O ensaio de toxicidade aguda, por via intraperitoneal, em camundongos foi realizado de acordo com o “Guidelines for Testing of Chemicals” nº 423 da OECD (OECD, 2001).

Para tanto, NCZ foi administrado, por via intraperitoneal, a três animais fêmeas na dose de 300 mg/kg. Após 14 dias, e confirmação da sobrevivência e/ou morte dos animais, o estudo prosseguiu de acordo com o protocolo descrito no guia da OECD, com a administração de NCZ a um segundo grupo de três animais fêmeas na dose de 50 mg/kg (ANEXO B). A cada início de tratamento com a associação, um grupo controle, com três camundongos fêmeas, recebeu o veículo (5% de Tween 80) nas mesmas condições.

A avaliação comportamental dos animais submetidos aos tratamentos foi realizada conforme descrito anteriormente para o ensaio por via oral.

4.3.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica de doses repetidas

O ensaio de toxicidade de doses repetidas em camundongos foi realizado de acordo com o “Guidelines for Testing of Chemicals” nº 407 da OECD (OECD, 1995).

Camundongos Swiss foram distribuídos em quatro grupos de 20 animais cada, contendo 10 machos e 10 fêmeas. Após jejum de 3 horas, três grupos receberam NCZ, por via oral, nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, diariamente, por 28 dias, e o grupo controle recebeu apenas o veículo (5% de Tween 80), nas mesmas condições.

Os animais foram pesados no início e semanalmente após o início do tratamento. O consumo de água e de ração foi avaliado a cada 48 horas.

A temperatura corporal e a glicemia em jejum foram investigadas no início e a cada 14 dias após o início do tratamento. A temperatura corporal foi determinada via anal, com auxílio de um termômetro digital lubrificado com vaselina. Já a glicemia foi determinada após um período de 3 horas de jejum dos animais, por meio de um pequeno corte na cauda e obtenção de uma amostra de sangue, seguido de dosagem em glicosímetro True Read® (NIPRO *Diagnostics*).

Também foram realizados no início e a cada 14 dias do experimento os testes de campo-aberto e *rota-rod* com o objetivo de avaliar níveis gerais de ansiedade e atividade motora nos camundongos.

No teste do campo aberto cada animal submetido ao estudo, após no mínimo 30 minutos da administração de NCZ, foi colocado no centro da arena e por cinco minutos foi realizada observação e registro do comportamento no que diz respeito ao número de levantamentos em duas patas (*rearing*), o número de quadrantes percorridos com as quatro patas (ambulação), o tempo de auto-limpeza (*grooming*) e o número de bolos fecais (SÁ et al., 2013).

O teste do *rota-rod* foi realizado um dia após a realização do teste do campo-aberto. Uma vez transcorridos pelo menos 30 minutos da administração de NCZ, os animais foram colocados nas barras giratórias e o tempo de permanência foi registrado, limitando-se as observações ao tempo máximo de três minutos por animal ou três reconduções à barra (NÓBREGA, 2012).

No 29º dia do experimento, após jejum de 6 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (2 mg/animal – i.p.) e amostras de sangue foram coletadas para a realização de análises bioquímicas (ureia, creatinina, AST e ALT) e hematológicas (eritrograma e leucograma), conforme descrito anteriormente (item 4.3.1). Em seguida os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os órgãos (coração, timo, baço, fígado e rins) foram extirpados, pesados para o cálculo do índice dos órgãos, e examinados macroscopicamente. Posteriormente

fígado e rins, dos animais submetidos ao tratamento com a maior dose, foram submetidos à análise histopatológica conforme descrito no item 4.3.1.

4.3.3 Avaliação da genotoxicidade

Para o ensaio do micronúcleo, um grupo de seis camundongos fêmeas foi tratado com NCZ, por via oral, na dose de 1600 mg/kg, e um segundo grupo de seis camundongos fêmeas recebeu NCZ, por via intraperitoneal, na dose de 240 mg/kg (ambas as doses equivalentes a 80% da DL50 estimada para a respectiva via de administração). Dois grupos controle (v.o. e i.p.) receberam solução salina e tween 80 à 5%. Um quinto grupo recebeu ciclofosfamida na dose de 50 mg/kg, via i.p., como controle positivo. Após 48 horas os animais foram anestesiados com tiopental sódico (2 mg/animal – i.p.) e amostras de sangue periférico foram coletadas pelo plexo orbital, para confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados (HAYASHI et al., 2007; RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

4.3.4 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE)

Células de CAE com cinco a sete dias de crescimento foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via intraperitoneal (0,5 mL - 2×10^6 células/mL) nos animais experimentais (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, NCZ foi solubilizado em Tween 80 5% e administrado diariamente por via intraperitoneal (i.p.) a grupos de seis animais, nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, por nove dias. O grupo controle foi tratado com uma solução a 5% de Tween 80 e um quinto grupo de animais foi tratado com 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich®), 25 mg/kg, como droga padrão.

4.3.4.1 Avaliação da massa tumoral, volume do tumor e total celular

Os animais tratados por nove dias, como descrito no item 4.3.4, foram eutanasiados, no dia seguinte à administração da última dose, para coleta do líquido ascítico da cavidade peritoneal e avaliação do volume do tumor, expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para contagem das células viáveis e não-viáveis pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Para tanto, foram incubados volumes semelhantes de líquido ascítico e de uma solução de 0,4% do corante, seguido de análise das células em câmara de Neubauer. Este ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluírem o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação dessas células (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993).

A massa do tumor foi determinada pela diferença dos pesos dos camundongos antes e depois da retirada do líquido ascítico e expressa em gramas (g). O total celular ($\times 10^7$ células) foi obtido como o produto do volume do tumor, expresso em mL, pela viabilidade celular, expressa como a quantidade de células $\times 10^6$ /mL.

4.3.4.2 Análise do ciclo celular

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por nove dias com NCZ conforme descrito no item 4.3.4. Um dia após a última administração, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e as células coletadas da cavidade peritoneal para análise do ciclo celular. As células foram então ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v) a fim de se obter uma concentração final de 1×10^6 células/mL. Em seguida, após centrifugação das suspensões celulares a 3000 rpm, por cinco minutos, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão foi homogeneizada. Foram adicionados 300 μ L da solução fluorocrômica hipotônica (HFS) [citrato de sódio 0,1% (p/v) e Triton X-100; 0,1% (p/v)] (Sigma-Aldrich® – T-8787, EUA), 50 μ g/mL de Iodeto de Propídeo (PI) e água ultrapura (Milli-Q, volume final = 50 mL). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra.

4.3.4.3 Avaliação do efeito antiangiogênico

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por nove dias com NCZ conforme descrito no item 4.3.4. Um dia após a última administração, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Após coleta das células tumorais, o peritônio foi cortado e o revestimento interior da cavidade peritoneal dos animais tratados com as doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg foi então examinado e fotografado para investigação da microdensidade vascular peritoneal, com o auxílio do software AVSOFT®. A microdensidade dos vasos foi determinada pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada (AGRAWAL et al., 2011).

4.3.4.4 Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal

Para a quantificação de citocinas, os animais foram divididos em grupos para implante das células de CAE e tratados conforme descrito no item 4.3.4. Após nove dias de tratamento, o líquido ascítico coletado da cavidade peritoneal dos animais foi centrifugado a 1200 rpm, por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado a – 20 °C para posterior dosagem das citocinas, por meio de ELISA, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

Resumidamente, placas de 96 poços (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-IL-1, anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-12, anti-TNF- α e anti-IFN- γ , diluídos em tampão fosfato, e incubadas *overnight* a 4 °C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO-USA) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de soro fetal bovino), por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ para a obtenção da curva. As placas foram novamente incubadas *overnight* a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo

de detecção biotinizado foi adicionado às placas que foram incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e então foi adicionado o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP). As placas foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em leitor de placa (Synergy HT, BioTek) a 450 nm. A quantidade de citocinas foi calculada a partir das curvas-padrão.

4.3.4.5 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com CAE e submetidos ao tratamento com NCZ

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com NCZ, os animais tratados por nove dias, como descrito no item 4.3.4, foram pesados no início e no final do tratamento (após a retirada do tumor) e diariamente foram avaliados os consumos de água e ração.

No dia seguinte após administração da última dose, após jejum de 6 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (2 mg/animal – i.p.) e amostras de sangue foram coletadas para a realização de análises bioquímicas (ureia, creatinina, AST e ALT) e hematológicas (eritrograma e leucograma), conforme descrito anteriormente (item 4.3.1).

Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os órgãos (coração, timo, baço, fígado e rins) foram extirpados e pesados para o cálculo do índice dos órgãos. Após a pesagem, os órgãos (fígado e rins) dos animais submetidos ao tratamento com a maior dose, foram submetidos à análise histopatológica conforme descrito no item 4.3.1.

4.4 Análise estatística

Os resultados obtidos nos estudos *in vivo* foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados empregando-se o teste *t-Student* não pareado, para análise de duas populações distintas, e teste de análise de variância

(ANOVA) *one-way*, para a comparação de mais de duas amostras, seguido do teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Para a determinação da concentração de citocinas os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e os dados analisados por Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

Após tratamento com dose única de NCZ (2000 mg/kg – v.o.) não foram observadas alterações comportamentais ou morte nos animais experimentais. No que diz respeito ao consumo de água e de ração, e evolução ponderal dos animais, os resultados são apresentados na Tabela 1. Pode-se observar uma diminuição significativa no consumo de ração do grupo tratado com NCZ ($48,1 \pm 5,1$ g; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($69,8 \pm 3,8$ g). No entanto, não foram observadas alterações significativas no consumo de água ou no peso dos animais (Tabela 1).

Tabela 1 - Consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com dose única (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	$59,3 \pm 3,6$	$69,8 \pm 3,8$	$29,2 \pm 0,5$	$32,6 \pm 0,4$
NCZ	2000	$55,4 \pm 2,8$	$48,1 \pm 5,1^a$	$29,3 \pm 0,5$	$32,0 \pm 1,1$

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de cinco animais, analisados por Teste T de Student. ^a $p < 0,05$ comparado ao controle.

Como apresentado na Tabela 2, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros bioquímicos dos animais tratados com NCZ quando comparados ao grupo controle. Também não foram observadas alterações significativas na maioria dos parâmetros hematológicos analisados. Foi observado apenas um aumento significativo na contagem total de leucócitos dos animais submetidos ao tratamento com NCZ ($6,6 \pm 0,7 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($3,7 \pm 0,7 \cdot 10^3/\text{mm}^3$) (Tabela 3).

Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos submetidos ao tratamento com dose única (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Parâmetros normais*	-	70 - 400	25 -100	15 - 40	0,2 - 0,6
Controle	-	87,5 ± 4,9	65,0 ± 7,0	53,2 ± 4,5	0,6 ± 0,0
NCZ	2000	95,3 ± 29,3	68,8 ± 4,9	56,0 ± 5,0	0,5 ± 0,1

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de cinco animais, analisados por Teste T de Student. *Parâmetros bioquímicos normais segundo GAD (2007).

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos submetidos ao tratamento com dose única (v.o.) de NCZ

Parâmetro	Parâmetros normais*	Controle	NCZ (2000 mg/kg)
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	9,0 – 11,5	9,0 ± 0,1	8,4 ± 0,6
Hemoglobina (g/dL)	14,5 – 17,5	15,0 ± 0,3	14,9 ± 1,2
Hematócrito (%)	45,0 – 57,0	48,7 ± 1,1	46,8 ± 3,8
VCM (fm ³)	45,0 – 55,0	53,8 ± 1,8	56,0 ± 1,4
HCM (pg)	13,0 – 16,0	16,6 ± 0,5	17,8 ± 0,4
CHCM (g/dL)	29,0 – 34,0	30,8 ± 0,4	34,0 ± 1,9
Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	1,0 – 12,0	3,7 ± 0,7	6,6 ± 0,7 ^a
Linfócitos	60 – 90	75,0 ± 2,5	67,8 ± 10,1
Segmentados	10 – 40	20,8 ± 2,4	28,4 ± 9,6
Monócitos	0 – 6	4,2 ± 0,6	3,6 ± 0,7
Eosinófilos	0 – 5	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de cinco animais, analisados por Teste T de Student. ^a*p* < 0,05 comparado ao controle. *Parâmetros hematológicos normais segundo GAD (2007).

No que diz respeito ao índice dos órgãos, não foram observadas alterações significativas (Tabela 4).

Tabela 4 – Índices dos órgãos de camundongos submetidos ao tratamento com dose única (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rim (mg/g)	Índice de coração (mg/g)
Controle	-	3,0 ± 0,3	6,0 ± 0,3	64,9 ± 1,3	12,2 ± 0,9	4,3 ± 0,2
NCZ	2000	3,5 ± 0,6	5,6 ± 0,7	60,4 ± 4,7	11,6 ± 0,8	4,5 ± 0,2

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de cinco animais, analisados por Teste T de Student.

A análise histopatológica mostrou que os rins dos animais tratados com NCZ apresentaram nefrite intersticial, focal, sem outras particularidades histológicas. Não foram observadas atipias celulares (Figura 3B).

Os fígados dos animais tratados com NCZ apresentaram um processo inflamatório portoparenquimatoso, com necrose lobular, multifocal, de provável natureza tóxica. Além disso, foram observados sinais de atividade regenerativa hepatocelular (reacional) e ausência de atipias celulares (Figura 3D, 3E e 3F).

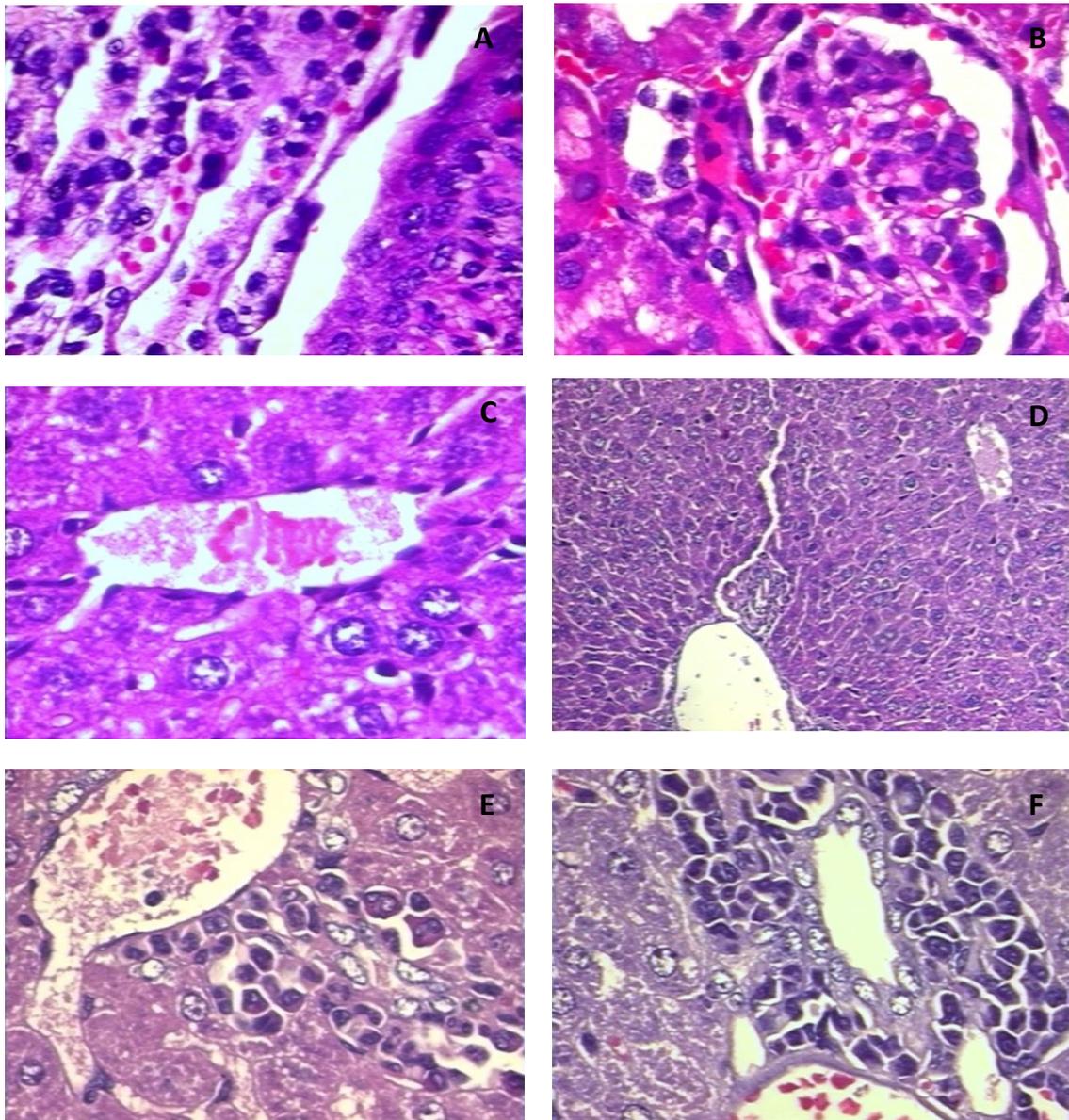


Figura 3 – Histopatologia dos rins e fígado de camundongos submetidos ao tratamento agudo (v.o.) com NCZ. A: Controle (rins). B: NCZ (rins). C: Controle (fígado). D, E, F: NCZ (fígado). Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson (100 x e 400 x).

Já no estudo de toxicidade aguda de NCZ por via intraperitoneal, iniciado com a dose de 300 mg/kg, os animais apresentaram piloereção nos primeiros 30 minutos após o tratamento, além de ptose, sedação e resposta ao toque diminuído, com este último sinal persistindo até 1 h após a administração de NCZ. Ao final dos 14 dias de observação foi contabilizada a morte de dois dos três animais submetidos ao tratamento. Dessa forma, de acordo com o Guia n. 423 da OECD (ANEXO B), um segundo grupo com mais três animais foi submetido ao tratamento intraperitoneal

com uma dose de 50 mg/kg de NCZ, os quais não apresentaram alterações comportamentais, ou mortes, após 14 dias do tratamento agudo. Por fim, o tratamento intraperitoneal com a dose de 50 mg/kg foi repetido com um terceiro grupo de três animais apresentando resultados semelhantes ao teste anterior. Portanto, a DL50 (dose letal 50%) foi estimada em 300 mg/kg e a amostra é classificada na categoria 3 da GHS.

5.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica de doses repetidas

Durante os 28 dias do ensaio de toxicidade de doses repetidas, foi registrada a morte de camundongos machos nas doses de 500 mg/kg e 1000 mg/kg (duas mortes em cada dose) e fêmeas nas doses de 250 mg/kg e 1000 mg/kg (uma morte em cada dose).

A tabela 5 apresenta o consumo de água e de ração bem como a evolução ponderal dos animais submetidos ao tratamento com doses repetidas (28 dias) de NCZ. Pode-se observar que houve uma diminuição significativa no consumo de ração por parte dos camundongos machos tratados com as doses de 500 mg/kg ($54,7 \pm 2,1$ g; $p < 0,05$) e 1000 mg/kg ($56,7 \pm 2,4$ g; $p < 0,05$) de NCZ em comparação com o controle ($69,5 \pm 0,7$ g).

Ainda, foi observado uma diminuição significativa no consumo de ração em todos os grupos de camundongos fêmeas tratados com NCZ ($60,3 \pm 1,8$ g; $63,2 \pm 2,1$ g; $56,2 \pm 3,1$ g para os grupos tratados com 250, 500 e 1000 mg/kg, respectivamente; $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($68,2 \pm 3,3$ g).

Também pode-se observar uma diminuição significativa no consumo de água por parte dos animais machos tratados com as doses de 500 mg/kg ($72,9 \pm 2,8$ mL; $p < 0,05$) e 1000 mg/kg ($65,8 \pm 2,3$ mL; $p < 0,05$) de NCZ, quando comparados ao grupo controle ($87,1 \pm 1,6$ mL). Não foram observadas alterações significativas na evolução ponderal dos animais.

Tabela 5 – Consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Gênero	Consumo de ração (g)	Consumo de água (mL)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	M	69,5 ± 0,7	87,1 ± 1,6	29,2 ± 0,9	37,7 ± 1,2
		F	68,2 ± 3,3	64,0 ± 1,9	30,9 ± 1,2	33,2 ± 0,7
NCZ	250	M	59,0 ± 2,1	76,5 ± 2,8	29,7 ± 0,6	38,4 ± 1,1
		F	60,3 ± 1,8 ^a	64,2 ± 1,9	27,9 ± 0,4	32,4 ± 1,3
NCZ	500	M	54,7 ± 2,1 ^{a,b}	72,9 ± 2,8 ^{a,b}	26,9 ± 0,8	41,7 ± 1,3
		F	63,2 ± 2,1 ^a	66,5 ± 2,1	30,3 ± 0,5	36,2 ± 0,6
NCZ	1000	M	56,7 ± 2,4 ^{a,b}	65,8 ± 2,3 ^{a,b}	28,3 ± 0,7	39,2 ± 1,2
		F	56,2 ± 3,1 ^{a,b,c}	69,8 ± 2,3	31,8 ± 0,3	35,8 ± 0,8

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez animais por gênero, analisados por ANOVA seguido por Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (250 mg/kg). ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (500 mg/kg).

A análise bioquímica dos animais submetidos ao estudo de doses repetidas revelou um aumento significativo na atividade enzimática de AST dos camundongos fêmeas tratados com as doses de 250 mg/kg ($249,9 \pm 14,4$ U/L; $p < 0,05$) e 1000 mg/kg ($272,8 \pm 18,8$ U/L; $p < 0,05$) de NCZ quando comparados ao grupo controle ($193,1 \pm 11,8$ U/L). Observa-se também um aumento significativo na atividade de ALT dos camundongos machos tratados com a dose de 1000 mg/kg ($174,6 \pm 6,7$ U/L; $p < 0,05$) de NCZ quando comparado ao grupo controle ($72,4 \pm 15,9$ U/L) (Tabela 6).

A avaliação da função renal revelou uma diminuição significativa da concentração sérica de ureia dos animais machos tratados com a dose de 1000 mg/kg ($38,8 \pm 1,7$ mg/dL; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($45,6 \pm 1,0$ mg/dL). Não foram observadas alterações significativas na concentração sérica de creatinina em nenhuma das doses testadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Gênero	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Parâmetros normais*	-	M	70 – 400	25 – 200	15 – 45	0,3 – 0,8
		F	70 – 400	25 – 100	15 – 40	0,2 – 0,6
Controle	-	M	229,0 ± 12,2	72,4 ± 15,9	45,6 ± 1,0	0,6 ± 0,07
		F	193,1 ± 11,8	174,0 ± 12,6	43,7 ± 2,1	0,6 ± 0,06
NCZ	250	M	225,4 ± 12,7	81,0 ± 6,1	44,7 ± 2,1	0,5 ± 0,04
		F	249,9 ± 14,4 ^a	194,8 ± 10,2	39,0 ± 2,4	0,6 ± 0,05
NCZ	500	M	221,3 ± 12,0	104,8 ± 19,7	42,6 ± 2,2	0,5 ± 0,04
		F	229,4 ± 13,5	177,2 ± 10,2	41,9 ± 2,2	0,6 ± 0,05
NCZ	1000	M	205,6 ± 7,5	174,6 ± 6,7 ^{a,b,c}	38,8 ± 1,7 ^a	0,4 ± 0,03
		F	272,8 ± 18,8 ^a	210,2 ± 16,1	42,7 ± 2,2	0,6 ± 0,07

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez animais por gênero, analisados por ANOVA seguido por Tukey. ^a*p* < 0,05 comparado ao grupo controle. ^b*p* < 0,05 comparado ao grupo NCZ (250 mg/kg). ^c*p* < 0,05 comparado ao grupo NCZ (500 mg/kg). *Parâmetros bioquímicos normais segundo GAD (2007).

Em relação aos parâmetros hematológicos, não foram evidenciadas alterações significativas nos grupos de camundongos machos submetidos aos tratamentos com doses repetidas de NCZ quando comparados ao grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7 – Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos machos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Parâmetro	Parâmetros normais*	Controle	NCZ		
			250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,0 – 11,3	9,1 ± 0,3	9,3 ± 0,3	9,6 ± 0,3	9,0 ± 0,2
Hemoglobina (g/dL)	13,5 – 17,0	15,1 ± 0,6	15,7 ± 0,4	15,8 ± 0,4	14,8 ± 0,4
Hematócrito (%)	45,0 – 55,0	50,3 ± 2,1	50,1 ± 2,1	51,4 ± 3,1	46,2 ± 1,8
VCM (fm^3)	47,0 – 55,0	55,0 ± 1,4	53,8 ± 1,5	53,1 ± 1,5	51,5 ± 1,7
HCM (pg)	13,0 – 16,0	16,6 ± 0,3	16,8 ± 0,6	16,5 ± 0,3	16,5 ± 0,4
CHCM (g/dL)	29,0 – 34,0	30,3 ± 0,8	31,5 ± 1,0	31,4 ± 1,3	32,1 ± 0,4
Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	2,0 – 10,0	7,9 ± 0,7	8,2 ± 0,5	10,1 ± 1,3	9,8 ± 0,8
Linfócitos	60 – 90	75,3 ± 1,0	74,2 ± 1,3	70,6 ± 2,6	81,9 ± 2,5 ^{b,c}
Segmentados	10 – 40	20,2 ± 1,1	19,6 ± 2,2	24,6 ± 2,3	14,8 ± 2,3 ^c
Monócitos	0 – 6	3,1 ± 0,3	2,9 ± 0,6	4,0 ± 0,6	3,3 ± 0,4
Eosinófilos	0 – 5	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,4 ± 0,2

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez animais por gênero analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (250 mg/kg). ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (500 mg/kg). *Parâmetros hematológicos normais segundo GAD (2007).

Já a análise hematológica dos camundongos fêmeas submetidos ao tratamento com doses repetidas de NCZ revelou um aumento significativo na contagem total de leucócitos nos animais tratados com as doses de 500 mg/kg ($9,8 \pm 0,6 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $p < 0,05$) e 1000 mg/kg ($10,1 \pm 1,1 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($7,2 \pm 0,5 \cdot 10^3/\text{mm}^3$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos fêmeas submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Parâmetro	Parâmetros normais*	Controle	NCZ		
			250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,0 – 11,5	9,2 ± 0,3	9,4 ± 0,2	9,2 ± 0,2	8,7 ± 0,3
Hemoglobina (g/dL)	14,5 – 17,5	15,9 ± 0,2	15,9 ± 0,3	15,7 ± 0,4	15,5 ± 0,4
Hematócrito (%)	45 – 57	51,0 ± 2,1	54,0 ± 1,8	51,3 ± 2,3	50,2 ± 1,8
VCM (fm^3)	45 – 55	55,8 ± 1,8	57,7 ± 1,2	55,7 ± 1,7	57,8 ± 1,3
HCM (pg)	13 – 16	17,5 ± 0,4	17,1 ± 0,3	17,1 ± 0,2	17,9 ± 0,4
CHCM (g/dL)	29 – 34	31,7 ± 1,3	29,7 ± 0,7	31,1 ± 1,0	31,2 ± 1,0
Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	1,0 – 12,0	7,2 ± 0,5	9,4 ± 0,6	9,8 ± 0,6 ^a	10,1 ± 1,1 ^a
Linfócitos	60 – 90	85,5 ± 1,8	82,6 ± 1,9	86,9 ± 1,0	81,6 ± 3,5
Segmentados	10 – 40	10,9 ± 1,4	14,7 ± 1,8	10,9 ± 1,0	15,9 ± 3,1
Monócitos	0 – 6	3,6 ± 0,7	2,8 ± 0,4	2,2 ± 0,4	2,6 ± 0,5
Eosinófilos	0 – 5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez por gênero animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. *Parâmetros hematológicos normais segundo GAD (2007).

A análise do índice dos órgãos dos animais submetidos ao estudo demonstrou uma diminuição significativa do índice do timo dos camundongos fêmeas submetidos ao tratamento com a dose de 1000 mg/kg de NCZ ($2,6 \pm 0,3$ mg/g; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($3,9 \pm 0,2$ mg/g) (Tabela 9).

Tabela 9 – Índices dos órgãos de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Gênero	Índice de	Índice de	Índice de	Índice de	Índice de
			coração (mg/g)	fígado (mg/g)	rins (mg/g)	timo (mg/g)	baço (mg/g)
Controle	-	M	3,8 ± 0,2	59,0 ± 2,0	11,4 ± 0,4	3,0 ± 0,2	5,5 ± 0,5
		F	4,1 ± 0,2	55,7 ± 1,6	11,7 ± 0,6	3,9 ± 0,2	5,5 ± 0,2
NCZ	250	M	3,6 ± 0,1	56,5 ± 1,6	11,2 ± 0,4	2,4 ± 0,2	4,4 ± 0,5
		F	4,2 ± 0,1	56,6 ± 2,2	11,2 ± 0,4	3,2 ± 0,2	6,3 ± 0,6
NCZ	500	M	4,2 ± 0,1	57,5 ± 1,5	12,1 ± 0,5	2,6 ± 0,3	4,8 ± 0,4
		F	4,1 ± 0,2	59,1 ± 1,4	11,0 ± 0,5	3,3 ± 0,3	5,1 ± 0,4
NCZ	1000	M	3,9 ± 0,2	52,6 ± 1,9	11,6 ± 0,3	2,9 ± 0,1	5,0 ± 0,8
		F	4,0 ± 0,2	58,8 ± 1,5	9,8 ± 1,1	2,6 ± 0,3 ^a	4,7 ± 0,4

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez animais por gênero analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao controle.

No que diz respeito à temperatura dos camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas de NCZ, não foram observadas alterações significativas desse parâmetro, nos períodos analisados, quando comparado ao grupo controle (Tabela 10).

Tabela 10 – Temperatura de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Gênero	Temperatura (°C)		
			Basal	14 dias	28 dias
Controle	-	M	35,6 ± 0,2	35,4 ± 0,4	36,7 ± 0,2
		F	35,4 ± 0,2	35,5 ± 0,4	36,5 ± 0,2
NCZ	250	M	34,8 ± 0,3	34,5 ± 0,5	36,6 ± 0,3
		F	35,3 ± 0,2	35,7 ± 0,3	36,9 ± 0,2
NCZ	500	M	35,5 ± 0,3	34,4 ± 0,4	36,5 ± 0,3
		F	35,7 ± 0,3	35,5 ± 0,4	37,0 ± 0,3
NCZ	1000	M	35,2 ± 0,2	33,8 ± 0,4	35,8 ± 0,2
		F	35,5 ± 0,2	34,4 ± 0,3	36,0 ± 0,5

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez animais por gênero analisados por ANOVA seguido de Tukey.

Também não foram observadas alterações significativas na glicemia dos animais, após 14 ou 28 dias de tratamento com NCZ quando comparado ao grupo controle (Tabela 11).

Tabela 11 – Glicemia de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Gênero	Glicemia (mg/dL)		
			Basal	14 dias	28 dias
Controle	-	M	153,5 ± 10,2	105,3 ± 6,4	113,0 ± 6,0
		F	160,7 ± 12,0	108,1 ± 5,9	98,8 ± 4,4
NCZ	250	M	176,0 ± 12,3	120,4 ± 7,9	113,9 ± 5,0
		F	148,8 ± 10,4	112,0 ± 7,4	100,8 ± 5,5
NCZ	500	M	168,7 ± 5,1	109,9 ± 14,9	91,0 ± 5,2
		F	155,9 ± 8,4	113,0 ± 5,3	91,5 ± 3,2
NCZ	1000	M	173,1 ± 8,3	139,6 ± 13,3	127,1 ± 11,3
		F	150,7 ± 6,6	101,1 ± 6,5	104,6 ± 9,3

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez animais por gênero analisado por ANOVA seguido de Tukey.

Da mesma forma, não foram observadas alterações significativas no tempo de permanência dos animais na barra giratória do aparelho de *rota-rod*, após 14 ou 28 dias de tratamento com NCZ, quando comparado ao tempo dos animais do grupo controle (Tabela 12).

Tabela 12 – Tempo de permanência na barra giratória (*rota-rod*) de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Gênero	Tempo de permanência na barra giratória (s)		
			Basal	14 dias	28 dias
Controle	-	M	180,0 ± 0,0	152,1 ± 18,3	165,6 ± 10,3
		F	180,0 ± 0,0	163,1 ± 12,8	168,4 ± 10,8
NCZ	250	M	180,0 ± 0,0	149,6 ± 16,3	163,1 ± 13,8
		F	177,4 ± 2,6	162,3 ± 11,9	159,3 ± 14,8
NCZ	500	M	176,2 ± 3,8	169,5 ± 10,5	161,8 ± 14,9
		F	177,0 ± 3,0	174,2 ± 2,8	171,9 ± 8,1
NCZ	1000	M	180,0 ± 0,0	161,4 ± 10,7	179,1 ± 0,9
		F	180,0 ± 0,0	161,3 ± 10,7	177,6 ± 1,3

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez animais por gênero analisado por ANOVA seguido de Tukey.

Já no teste do campo aberto, observou-se um aumento significativo na ambulação dos animais machos tratados com as doses de 500 mg/kg ($51,1 \pm 9,2$; $p < 0,05$) e 1000 mg/kg ($49,5 \pm 7,7$; $p < 0,05$) de NCZ quando comparado aos animais do grupo controle após 28 dias de tratamento com a amostra em estudo ($24,4 \pm 2,4$) (Tabela 13).

Tabela 13 – Ambulação no teste de campo aberto de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Gênero	Ambulação (nº de quadrantes)		
			Basal	14 dias	28 dias
Controle	-	M	47,2 ± 5,4	37,0 ± 3,5	24,4 ± 2,4
		F	35,2 ± 3,8	63,8 ± 4,8	75,8 ± 4,2
NCZ	250	M	29,5 ± 9,1	54,2 ± 8,8	21,3 ± 2,5
		F	40,4 ± 5,4	55,0 ± 4,6	58,9 ± 5,1
NCZ	500	M	54,5 ± 9,5	38,9 ± 10,9	51,1 ± 9,2 ^{a,b}
		F	33,6 ± 7,8	51,2 ± 7,0	65,4 ± 8,2
NCZ	1000	M	31,8 ± 3,0	63,9 ± 8,8	49,5 ± 7,7 ^{a,b}
		F	38,6 ± 3,9	57,4 ± 4,9	56,2 ± 5,2

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez animais por gênero analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (250 mg/kg).

Ainda no teste do campo aberto, também foi observado uma diminuição significativa no tempo de auto-limpeza dos camundongos machos após 28 dias de tratamento com 500 mg/kg de NCZ ($3,8 \pm 1,5$ s; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($15,8 \pm 3,7$ s) (Tabela 14).

Tabela 14 – Tempo de auto-limpeza no teste de campo-aberto de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Gênero	Auto-limpeza (s)		
			Basal	14 dias	28 dias
Controle	-	M	$4,0 \pm 1,9$	$17,0 \pm 4,1$	$15,8 \pm 3,7$
		F	$12,6 \pm 4,6$	$13,8 \pm 3,8$	$19,3 \pm 3,2$
NCZ	250	M	$5,2 \pm 1,7$	$22,3 \pm 5,4$	$14,6 \pm 3,8$
		F	$8,8 \pm 2,8$	$13,7 \pm 1,5$	$16,0 \pm 6,1$
NCZ	500	M	$8,2 \pm 1,8$	$17,8 \pm 3,7$	$3,8 \pm 1,5^a$
		F	$18,2 \pm 6,6$	$13,5 \pm 2,2$	$11,2 \pm 2,8$
NCZ	1000	M	$14,6 \pm 4,3$	$21,1 \pm 8,4$	$12,9 \pm 2,6$
		F	$15,6 \pm 4,0$	$11,8 \pm 2,6$	$14,2 \pm 2,2$

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de dez animais por gênero analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Os camundongos fêmeas por sua vez apresentaram uma diminuição significativa no número de levantamentos ($3,9 \pm 0,8$; $p < 0,05$), em comparação ao grupo controle ($9,5 \pm 1,6$), após 28 dias de tratamento com NCZ (1000 mg/kg) (Tabela 15).

Tabela 15 – Número de levantamentos em duas patas no teste de campo aberto de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Gênero	Levantamentos (n°)		
			Basal	14 dias	28 dias
Controle	-	M	6,6 ± 1,7	2,1 ± 1,3	3,7 ± 0,8
		F	3,4 ± 1,3	6,8 ± 1,9	9,5 ± 1,6
NCZ	250	M	1,4 ± 0,9	3,4 ± 1,5	2,6 ± 0,8
		F	5,8 ± 3,2	3,7 ± 0,7	4,1 ± 0,7
NCZ	500	M	7,2 ± 2,1	3,3 ± 1,4	8,6 ± 3,0
		F	4,4 ± 1,6	6,4 ± 1,5	5,4 ± 1,3
NCZ	1000	M	1,4 ± 0,5	2,8 ± 0,9	5,9 ± 2,2
		F	3,6 ± 2,2	5,3 ± 1,7	3,9 ± 0,8 ^a

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez animais por gênero analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Não foram observadas alterações significativas na taxa de defecação dos animais machos ou fêmeas submetidos ao tratamento com doses repetidas de NCZ quando comparados ao grupo controle (Tabela 16).

Tabela 16 – Número de bolos fecais no teste de campo aberto de camundongos submetidos ao tratamento com doses repetidas (v.o.) de NCZ

Grupos	Dose (mg/kg)	Gênero	Número de bolos fecais		
			Basal	14 dias	28 dias
Controle	-	M	4,8 ± 1,0	3,3 ± 0,6	3,0 ± 0,6
		F	4,0 ± 1,1	3,8 ± 0,4	3,7 ± 0,4
NCZ	250	M	1,8 ± 0,7	2,1 ± 0,5	3,3 ± 0,3
		F	1,2 ± 0,6	4,8 ± 0,9	3,2 ± 0,3
NCZ	500	M	3,4 ± 1,3	4,1 ± 0,8	3,8 ± 0,7
		F	4,2 ± 1,0	3,3 ± 0,7	2,8 ± 0,8
NCZ	1000	M	2,2 ± 0,9	2,9 ± 0,6	2,6 ± 0,7
		F	4,2 ± 1,2	2,8 ± 0,6	4,0 ± 0,7

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de dez animais por gênero analisado por ANOVA seguido de Tukey.

A histopatologia dos rins e fígado dos animais sobreviventes submetidos ao tratamento com doses repetidas de NCZ não revelou alterações significativas. Em

amostras de fígado de alguns animais foram observados apenas leves infiltrados inflamatórios, os quais não apresentam significado clínico relevante (Figura 4).

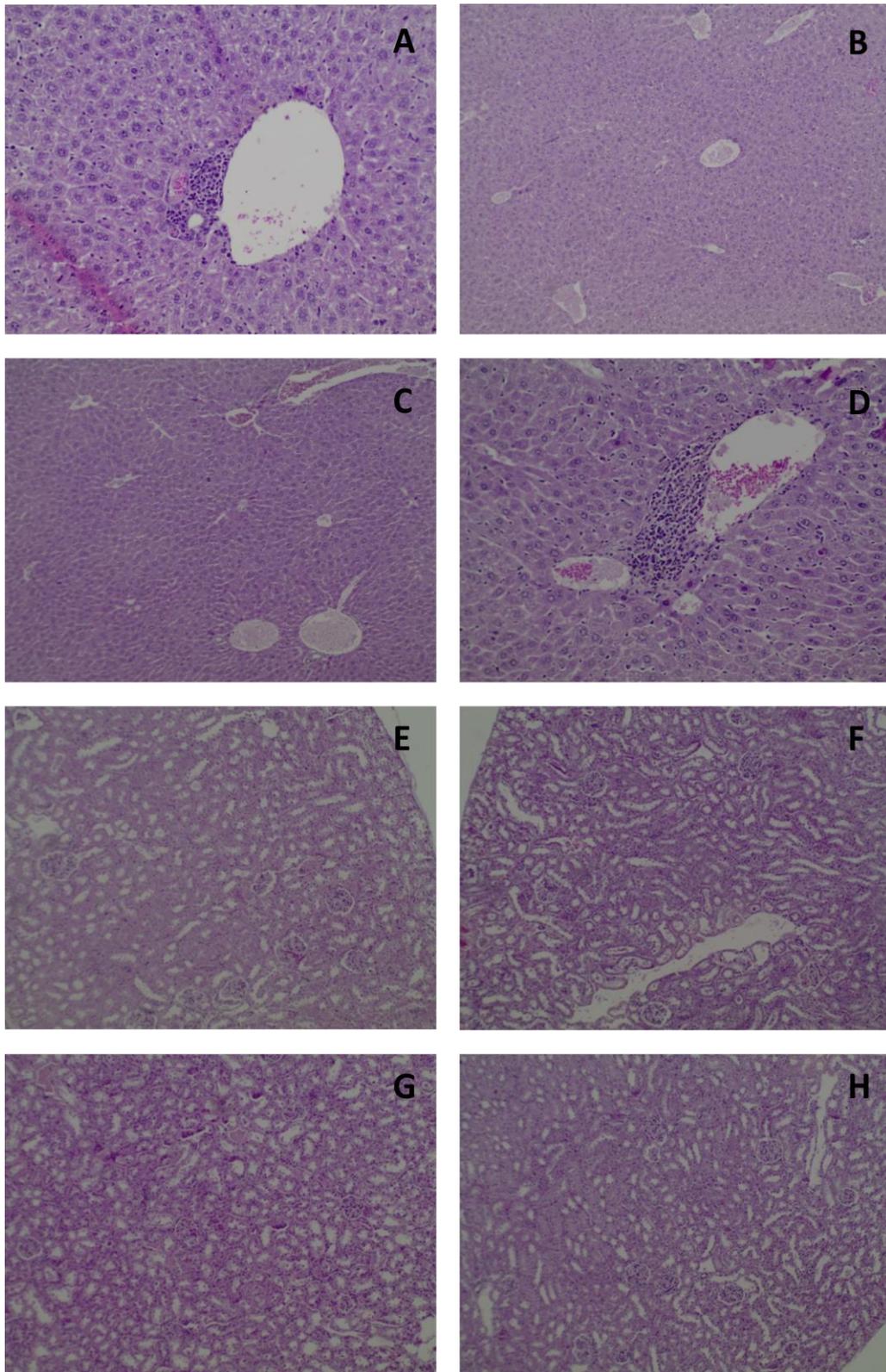


Figura 4 – Histopatologia do fígado e rins de camundongos submetidos ao tratamento de doses repetidas (v.o.) com NCZ. A: Controle machos (fígado). B: Controle fêmeas (fígado). C: NCZ 1000 mg/kg machos (fígado). D: NCZ 1000 mg/kg fêmeas (fígado). E: Controle machos (rins). F: Controle fêmeas (rins). G: NCZ 1000 mg/kg machos (rins). H: NCZ 1000 mg/kg fêmeas (rins). Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson (100 x e 400 x).

5.3 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar um possível efeito genotóxico *in vivo* de NCZ foi realizado o ensaio do micronúcleo, cujo resultado está apresentado na Tabela 17. O tratamento dos animais com NCZ, tanto pela via intraperitoneal, quanto pela via oral, não induziu um aumento na frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico quando comparados ao grupo controle (5% Tween 80).

Tabela 17 – Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com NCZ e ciclofosfamida

Grupos	Dose (mg/kg)	Via de administração	Células micronucleadas
Controle	-	i.p.	4,0 ± 0,5
Ciclofosfamida	50	i.p.	14,5 ± 2,6 ^a
NCZ	240	i.p.	3,2 ± 0,3
Controle	-	v.o.	4,4 ± 0,5
NCZ	1600	v.o.	3,0 ± 0,5

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado aos pares por teste T (Mann-Whitney). ^a $p < 0,05$ comparado ao controle (5 % Tween 80).

5.4 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de CAE

5.4.1 Avaliação da massa tumoral, volume do tumor e total celular

Camundongos transplantados com tumor ascítico de Ehrlich foram tratados via intraperitoneal com NCZ (10, 20 e 40 mg/kg), por nove dias, para avaliação do seu efeito antitumoral *in vivo*.

Foi observada significativa redução na massa tumoral nos animais tratados com a dose de 40 mg/kg de NCZ ($0,0 \pm 0,0$ g; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($7,7 \pm 0,3$ g).

O volume tumoral nos animais tratados com a dose de 40 mg/kg ($0,13 \pm 0,1$ mL; $p < 0,05$) e 20 mg/kg ($1,5 \pm 1,0$ mL; $p < 0,05$) também foi significativamente diminuído quando comparado aos animais do grupo controle ($8,4 \pm 1,4$ mL).

Além disso, também foi evidenciada uma diminuição significativa no total celular nos animais tratados com as doses de 40 mg/kg ($1,9 \pm 0,8 \times 10^7$ células; $p < 0,05$), 20 mg/kg ($11,7 \pm 5,9 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) e 10 mg/kg ($55,3 \pm 15,1 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($153,9 \pm 7,4 \times 10^7$ células).

Os animais tratados com 5-FU apresentaram significativa redução em todos os parâmetros avaliados (massa tumoral: $0,2 \pm 0,2$ g; volume tumoral: $0,01 \pm 0,01$ mL; total celular: $0,04 \pm 0,01 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) (Figura 4).

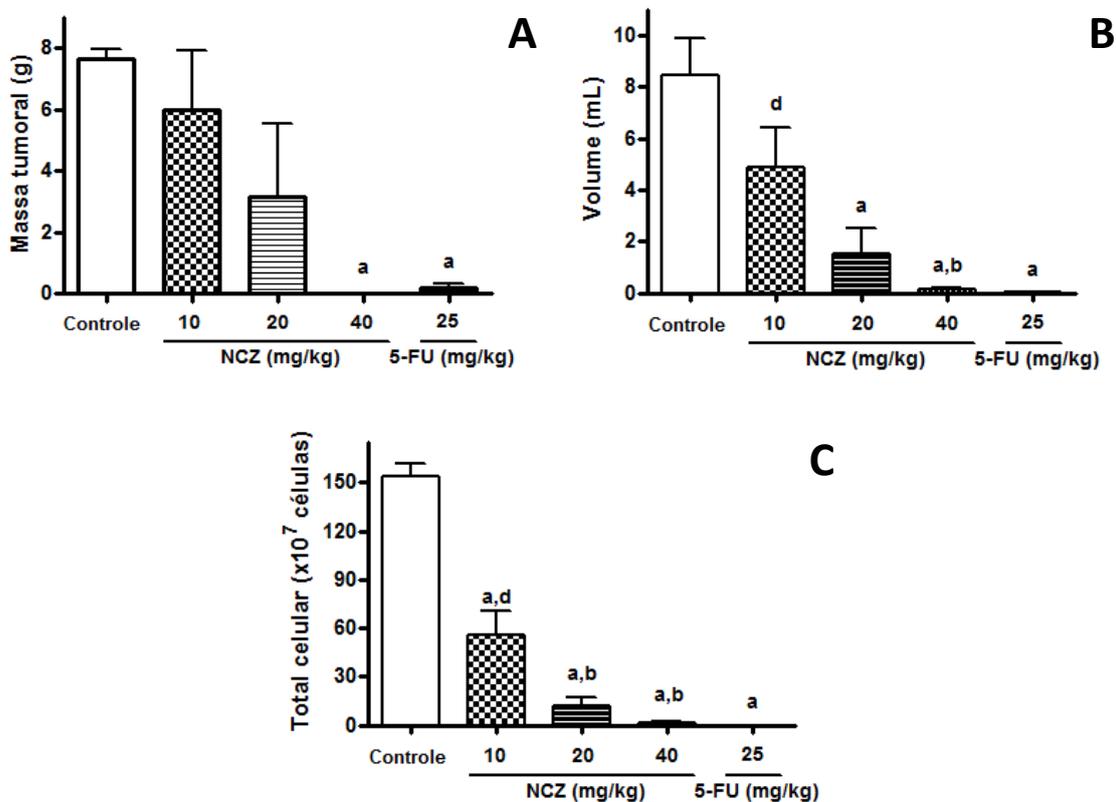


Figura 5 - Efeito do tratamento (i.p.) com NCZ e 5-FU em camundongos transplantados com CAE. A: massa tumoral. B: volume tumoral. C: total celular. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (10 mg/kg). ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.

5.4.2 Análise do ciclo celular

O tratamento de nove dias com NCZ induziu alterações significativas na distribuição das células de CAE nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 5). O tratamento com a dose de 20 mg/kg de NCZ levou a um aumento na percentagem

de células na fase G2/M (25,6%) com subsequente diminuição na percentagem de células na fase G0/G1 (29,3%) quando comparado ao grupo controle (18% e 48%, respectivamente). Já o tratamento com a dose de 40 mg/kg de NCZ levou a um aumento na percentagem de células na fase sub-G1 (29%) e uma diminuição da percentagem de células na fase G0/G1 (20%) quando comparado ao grupo controle (2% e 48%, respectivamente).

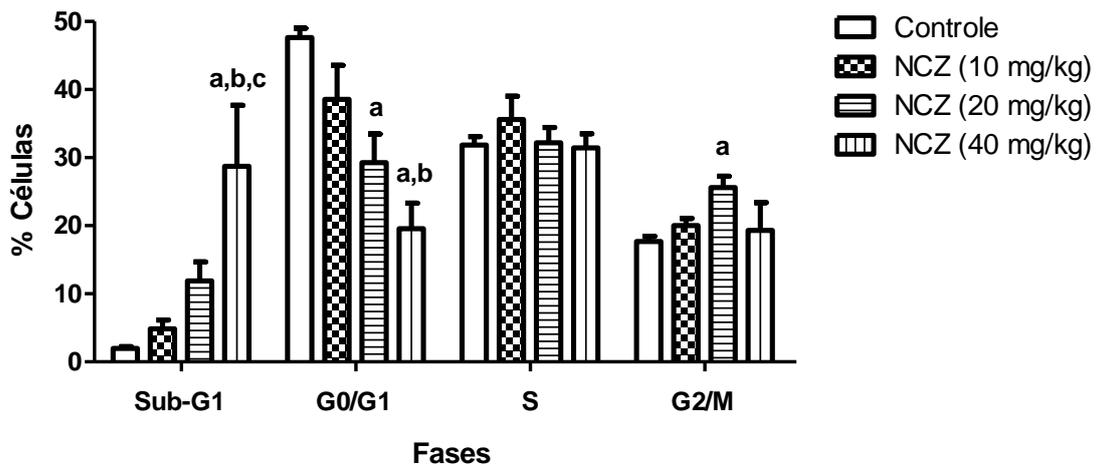


Figura 6 – Percentagem de células de CAE nas fases do ciclo celular após os diferentes tratamentos. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (10 mg/kg). ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (20 mg/kg).

5.4.3 Avaliação do efeito antiangiogênico

A microdensidade vascular peritoneal foi quantificada no grupo controle e nos grupos submetidos ao tratamento com NCZ nas doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg. Uma redução na microdensidade dos vasos foi observada nos grupos tratados com NCZ ($15,4 \pm 1,4\%$; $p < 0,05$ e $10,2 \pm 1,0\%$; $p < 0,05$ para as doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente), assim como no grupo tratado com a droga padrão 5-FU ($8,0 \pm 2,1\%$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($75,3 \pm 13,9\%$), não apresentando diferença significativa entre os grupos tratados com NCZ e o grupo tratado com 5-FU (Figura 7).

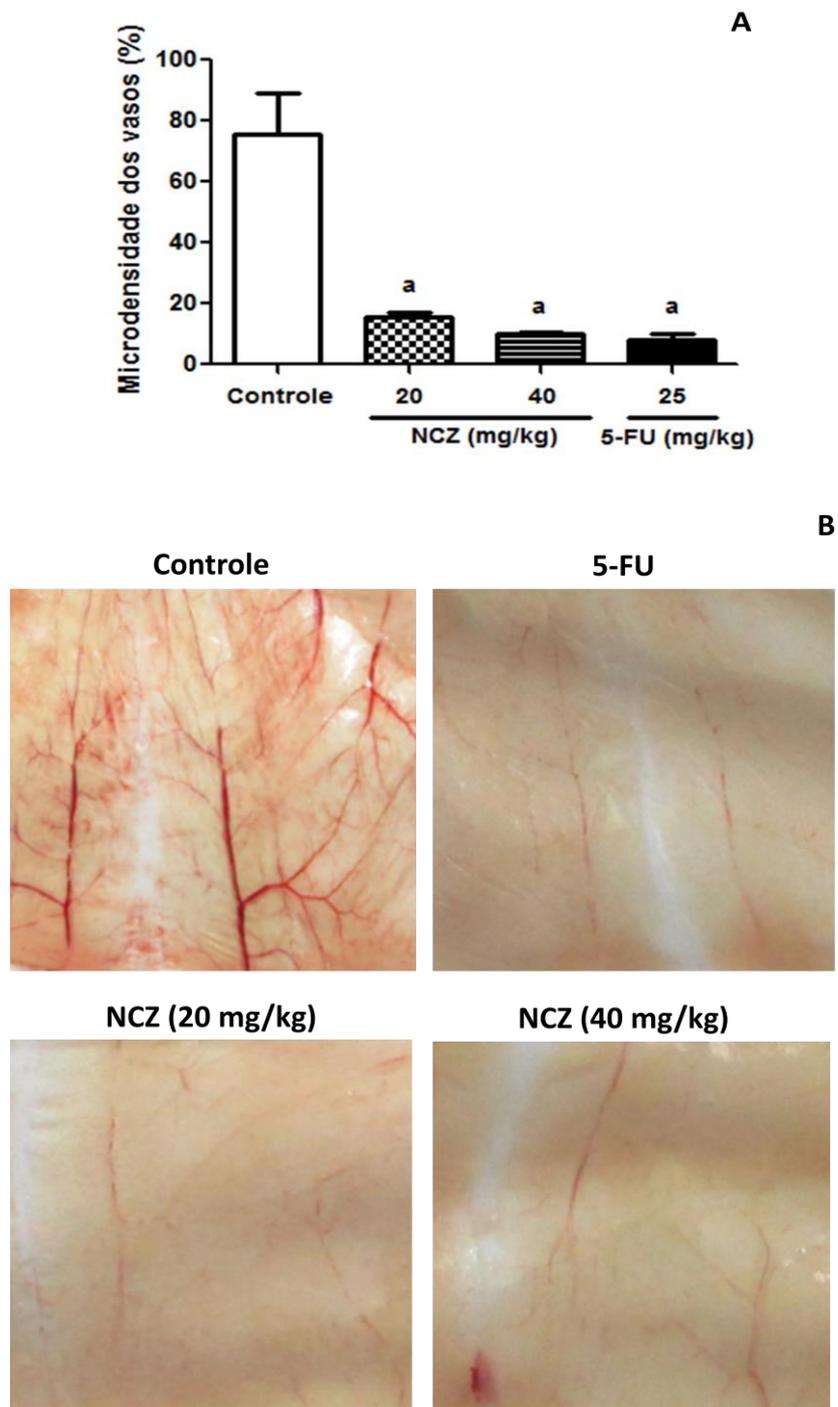


Figura 7 - Efeito do tratamento com NCZ e 5-FU na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com CAE. A: Microdensidade dos vasos. Determinado pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada. B: Membrana peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.4.4 Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal

A figura 8 apresenta os resultados da concentração de IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal de camundongos submetidos ao tratamento com as diferentes doses de NCZ e com a droga padrão (5-FU).

Pode-se observar um aumento significativo na concentração de IL-10 ($387,6 \pm 34,7$ pg/mL; $p < 0,05$), TNF- α ($111,2 \pm 9,8$ pg/mL; $p < 0,05$) e IFN- γ ($630,0 \pm 141,0$ pg/mL; $p < 0,05$) nos animais tratados com a dose de 20 mg/kg de NCZ, assim como um aumento de IL-1 ($95,1 \pm 14,6$ pg/mL; $p < 0,05$), TNF- α ($151,7 \pm 29,8$ pg/mL; $p < 0,05$) e IFN- γ ($1066,0 \pm 192,8$ pg/mL; $p < 0,05$) nos animais tratados com a dose de 40 mg/kg de NCZ, quando comparados aos animais do grupo controle ($13,2 \pm 1,3$ pg/mL; $219,1 \pm 7,3$ pg/mL; $45,9 \pm 3,6$ pg/mL; $161,7 \pm 41,8$ pg/mL para IL-1, IL-10, TNF- α e IFN- γ , respectivamente). Os animais tratados com 5-FU apresentaram uma diminuição significativa na concentração de IL-12 ($45,8 \pm 5,7$ pg/mL; $p < 0,05$) quando comparado ao controle ($73,2 \pm 6,2$ pg/mL).

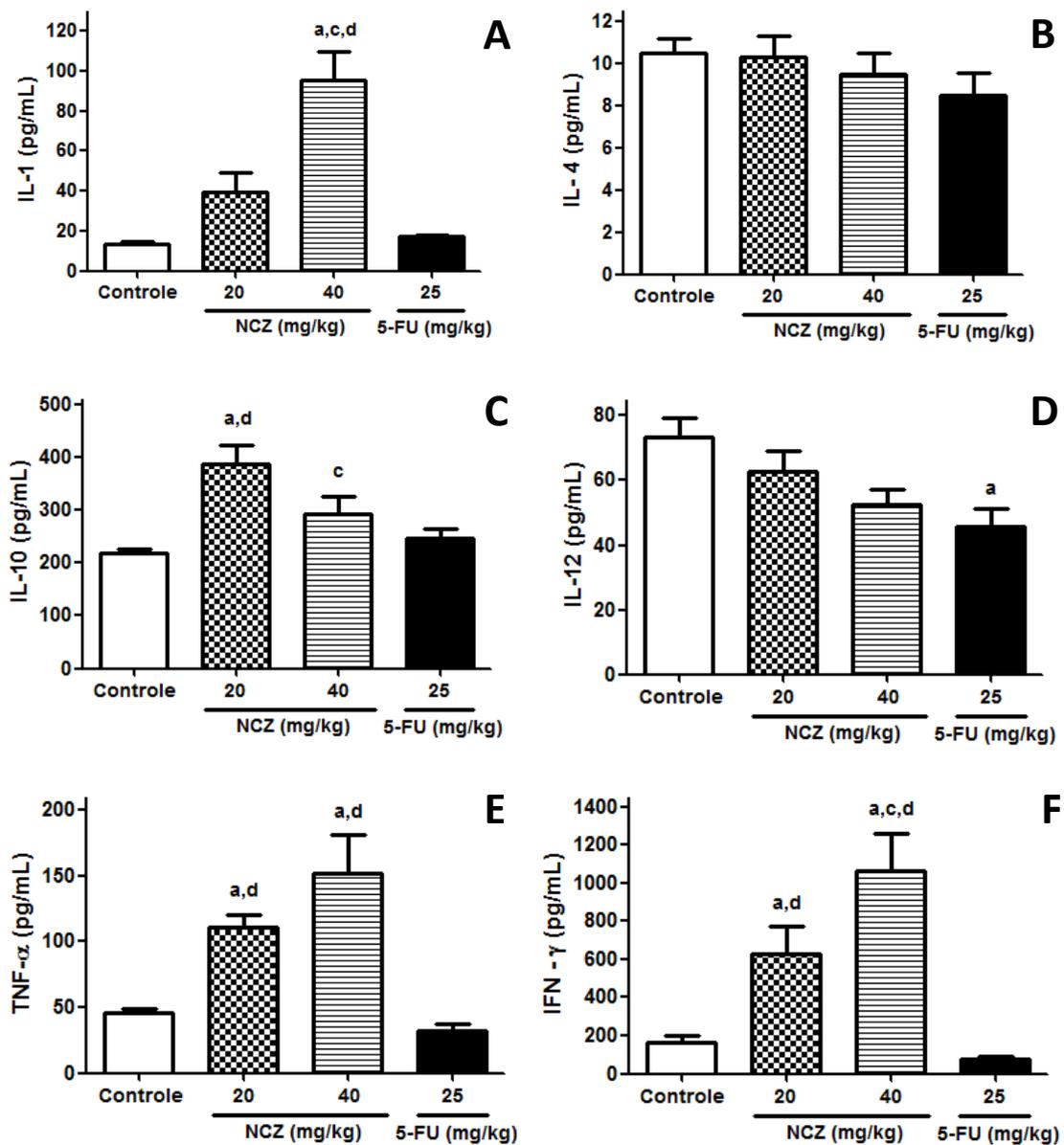


Figura 8 – Concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos. A: IL-1. B: IL-4. C: IL-10. D: IL-12. E: TNF- α . F: IFN- γ . Dados analisados por Kruskal-Wallis seguido de Dunns. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (20 mg/kg). ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.

5.4.5 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de CAE e submetidos ao tratamento com NCZ

Na tabela 18 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e de ração, avaliados durante os nove dias de tratamento com NCZ, bem como a evolução ponderal dos animais.

Tabela 18 – Consumo de água e ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	31,9 ± 2,3	55,7 ± 4,1	31,6 ± 0,6	31,9 ± 1,6
5-FU	25	30,0 ± 2,3	29,5 ± 1,5 ^a	30,3 ± 0,1	25,7 ± 1,2 ^a
NCZ	10	38,1 ± 1,6	34,3 ± 2,3	32,1 ± 0,4	31,8 ± 0,6
NCZ	20	38,1 ± 2,3	32,6 ± 1,1	31,2 ± 0,4	31,8 ± 1,4
NCZ	40	31,9 ± 2,3	28,4 ± 1,2 ^a	31,5 ± 0,8	30,4 ± 1,4

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

De acordo com os resultados obtidos observa-se que houve diminuição significativa do consumo de ração por parte dos animais tratados com a dose de 40 mg/kg de NCZ (28,4 ± 1,2 g; $p < 0,05$) e dos animais tratados com 5-FU (29,5 ± 1,5 g; $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle (55,7 ± 4,1 g). No entanto, essa alteração não foi acompanhada de diminuição significativa no peso dos animais tratados com a maior dose de NCZ, o que, pelo contrário, ocorreu no grupo tratado com a droga padrão (5-FU), cujos animais apresentaram diminuição significativa no peso ao final do tratamento (25,7 ± 1,2 g; $p < 0,05$), em comparação com o controle (31,9 ± 1,6 g). Em relação ao consumo de água não foram observadas alterações significativas em nenhum dos grupos experimentais.

A análise toxicológica dos efeitos de NCZ incluiu também a avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Observou-se um aumento significativo na atividade da ALT no grupo tratado com a dose de 40 mg/kg de NCZ (64,9 ± 6,3 U/L; $p < 0,05$), em comparação ao controle (37,1 ± 5,2 U/L) (Tabela 19).

Tabela 19 – Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Parâmetros normais*	-	70 – 400	25 – 100	15 – 40	0,2 – 0,6
Controle	-	205,6 ± 33,4	37,1 ± 5,2	60,1 ± 6,4	0,23 ± 0,03
5- FU	25	149,6 ± 12,0	31,3 ± 8,3	35,5 ± 4,8 ^a	0,51 ± 0,04 ^a
NCZ	10	159,9 ± 16,6	16,7 ± 4,3 ^d	49,0 ± 8,8	0,29 ± 0,02 ^d
NCZ	20	163,5 ± 7,5	41,3 ± 3,7 ^b	32,4 ± 2,7 ^a	0,49 ± 0,03 ^{a,b}
NCZ	40	206,4 ± 16,5	64,9 ± 6,3 ^{a,b,c,d}	33,9 ± 3,1 ^a	0,59 ± 0,07 ^{a,b}

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (10 mg/kg). ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo NCZ (20 mg/kg). ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU. *Parâmetros bioquímicos normais segundo GAD (2007).

Em relação à função renal, foi observada uma diminuição significativa na concentração sérica de ureia nos grupos tratados com as doses de 20 mg/kg (32,4 ± 2,7 mg/dL; $p < 0,05$) e 40 mg/kg (33,9 ± 3,1 mg/dL; $p < 0,05$) de NCZ quando comparado ao grupo controle (60,1 ± 6,4 mg/dL). Foi observado também um aumento significativo na concentração sérica de creatinina nos animais tratados com as doses de 20 mg/kg (0,49 ± 0,03 mg/dL; $p < 0,05$) e 40 mg/kg (0,59 ± 0,07 mg/dL; $p < 0,05$) de NCZ, assim como nos animais tratados com o 5-FU (0,51 ± 0,04 mg/dL; $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle (0,23 ± 0,03 mg/dL) (Tabela 19).

No que diz respeito à avaliação hematológica não foram observadas alterações significantes na contagem total de hemácias, na concentração de hemoglobina e nos valores do hematócrito dos grupos tratados com NCZ quando comparados ao grupo controle (Tabela 20).

Tabela 20 – Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos

Parâmetro	Parâmetros normais*	Controle	5-FU	NCZ		
				10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	9,0 – 11,5	7,5 ± 0,3	7,1 ± 0,7	7,1 ± 0,3	6,1 ± 0,6	6,5 ± 0,3
Hemoglobina (g/dL)	14,5 – 17,5	13,6 ± 0,4	13,5 ± 1,1	13,9 ± 0,8	12,7 ± 0,7	13,7 ± 0,3
Hematócrito (%)	45,0 – 57,0	33,7 ± 2,4	34,6 ± 4,1	33,8 ± 1,7	29,9 ± 3,1	28,7 ± 1,9
VCM (fm ³)	45,0 – 55,0	44,8 ± 1,4	48,7 ± 1,3	47,8 ± 1,9	49,5 ± 1,6	44,5 ± 1,7
HCM (pg)	13,0 – 16,0	18,3 ± 0,5	19,4 ± 0,5	19,6 ± 0,6	20,8 ± 0,6 ^a	21,4 ± 0,6 ^a
CHCM (g/dL)	29,0 – 34,0	41,1 ± 1,9	40,0 ± 1,5	41,1 ± 1,3	44,1 ± 3,1	48,5 ± 2,6
Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	1,0 – 12,0	8,9 ± 1,6	3,7 ± 0,6	13,0 ± 2,0 ^d	8,1 ± 1,1	14,4 ± 2,5 ^d
Linfócitos	60 – 90	52,7 ± 6,1	86,5 ± 2,0 ^a	44,8 ± 7,3 ^d	52,7 ± 7,2 ^d	55,0 ± 7,7 ^d
Segmentados	10 – 40	44,0 ± 5,9	10,1 ± 1,6 ^a	51,5 ± 6,9 ^d	43,5 ± 7,3 ^d	41,7 ± 7,4 ^d
Monócitos	0 – 6	3,2 ± 0,5	2,7 ± 0,6	3,5 ± 0,6	3,2 ± 0,3	3,0 ± 0,9
Eosinófilos	0 – 5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.

*Parâmetros hematológicos normais segundo GAD (2007).

Também não foram observadas alterações no Volume Corpuscular Médio (VCM) e na Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM) das hemácias. No entanto, a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) aumentou significativamente nos grupos tratados com as doses de 20 mg/kg (20,8 ± 0,6 pg; $p < 0,05$) e 40 mg/kg (21,4 ± 0,6 pg; $p < 0,05$) de NCZ, quando comparados ao grupo controle (18,3 ± 0,5 pg) (Tabela 20).

Em relação à contagem total de leucócitos, não foram observadas alterações significativas nos grupos tratados com NCZ ou no grupo tratado com a droga padrão (5-FU) (Tabela 20).

Na contagem diferencial de leucócitos, não foram observadas alterações significativas nos grupos tratados com NCZ. Já o grupo tratado com o 5-FU apresentou um aumento significativo na percentagem de linfócitos (86,5 ± 2,0%; $p < 0,05$) e diminuição significativa na percentagem de neutrófilos (10,1 ± 1,6%;

$p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($52,7 \pm 6,1$ e $44,0 \pm 5,9\%$, respectivamente) (Tabela 20).

O tratamento com as diferentes doses de NCZ não resultou em alterações significativas nos índices dos órgãos quando comparados ao grupo controle (Tabela 21).

Tabela 21 – Índices dos órgãos de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)
Controle	-	$3,8 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,7$	$64,9 \pm 2,5$	$10,4 \pm 0,7$
5-FU	25	$4,7 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,6$	$5,4 \pm 0,5$	$58,0 \pm 2,1$	$12,5 \pm 0,6$
NCZ	10	$4,0 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,7$	$7,1 \pm 0,7$	$67,7 \pm 4,4$	$11,2 \pm 0,7$
NCZ	20	$4,3 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,5$	$5,6 \pm 1,0$	$63,4 \pm 4,5$	$11,4 \pm 1,0$
NCZ	40	$4,5 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,6$	$5,8 \pm 1,0$	$54,5 \pm 4,3$	$11,2 \pm 0,4$

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido de Tukey.

A histopatologia dos rins e fígado dos animais transplantados com CAE submetidos ao tratamento com NCZ não revelou alterações significativas. Em alguns animais foram observados no fígado apenas leves infiltrados inflamatórios, os quais não apresentam significado clínico relevante (Figura 9).

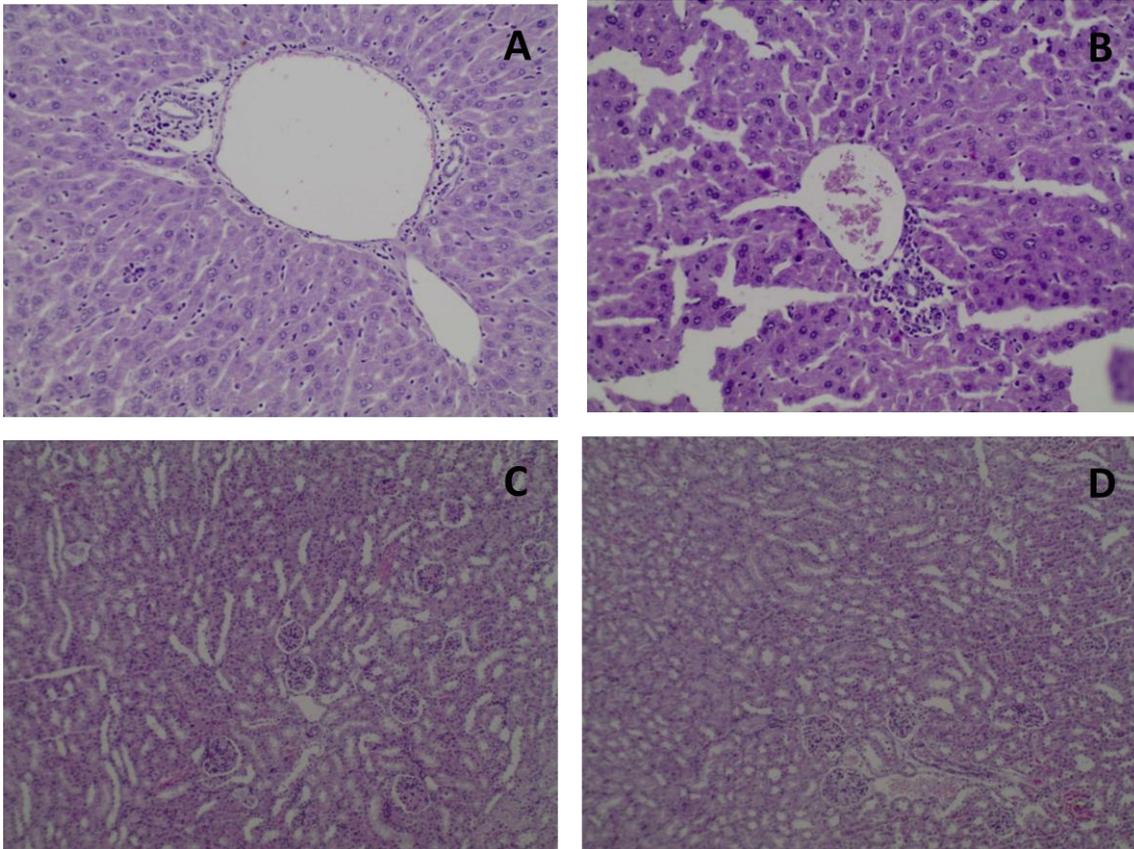


Figura 9 – Histopatologia do fígado e rins de camundongos submetidos ao tratamento antitumoral com NCZ. A: Controle (fígado). B: NCZ 40 mg/kg (fígado). C: Controle (rins). D: NCZ 40 mg/kg (rins). Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson (100 x e 400 x).

Discussão

6 DISCUSSÃO

Para investigar a segurança de drogas para uso humano, avaliações toxicológicas são sempre realizadas em animais experimentais, com o objetivo de investigar uma potencial toxicidade e prover informações sobre doses seguras a serem utilizadas em humanos (IMINJAN, 2014).

Assim, considerando a proposta de uso humano das nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco (NCZ) na odontologia, como cimento para restaurações, a avaliação de sua possível toxicidade é imprescindível na determinação da segurança de seu uso. Essa preparação vem sendo estudada no Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO) da UFPB e mostrou significativa atividade antimicrobiana (SANTOS, 2013).

A fim de se investigar o efeito da administração, por via oral, de uma alta dose de NCZ em um curto intervalo de tempo, mimetizando intoxicações agudas pela amostra, foi realizado o estudo de toxicidade pré-clínica aguda em camundongos.

Com base nos resultados obtidos, NCZ apresentou uma baixa toxicidade nas condições experimentais avaliadas. Essa informação é corroborada pelo fato de que a maior parte dos parâmetros avaliados não apresentou alteração significativa. Uma diminuição no consumo de ração foi observada, no entanto, não foi capaz de provocar alterações significativas na evolução ponderal dos animais mesmo após 14 dias de observação. Também foi observado um aumento significativo na contagem total de leucócitos, células que tem por função o combate e a eliminação de microrganismos e estruturas estranhas ao organismo, no entanto, apesar da diferença apresentada entre grupo controle e tratado, o número total de leucócitos se manteve dentro dos parâmetros considerados normais para camundongos (EVANS, 2009). No que diz respeito às alterações observadas nas análises histopatológicas de fígado e rins, as mesmas são descritas na literatura como sinais de fraca toxicidade na qual a retirada da droga ou ajuste de dose geralmente conduz a uma rápida melhora e reversão dos danos (MONTENEGRO et al., 2008; VASCONCELLOS et al., 2007).

Posteriormente, com o objetivo de avaliar o efeito da administração, por via oral, de pequenas doses de NCZ, em um intervalo de tempo maior, mimetizando uma intoxicação subcrônica pela substância, foi realizado o estudo de toxicidade pré-clínica de doses repetidas (28 dias).

Foram observadas alterações no consumo de água e de ração após o tratamento de doses repetidas com NCZ, o que fornece indícios de toxicidade sistêmica. Porém, apesar da redução significativa observada nesses parâmetros, os mesmos não foram capazes de provocar alterações significativas na evolução ponderal dos animais mesmo após 28 dias de tratamento.

O fígado é o maior e mais complexo dos órgãos internos. Está envolvido com a síntese de proteínas plasmáticas, lipídios e lipoproteínas, mas também tem função na reserva de energia, síntese de vários hormônios e, principalmente, é o órgão onde ocorre o metabolismo das drogas lipossolúveis, bem como de outros compostos potencialmente tóxicos (HENRY, 2008).

Inúmeras enzimas são clinicamente úteis para o reconhecimento e monitoramento de determinados processos patológicos, e a atividade de duas enzimas em especial são de extrema importância para avaliação da função hepática, a aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT). Os hepatócitos contêm concentrações elevadas dessas enzimas. Em casos de lesão hepática, as mesmas extravasam para o plasma permitindo o diagnóstico e monitoramento da lesão (HENRY, 2008).

No entanto, apesar da AST ser encontrada em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias das células hepáticas, ela também é encontrada no músculo esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos. Quando qualquer um desses tecidos é danificado, a AST é liberada no sangue. Como não há um método laboratorial para saber qual a origem da AST encontrada no sangue, o diagnóstico da causa do seu aumento deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada. Já a ALT é encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma dos hepatócitos, o que torna o seu aumento mais específico de lesão hepática (JORGE, 2006).

A administração de NCZ resultou em um aumento significativo da atividade da ALT no grupo de animais machos que recebeu a dose de 1000 mg/kg, sugerindo a ocorrência de uma toxicidade hepática, induzida pela amostra em estudo. Ainda, uma toxicidade possivelmente hepática também foi observada nos animais fêmeas que receberam as doses de 250 mg/kg e 1000 mg/kg, evidenciada pelo aumento da AST, mas que não pode ser confirmada pois não foi observado aumento da ALT. Essa característica, no entanto, não se trata de um fator limitante para sua utilização clínica, uma vez que diversos medicamentos disponíveis no mercado, e amplamente

utilizados pela população, são capazes de causar algum grau de hepatotoxicidade, com elevação dos níveis de AST e ALT, como é o caso do paracetamol, cetoconazol, isotretinoína, fenitoína, dentre outros (HAYASHI; FONTANA, 2014).

A avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de ureia e creatinina. A ureia é um produto de degradação do metabolismo dos aminoácidos, constitui a forma como o organismo elimina o nitrogênio dessas moléculas, e sua eliminação se dá principalmente através dos rins. A creatinina é um produto da degradação da creatina muscular. Essa substância não é utilizada pelo organismo, é totalmente inativa, sendo também excretada pelos rins (PEREIRA, 1998).

Quando ocorre falha renal, produtos de degradação do metabolismo, que seriam eliminados pelos rins, particularmente substâncias nitrogenadas como a ureia e a creatinina, se acumulam levando a um aumento dos seus níveis sanguíneos. Já valores reduzidos de ureia podem ser ocasionados por uma nutrição deficiente ou por uma diminuição na taxa de síntese, como no caso das hepatopatias (HENRY, 2008).

O tratamento com NCZ levou a uma diminuição significativa da concentração sérica de ureia nos animais machos que receberam a dose de 1000 mg/kg, esta diminuição pode estar relacionada à toxicidade hepática observada nesse grupo, evidenciada pelos valores elevados de ALT, resultando na diminuição da síntese deste composto nitrogenado.

A biodisponibilidade e a toxicidade das drogas envolvem as complexas interações de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, fazendo com que as células sanguíneas fiquem expostas a essas drogas e seus metabólitos. O sangue é um dos maiores órgãos do corpo. Ele pode ser dividido em três elementos: eritrócitos (hemácias), leucócitos e trombócitos (plaquetas). Dessa forma, as análises de desordens hematológicas são realizadas com foco nesses grupos celulares (EVANS, 2009).

Não foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos dos camundongos machos tratados com NCZ, assim como na maioria dos parâmetros hematológicos dos camundongos fêmeas, a exceção ficou na contagem total de leucócitos que se apresentou significativamente maior nos camundongos fêmeas que receberam as doses de 500 e 1000 mg/kg, corroborando com os resultados do teste de toxicidade aguda. No entanto, apesar do aumento significativo desse

parâmetro, os valores permaneceram dentro dos parâmetros considerados normais para camundongos.

Em estudos toxicológicos, a comparação do peso dos órgãos entre grupos de animais tratados e não tratados com a substância teste tem sido convencionalmente usada como parâmetro de avaliação de efeitos tóxicos (MICHAEL, 2007). Nesse contexto, o baço e o timo são órgãos com funções importantes no sistema imunológico que geralmente são susceptíveis à ação de várias drogas.

No estudo de doses repetidas com NCZ foi possível observar uma diminuição significativa do índice do timo dos camundongos fêmeas submetidos ao tratamento com a dose de 1000 mg/kg. Esse fato pode estar relacionado a uma atrofia do timo que é observada em camundongos jovens em resposta a uma variedade de injúrias tóxicas, que podem ser reversíveis após a remoção do agente causador (GAD, 2007).

O “Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”, desenvolvido pela ANVISA, descreve estudos e parâmetros essenciais na avaliação da segurança farmacológica de novas drogas, permitindo a investigação de efeitos indesejáveis nas funções fisiológicas dos diversos sistemas orgânicos (ANVISA, 2013). Dentre os parâmetros citados no guia como de interesse nessa avaliação está a temperatura corporal.

O tratamento com doses repetidas de NCZ não foi capaz de provocar alterações significativas na temperatura corporal dos camundongos, não evidenciando, portanto, efeitos sobre o metabolismo geral.

O sistema endócrino desempenha um papel importante na regulação de funções fisiológicas. Alguns órgãos participantes desse sistema são vulneráveis a xenobióticos, levando à toxicidade e comprometimento funcional dos mesmos (EVANS, 2005). É o caso do pâncreas, que é o órgão responsável pela produção de insulina, um hormônio com importantes funções, incluindo o controle da glicemia, metabolismo de carboidratos, síntese de proteína e armazenamento de lipídios. Nesse contexto, um dos parâmetros frequentemente monitorados em um estudo de doses repetidas é a determinação da glicemia. Alterações do metabolismo da glicose podem ser evidenciadas em consequência de toxicidade, ocasionando prejuízo a diferentes órgãos (EVANS, 2005; FONSECA; DAVIDSOBN, 2006).

A administração de NCZ por 28 dias não foi capaz de provocar alterações significativas na glicemia dos animais, não demonstrando, portanto, influência tóxica sobre o mecanismo regulador hormonal do pâncreas.

Dentre as observações de interesse para a avaliação da segurança farmacológica de novas drogas incluem-se ainda aquelas relacionadas à investigação de toxicidade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) (ANVISA, 2013). Diversas drogas são capazes de interferir no funcionamento desse sistema produzindo deficiência psicomotora ou atividade depressora (SÁ et al., 2013). Dessa forma, com o objetivo de investigar possíveis alterações sobre o SNC decorrentes da utilização de NCZ, realizaram-se os testes de *rota-rod* e campo aberto nos animais em estudo.

Não foi observada alteração significativa no tempo de permanência dos camundongos na barra giratória do aparelho de *rota-rod*, não evidenciando, portanto, influência de NCZ na atividade motora dos animais.

No teste do campo aberto a administração repetida de NCZ aos animais induziu um efeito depressor/ansiolítico sobre o SNC demonstrado pela diminuição do tempo de auto-limpeza (camundongos machos tratados com a dose de 500 mg/kg) e uma diminuição no número de levantamentos (camundongos fêmeas tratados com a dose de 1000 mg/kg). Entretanto, foi observada uma resposta aparentemente oposta no parâmetro ambulação, cujo aumento foi demonstrado no grupo de animais machos que receberam as doses de 500 mg/kg e 1000 mg/kg de NCZ. No entanto, a correlação esperada entre atividade ansiolítica e diminuição da ambulação nem sempre pode ser evidenciada, uma vez que o tratamento com a droga pode causar alterações na atividade locomotora por mecanismos que não envolvem ansiedade. A literatura relata que o parâmetro ambulação no teste do campo aberto pode sofrer influência de outros efeitos da droga, que não o ansiolítico/ansio gênico, tornando-o não definitivo para determinação de ansiedade na investigação psicofarmacológica (LISTER, 1990).

Na análise histopatológica do fígado e rins dos animais submetidos ao estudo de doses repetidas não foram observadas alterações significativas, não evidenciando, portanto, toxicidade em nível tecidual, corroborando com os resultados encontrados no estudo de toxicidade aguda.

As propriedades específicas das nanopartículas, como grande capacidade de penetração, grande área de superfície, reatividade química, dentre outras, as torna

atrativas em tecnologias medicinais, porém, pouco se sabe do potencial genotóxico dessas substâncias. A literatura, inclusive, já relata casos de nanopartículas capazes de induzir danos ao DNA (DELMONT, 2013). Dessa forma, com a finalidade de se investigar o potencial genotóxico *in vivo* de NCZ foi realizado o ensaio do micronúcleo em sangue periférico. Este ensaio é útil para a investigação de compostos com atividade clastogênica (indução de quebra cromossômica) ou aneugênica (indução de perda de cromossomos inteiros).

O tratamento com NCZ não provocou um aumento significativo na frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico dos animais tratados, sugerindo que o mesmo não possui efeito genotóxico (clastogênico e/ou aneugênico) *in vivo*, característica importante para sua aplicabilidade na terapêutica.

O potencial para a aplicação da nanotecnologia na medicina, em especial na área oncológica, é muito vasto, uma vez que nanopartículas podem apresentar várias vantagens e funções quando comparadas às moléculas de fármacos convencionais. Além da atividade antitumoral por si só, as nanopartículas podem ser utilizadas em terapias especificamente direcionadas às células tumorais, ocasionando menos efeitos adversos ao paciente, ou utilizadas como sistemas de liberação controlada de antineoplásicos, também com o objetivo de reduzir a toxicidade da droga, bem como de vencer a resistência aos medicamentos. Podem ainda funcionar como marcadores tumorais, permitindo uma capacidade aumentada de visualização de células cancerosas, levando a um diagnóstico precoce, e permitindo uma monitorização da eficácia do tratamento, controle do aparecimento de metástases ou tumor(es) recorrente(s) (INPI, 2011).

Com o objetivo de avaliar doses seguras a serem utilizadas no ensaio de avaliação da atividade antitumoral de NCZ, foi realizado o ensaio de toxicidade pré-clínica aguda por via intraperitoneal. A DL50 (i.p.) estimada em torno de 300 mg/kg permitiu a escolha das doses de 10, 20 e 40 mg/kg para avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, considerando os vários trabalhos na literatura que associam nanopartículas de óxido de cério à atividade antitumoral (ALILI et al., 2011; ALILI et al., 2013; CHENG et al., 2013; GIRI et al., 2013; SACK et al., 2014; ZHANG et al., 2014; WASON et al., 2013).

Após nove dias de tratamento, NCZ apresentou significativa atividade antitumoral em todas as doses testadas, com a dose de 40 mg/kg apresentando efeito semelhante em reduzir a massa tumoral, volume tumoral e total celular

quando comparado ao antineoplásico 5-FU (25 mg/kg). O 5-FU é um antineoplásico amplamente utilizado na clínica médica possuindo importante papel no tratamento do câncer de cólon, mama, cabeça e pescoço (PETERS; KÖHNE, 1999). Esse fármaco trata-se de uma uracila fluorada, em que o átomo de hidrogênio da posição 5 foi substituído pelo átomo de flúor. O efeito antitumoral ocorre após conversão *in vivo* do mesmo em 5-monofosfato de 5-flúor 2'-desoxiuridina, que inibe a timidilato sintetase, enzima catalisadora da transformação do ácido desoxiuridílico e ácido timidílico, impedindo assim a síntese de DNA e, em menor extensão, do RNA (CUEVA et al., 2013).

A desregulação do ciclo celular é uma das principais características das células tumorais (WANG et al., 2009), uma vez que, alterações na progressão normal do ciclo podem levar a uma proliferação desordenada de células dando origem aos tumores. Assim, a indução da parada do ciclo celular tem sido considerada como um importante mecanismo de substâncias envolvidas no tratamento anticâncer (KORNBBER; LORCH, 1999; DICKSON; SCHWARTZ, 2009; XIAO et al., 2011).

A fim de estudar os mecanismos moleculares envolvidos na atividade antitumoral apresentada pelas nanopartículas, seus efeitos sobre as diferentes fases do ciclo celular foram investigados.

NCZ, quando administrado na dose de 20 mg/kg, induziu parada do ciclo celular das células de CAE na fase G2/M, como evidenciado pelo aumento da quantidade de células nessa fase do ciclo, o que foi acompanhado por uma redução da quantidade de células na fase G0/G1. Este efeito pode estar relacionado a uma ação de NCZ sobre os microtúbulos, em um mecanismo semelhante ao antineoplásico paclitaxel, fármaco amplamente utilizado na clínica médica, o qual promove estabilização dos microtúbulos formados durante a divisão celular, impedindo a despolimerização necessária à replicação das células (SOUZA, 2004), ou ainda, o NCZ pode atuar em um passo anterior à formação dos microtúbulos, ou seja, inibindo a formação dos mesmos, em um mecanismo de ação semelhante a fármacos antineoplásicos como os alcaloides da vinca, vimblastina, vincristina e vinorelbina (CHOI et al., 2014). Outro mecanismo de ação possível é o bloqueio pré-mitótico devido à ligação com a topoisomerase II, inibindo que essa enzima complete sua função e repare as duas fitas de DNA que foram previamente

quebradas no processo de divisão celular, agindo assim de forma semelhante aos derivados da podofilotoxina, etoposídeo e teniposídeo (BRANDÃO et al., 2010).

Já quando NCZ foi administrado na dose de 40 mg/kg foi observado um aumento na quantidade de células na fase Sub-G1 do ciclo celular (menor quantidade de DNA marcado do que aquele das células em G0/G1). O acúmulo de células nessa fase é considerado um biomarcador de dano ao DNA, e o aparecimento do mesmo está relacionado à ocorrência de apoptose (WANG et al., 2011). A diminuição na marcação do DNA, observado em células em apoptose, é consequência da perda parcial de DNA dessas células devido à ativação de endonucleases endógenas e liberação subsequente de fragmentos de DNA de baixo peso molecular a partir da célula, antes da análise por citometria de fluxo (DARZYNKIEWICZ et al., 1992). Esse resultado sugere um maior efeito citotóxico de NCZ quando administrado em uma maior dose, indicando morte celular subsequente a uma parada do ciclo celular (HANSAKUL et al., 2014). Contudo, o mecanismo de ação exato de NCZ sobre o ciclo celular ainda precisa ser investigado.

A angiogênese é um passo essencial no desenvolvimento de tumores (AGRAWAL et al., 2011), está diretamente relacionada com o crescimento tumoral e metástases (FOLKMAN, 2007), uma vez que novos vasos sanguíneos permitem que oxigênio e nutrientes cheguem à nova massa de células tumorais em desenvolvimento. A ideia de que a angiogênese é um alvo em potencial para a terapia tumoral é amplamente aceita. Vários agentes antiangiogênicos que inibem tanto fatores de crescimento angiogênicos quanto seus receptores já foram desenvolvidos e têm sido objeto de diversos experimentos pré-clínicos e clínicos, dentre estes, a trombospondina-1, a combretastatin A-4 e o bevacizumab (PAPETTI; HERMAN, 2002). Os resultados do presente trabalho demonstram um significativo efeito antiangiogênico de NCZ nas doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg, o qual deve ser responsável, em parte, pela atividade antitumoral apresentada pela substância.

O sistema imune oferece proteção contra diferentes tipos de patógenos que venham a entrar em contato com o organismo, assim como oferece proteção contra células tumorais. Essa proteção envolve a ativação de tipos celulares específicos, produção de linfócitos e produção de várias citocinas (SIVEEN; KUTTAN, 2012). A modulação da resposta imune é extremamente relevante na destruição de células tumorais (GURUVAYOORAPPAN; KUTTAN, 2007). A administração de NCZ

promoveu uma estimulação da resposta imune dos animais em ambas as doses investigadas, conforme evidenciado pelo aumento de IL-10, TNF- α e IFN- γ na dose de 20 mg/kg e IL-1, TNF- α e IFN- γ na dose de 40 mg/kg.

Embora a IL-10 seja geralmente considerada uma interleucina anti-inflamatória e imunossupressora que favorece o escape do tumor da vigilância imunológica, várias evidências relatam que a IL-10 também possui propriedades imunoestimulantes. De fato a IL-10 tem a capacidade de influenciar positivamente e negativamente a função imunológica e seu real papel na biologia tumoral continua incerto (MOCELLIN; MARINCOLA; YOUNG, 2005). A literatura já relatou a correlação de altos níveis de IL-10 com um melhor prognóstico no câncer (LU et al., 2004), além disso outros estudos demonstram que a IL-10 também pode inibir a angiogênese induzida pelo tumor e aumentar a produção de moléculas tóxicas para as células tumorais, como por exemplo o óxido nítrico (ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003; CERVENAK et al., 2000). Dessa forma, tendo em vista o efeito antitumoral apresentado por NCZ, assim como seu efeito antiangiogênico nas doses testadas, acredita-se que o aumento da IL-10 provocado pelo tratamento com a substância em estudo, seja pelo menos em parte responsável pela sua atividade.

O TNF- α é uma citocina multifuncional que possui papel importante na indução de apoptose. É inclusive utilizada na clínica médica no tratamento de sarcomas teciduais locais avançados, melanomas metastáticos e outros tumores irresssecáveis de vários tipos histológicos, possuindo também atividade sinérgica com outras drogas citostáticas (HORSSSEN; HAGEN; EGGERMONT, 2006). NCZ foi capaz de induzir um aumento na produção de TNF- α nos animais, em ambas as doses investigadas, fato este que pode explicar em parte a atividade antitumoral apresentada pela substância em estudo.

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória (OGBOMO et al., 2010), cuja produção é induzida em grande parte pelo TNF- α . Seus efeitos são semelhantes aos do TNF- α (ABBAS; LICHTMAN, 2005). NCZ na dose de 40 mg/kg foi capaz de induzir um aumento na produção dessa interleucina o que provavelmente contribuiu para os efeitos antitumorais observados.

A resposta imunológica é caracterizada por uma primeira linha de defesa rápida e pouco específica, denominada imunidade inata, que envolve a participação de células fagocíticas e o sistema complemento, seguida de uma resposta de grande especificidade, denominada imunidade adaptativa, que envolve a

participação de linfócitos T e B. As células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, são as responsáveis pela eliminação local dos antígenos através da fagocitose e da produção de citocinas inflamatórias. As células NK (“natural killer”) são encontradas nesses sítios e apresentam uma grande capacidade citotóxica, além de serem excelentes produtoras de IFN- γ , aumentando o poder de endocitose das células fagocíticas residentes (OGBOMO et al., 2010; FERREIRA; ROCHA, 2004). Portanto, o tratamento com NCZ, ao induzir um aumento na concentração de IFN- γ , promove uma melhora na resposta imune inata do organismo.

Tendo em vista os diversos efeitos colaterais que os fármacos antineoplásicos apresentam como resultado de sua toxicidade sobre outras células do organismo que não as células tumorais, procedeu-se também a investigação de possíveis efeitos tóxicos de NCZ nas doses farmacológicas testadas em animais transplantados com o tumor de Ehrlich.

Praticamente todas as drogas antineoplásicas causam alterações gastrointestinais, dentre elas a anorexia. A anorexia está diretamente associada à desnutrição e à perda de peso. A incidência da primeira em pacientes com câncer varia de 40 a 80%, resultando em efeitos clínicos que se manifestam por dificuldade de cicatrização, aumento do risco de infecção, diminuição da resposta ao tratamento, da qualidade de vida e sobrevida, dentre outros (OLIVEIRA, 2010). Já a perda de peso está tipicamente associada à toxicidade (TALMADGE et al., 2007).

Neste contexto, parâmetros que podem ser avaliados nos estudos de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, para investigação da toxicidade da droga em estudo sobre o sistema gastrointestinal, são o consumo de alimentos e a evolução ponderal.

Na avaliação da toxicidade de NCZ no estudo de atividade antitumoral pode-se observar uma diminuição significativa no consumo de ração por parte dos animais tratados com a dose de 40 mg/kg, corroborando com os resultados obtidos nos estudos de toxicidade aguda e de doses repetidas, nos quais também foi evidenciado uma diminuição no consumo de ração. Esse resultado sugere, portanto, uma influência de NCZ sobre o consumo de alimentos, que pode estar relacionada a um efeito tóxico sobre o trato gastrointestinal ou mesmo a um efeito sobre o sistema nervoso central, levando à anorexia. No entanto, deve-se salientar que em nenhum dos estudos, tanto de atividade antitumoral, quanto de toxicidade, NCZ foi capaz de

provocar alterações significativas na evolução ponderal dos animais. Além disso, o antineoplásico 5-FU, amplamente utilizado na clínica médica e aqui utilizado como droga padrão, causou não só a diminuição no consumo de ração, como levou também a uma diminuição no peso dos animais, logo, não se trata de uma característica negativa específica dessas nanopartículas, e assim não representa um fator limitante para sua aplicação terapêutica.

A administração de NCZ aos animais resultou em um aumento de ALT no grupo tratado com a dose de 40 mg/kg, podendo sugerir a ocorrência de uma toxicidade hepática, induzida pelo composto, com a maior dose utilizada. Esta influência da associação em estudo sobre o fígado dos animais é corroborada pelos resultados obtidos nos estudos de toxicidade aguda e de doses repetidas.

Os rins estão envolvidos em muitas funções corporais críticas. Eles regulam as condições do fluido eletrolítico e o equilíbrio ácido-base, possuem função endócrina e são essenciais para a eliminação dos produtos de degradação. A alteração da função renal é uma das consequências mais comuns de toxicidade medicamentosa decorrente da excreção inadequada dos medicamentos ou de seus metabólitos (HENRY, 2008).

Os animais com CAE submetidos ao tratamento com NCZ apresentaram uma diminuição significativa na concentração sérica de ureia nos grupos tratados com as doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg. Assim como observado no estudo de toxicidade de doses repetidas esta diminuição pode estar relacionada à toxicidade hepática, resultando em uma diminuição na síntese deste composto nitrogenado.

Os animais com CAE submetidos ao tratamento com NCZ também apresentaram um aumento significativo na concentração sérica de creatinina nos grupos tratados com as doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg. Como dito anteriormente, quando ocorre injúria renal, produtos de degradação do metabolismo, que seriam eliminados pelos rins, como é o caso da creatinina, se acumulam levando a um aumento dos seus níveis sanguíneos. Esse resultado pode sugerir, portanto, uma toxicidade em nível renal com as doses utilizadas. Resultado semelhante também foi observado no grupo tratado com a droga padrão 5-FU. Vários antineoplásicos utilizados atualmente na clínica médica desencadeiam algum tipo de toxicidade renal, é o caso do metotrexato, docetaxel, cisplatina, dentre outros (BEZERRA et al., 2008; KOROLKOVAS, 2010).

É importante salientar ainda, que apesar do aumento significativo observado na atividade de ALT e na concentração sérica de creatinina, assim como, a diminuição significativa na concentração sérica de ureia, todos esses parâmetros permaneceram dentro dos valores normais para camundongos.

A supressão hematopoiética é uma das consequências mais comuns da quimioterapia antineoplásica, e é um dos mais incapacitantes efeitos colaterais no tratamento do câncer (MAGALHÃES et al., 2010).

A anemia é a mais comum das alterações hematológicas encontradas em pacientes com câncer. Os índices hematimétricos são parâmetros de avaliação das hemácias no que diz respeito ao tamanho destas células e à distribuição da hemoglobina nestas, por isso são importantes e servem especialmente para a classificação das anemias. O VCM representa a determinação média do volume dos eritrócitos, pois em uma mesma amostra de sangue podem ocorrer hemácias de tamanhos ligeiramente diferentes, o CHCM estima a média, em porcentagem, de quanto o eritrócito está preenchido pela hemoglobina e o HCM refere-se à quantidade de hemoglobina em termos de peso que cada um dos eritrócitos carrega (HENRY, 2008).

Diferentemente da maioria dos agentes antineoplásicos, NCZ não provocou alterações na maioria dos parâmetros hematológicos dos animais tratados. Observou-se apenas um aumento do HCM nos animais tratados com as doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg que não foi acompanhado por alteração significativa na CHCM, não possuindo, portanto, significado clínico relevante. Também foi possível evidenciar um aumento na porcentagem de linfócitos e redução da porcentagem de neutrófilos no tratamento com 5-FU, efeito colateral já conhecido deste antineoplásico (PITA, 2009).

A análise do índice dos órgãos dos camundongos com CAE submetidos ao tratamento com NCZ não evidenciou alterações significativas nesse parâmetro. Também não foram evidenciadas alterações significativas na histopatologia do fígado e rins desses animais, demonstrando uma baixa toxicidade em nível tecidual da associação do óxido de zinco com as nanopartículas de óxido de cério.

Não há relatos na literatura de estudos de toxicidade aguda ou de doses repetidas com nanopartículas, de qualquer tipo, de óxido de cério. No entanto, Tseng e colaboradores (2012) já avaliaram o efeito da infusão endovenosa dessas nanopartículas em ratos, por diferentes intervalos de tempo, sendo observada uma

elevação de AST, alteração esta que corrobora, em parte, com o estudo de doses repetidas apresentado nesse trabalho. Srinivas e colaboradores (2011), por sua vez, avaliaram o efeito da toxicidade aguda em ratos, por via inalatória, das nanopartículas de óxido de cério e evidenciaram que as mesmas podem provocar uma resposta inflamatória crônica, nas condições avaliadas, com alterações nas concentrações de várias citocinas. Como demonstrado no presente trabalho, as nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco também foram capazes de induzir alterações nas concentrações de citocinas no estudo de atividade antitumoral.

No que diz respeito à genotoxicidade das nanopartículas de óxido de cério, recentemente, Ali e colaboradores (2014) demonstraram que as mesmas foram capazes de induzir danos no DNA de células de melanoma A375. Já em um estudo realizado por Kumari e colaboradores (2014), com ratos Wistar e administrações repetidas, por v.o., de nanopartículas de óxido de cério, também foi evidenciado um efeito genotóxico em células sanguíneas, medula óssea e fígado. Esses estudos corroboram, em parte, a iniciativa de realizar o experimento de genotoxicidade do presente trabalho, no entanto, como descrito anteriormente, as nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco não apresentaram efeito genotóxico.

O óxido de zinco também não possui estudos relacionados à avaliação de sua toxicidade aguda e de doses repetidas. Um estudo clínico realizado por Beckett e colaboradores (2005) comparou os efeitos em humanos adultos saudáveis da inalação de partículas finas e ultrafinas de óxido de zinco, mas não evidenciaram efeitos significativos resultantes dessa exposição.

Em se tratando de atividade antitumoral, ao contrário do óxido de zinco que não apresenta estudos nessa área, diferentes nanopartículas de óxido de cério já demonstraram atividade *in vitro* e *in vivo* em diferentes linhagens de células tumorais, assim como inibição de invasão tumoral e sensibilização de células cancerígenas à radioterapia (GAO et al., 2014; SACK et al., 2014; WASON et al., 2013; WASON; ZHAO, 2013; ZHANG et al., 2014). Isso explica pelo menos em parte, a potente atividade apresentada pelas nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco.

Esse trabalho apresenta, portanto, importantes dados farmacológicos e toxicológicos de nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco, que subsidiam a realização de testes pré-clínicos adicionais e posteriormente testes

clínicos com a referida substância. Esse trabalho também evidencia o potencial de estruturas nanométricas como fonte de novos produtos farmacologicamente ativos, especialmente contra o câncer.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados com as nanopartículas de óxido de cério associadas ao óxido de zinco (NCZ), pode-se concluir que:

- NCZ apresentou baixa toxicidade aguda, quando administrado por via oral em camundongos e moderada toxicidade aguda, quando administrado por via intraperitoneal em camundongos;
- NCZ apresentou baixa toxicidade após administração de doses repetidas por via oral em camundongos;
- NCZ não apresentou genotoxicidade *in vivo*, nas condições avaliadas;
- NCZ apresentou potente atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich;
- O mecanismo de ação antitumoral de NCZ envolve a interferência na progressão do ciclo celular com indução de apoptose, aumento da resposta imune antitumoral e ação antiangiogênica.
- NCZ apresentou baixa toxicidade *in vivo*, em animais com CAE submetidos a doses repetidas (nove dias).

Referências

REFERÊNCIAS

- AALAPATI, S.; GANAPATHY, S.; MANAPURAM, S. et al. Toxicity and bio-accumulation of inhaled cerium oxide nanoparticles in CD1 mice. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 7, p. 786-98, 2014.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, p. 1324–1337, 2007.
- AGRAWAL, S. S.; SARASWATI, S.; MATHUR, R. et al. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life Sciences**, v. 89, p. 147-158, 2011.
- AI, J.; BIAZAR, E.; JAFARPOUR, M.; MONTAZERI, M.; MAJDI, A.; AMINIFARD, S.; ZAFARI, M.; AKBARI, H. R.; RAD, H. G. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1117–1127, 2011.
- AILLON, K. L.; XIE, Y.; EL-GENDY, N.; BERKLAND, C. J.; FORREST, M. L. Effects of nanomaterial physicochemical properties on *in vivo* toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 457–466, 2009.
- ALAPATI, V.; NOOLVI, M. N.; MANJULA, S. N. et al. *In vivo* anti-tumour activity of novel Quinazoline derivatives. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 16, p. 1753-1764, 2012.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: Entering the mainstream. **Science**, v. 303, p. 1818-22, 2004.
- ALI, D.; ALARIFI, S.; ALKAHTANI, S. et al. Cerium Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Skin Melanoma Cells. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 2014. [NO PRELO]

ALILI, L.; SACK, M.; KARAKOTI, A. S. et al. Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2918-29, 2011.

ALILI, L.; SACK, M.; VON MONTFORT, C. et al. Downregulation of tumor growth and invasion by redox-active nanoparticles. **Antioxid Redox Signal Journal**, v. 19, n. 8, p. 765-78, 2013.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS – JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ANDRADY C, SHARMA SK, CHESTER KA, Antibody-enzyme fusion proteins for cancer therapy. **Immunotherapy**, v. 3, p. 193-211, 2011.

ANVISA. **Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.

ARAVINDARAM, K.; YANG, N-S. Anti-Inflammatory Plant Natural Products for Cancer Therapy, **Planta Médica**, v. 76, p. 1103–1117, 2010.

ARYA, A.; SETHY, N. K.; DAS, M. et al. Cerium oxide nanoparticles prevent apoptosis in primary cortical culture by stabilizing mitochondrial membrane potential. **Free Radic Research**, v. 48, n. 7, p. 784-93, 2014.

ARYA, A.; SETHY, N. K.; SINGH, S. K. et al. Cerium oxide nanoparticles protect rodent lungs from hypobaric hypoxia-induced oxidative stress and inflammation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4507-20, 2013.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy - review of a new approach. **Pharmacology Review**, v. 55, P. 241-269, 2003.

AZIZ, N. S.; NISHIYAMA, T.; RUSLI, N. I. et al. Seedless growth of zinc oxide flower-shaped structures on multilayer graphene by electrochemical deposition. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 337, 2014.

BABENKO, L. P.; ZHOLOBAK, N. M.; SHCHERBAKOV, A. B. et al. Antibacterial activity of cerium colloids against opportunistic microorganisms *in vitro*. **Mikrobiol Z Journal**, v. 74, n. 3, p. 54-62, 2012.

BAKAND, S.; HAYES, A.; DECHSAKULTHORN, F. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. **Inhalation Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 125-35, 2012.

BENAMEUR, L.; AUFFAN, M.; CASSIEN, M. et al. DNA damage and oxidative stress induced by CeO₂ nanoparticles in human dermal fibroblasts: Evidence of a clastogenic effect as a mechanism of genotoxicity. **Nanotoxicology**, 2014. [NO PRELO]

BARKHORDARI, A.; HEKMATIMOGHADDAM, S.; JEBALI, A. et al. Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. **Iranian Journal Reproductive Medicine**, v. 11, n. 9, p. 767-71, 2013.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 156-63, 2008.

BEZERRA, D. P.; MARINHO FILHO, J. D.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, O. D.; TORRES, M. C.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, F. A.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of

Croton regelianus and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 8, p. 1224-31, 2009.

BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal Pathology**, v. 214, p. 149–60, 2008.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 18 jan 2015, 10:46:18.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Bases técnicas para autorização de procedimentos de alta complexidade. Brasília, 2003.

BRUNDA, M. J.; LUISTRO, L.; WARRIER, R. R. et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 4, p. 1223–1230, 1993.

CAI, X.; SEAL, S.; MCGINNIS, J. F. Sustained inhibition of neovascularization in vldlr^{-/-} mice following intravitreal injection of cerium oxide nanoparticles and the role of the ASK1-P38/JNK-NF- κ B pathway. **Biomaterials**, v. 35, n. 1, p. 249-58, 2014.

CAI, X.; YODOI, J.; SEAL, S.; MCGINNIS, J. F. Nanoceria and thioredoxin regulate a common antioxidative gene network in tubby mice. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 801, p. 829-836, 2014.

CAR, B. D.; ENG, V. M.; LIPMAN, J. M. et al. The toxicology of interleukin-12: a review. **Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 58–63, 1999.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L. et al. Anendotoxin- induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, p. 3666–70, 1975.

CASSEE, F. R.; CAMPBELL, A.; BOERE, A. J. et al. The biological effects of subacute inhalation of diesel exhaust following addition of cerium oxide nanoparticles in atherosclerosis-prone mice. **Environmental Research**, v. 115, p. 1-10, 2012.

CERVENAK, L.; MORBIDELLI, L.; DONATTI, D. et al. Abolished angiogenicity and tumorigenicity of Burkitt lymphoma by interleukin-10. **Blood**, v. 96, p. 2568–2573, 2000.

CHAKRABORTI, S.; MANDAL, A. K.; SARWAR, S. et al. Bactericidal effect of polyethyleneimine capped ZnO nanoparticles on multiple antibiotic resistant bacteria harboring genes of high-pathogenicity island. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 1, n. 121, p. 44-53, 2014.

CHAUDHURY, K.; BABU, K. N.; SINGH, A. K. et al. Mitigation of endometriosis using regenerative cerium oxide nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 9, n. 3, p 439-48, 2013.

CHENG, G.; GUO, W.; HAN, L. et al. Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways. **Toxicology In Vitro**, v. 27, n. 3, p. 1082-8, 2013.

CHENG, N.; CHYTIL, A.; SHYR, Y. et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 10, p. 1521–1533, 2008.

CHENG, S.; HOU, Y.; CHENG, G. et al. Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress. **Biological Trace Element Research**, v. 154, n. 1, p. 156-66, 2013.

CHEN, Z.; MENG, H.; XING, G. M.; YUAN, H.; JIA, G.; CHEN, C. Y.; FANG, X. H.; YE, C. ZHU, Z.; ZHAO, Y. L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. **Toxicology Letters**, v. 163, p. 109-120, 2006.

CHEN, Z.; MENG, H.; XING, G. M.; YUAN, H.; ZHAO, F.; LIU, R.; CHANG, X. L.; GAO, X. Y.; WANG, T. C.; JIA, G.; YE, C.; CHAI, Z. F.; ZHAO, Y. L. Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO₂ nanoparticle inhalation: Nanotoxicity shows susceptible population. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 8985-8992, 2008.

CHIDAMBARAM, M.; KRISHNASAMY, K. Nanotoxicology: Toxicity of engineered nanoparticles and approaches to produce safer nanotherapeutics. **International Journal of Pharma Sciences**, v. 2, n. 4, p. 117-122, 2012.

CHIGURUPATI, S.; MUGHAL, M. R.; OKUN, E. et al. Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. **Biomaterials**, v. 34, n. 9, p. 2194-201, 2013.

CHO, W. S.; DUFFIN, R.; POLAND, C. A. et al. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 12, p. 1699-706, 2010.

CHOI, B. H.; CHATTOPADHAYA, S.; THANH, L. N. et al. Suprafenacine, an indazole-hidrazide agent, targets cancer cells through microtubule destabilization. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. 1-13, 2014.

CHOW, M. T.; LUSTER, A. D. Chemokines in cancer. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 12, p. 1125-1131, 2014.

CIOFANI, G.; GENCHI, G. G.; MAZZOLAI, B. et al. Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in PC12 cells following treatment with cerium oxide nanoparticles. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1840, n. 1, p. 495-506, 2014.

COLOMBO, M. P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 in antitumor immunity and immunotherapy. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 2, p. 155–168, 2002.

COLON, J.; HSIEH, N.; FERGUSON, A. et al. Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 698-705, 2010.

COOPER, G. M. **The Cell: A molecular Approach**. Sunderland: 2000.

COSTA E SILVA, A.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 1, p. 167-179, 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O., A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual Química**, v.2, n. 1, p.47-58, 2010.

DE LA CUEVA, A.; MOLINA, A. R.; ÁLVAREZ-AYERZA, N. Combined 5-FU and ChoK α inhibitors as a new alternativa therapy of colorectal câncer: evidence in human tumor-derived cell lines and mouse xenografts. **PLoS One.**, v. 8, n. 6, 2013.

DARZYNKIEWICZ, S.; DEL BINO, B. G.; GORCZYCA, W. et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 795-808, 1992.

DAS, S.; SINGH, S.; DOWDING, J. M. et al. The induction of angiogenesis by cerium oxide nanoparticles through the modulation of oxygen in intracellular environments. **Biomaterials**, v. 33, n. 31, p. 7746-55, 2012.

DEMIR, E.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity and DNA repair processes of zinc oxide nanoparticles. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v. 77, n. 21, p. 1292-303, 2014.

DEMOKRITOU, P.; GLASS, S.; PYRGIOTAKIS, G. et al. An *in vivo* and *in vitro* toxicological characterisation of realistic nanoscale CeO₂ inhalation exposures. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 8, p. 1338-50, 2013.

DETINGER, S. D.; BISHOP, M. E.; MCNAMEE, J. P.; HAYASHI, M.; SUZUKI, T.; ASANO, N.; NAKAJIMA, M.; SAITO, J.; MOORE, M.; TOROUS, D. K.; MACGREGOR, J. T. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: i. intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. **Toxicological Sciences**, v. 94, n. 1, p. 83-91, 2006.

DICKSON, M. A.; SCHWARTZ, G. K. Development of cell cycle inhibitors for cancer therapy. **Current Opinion in Oncology**, v. 16, p. 36–43, 2009.

DINARELLO, C. A. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, p. 633–652, 2012.

DINARELLO, C. A. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade?. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 29, p. 317–329, 2010.

DOLAI, N., KARMAKAR, I., KUMAR, R. B. S., KAR, B., BALA, A.; HALDAR, P. K. Evaluation of antitumor activity and *in vivo* antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 865-870, 2012.

DOWDING, J. M.; SONG, W.; BOSSY, K. et al. Cerium oxide nanoparticles protect against A β -induced mitochondrial fragmentation and neuronal cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 10, p. 1622-32, 2014.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 347-60, 2003.

DUTCHER, J.; NEUBERG, D.; ATKINS, M. B. et al. Report of a phase I evaluation of dose and schedule of interleukin-1 alpha and cyclophosphamide in patients with advanced tumors: An Eastern Cooperative Oncology Group study (PX990) and review of IL-1-based studies of hematopoietic reconstitution.

Journal Interferon Cytokine Research, v. 34, n. 5, p. 376-84.

ECCLES S. A. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 6, p. 393-406, 2001.

EDMONSON, J. H.; PETERSEN, I. A.; SHIVES, T. C.; MAHONEY, M. R.; ROCK, M. G.; HADDOCK, M. G.; SIM, F. H.; MAPLES, W. J.; O'CONNOR, M. I.; GUNDERSON, L. L.; FOO, M. L.; PRITCHARD, D. J.; BUCKNER, J. C.; STAFFORD, S.; **Cancer**, v. 94, p. 786, 2002.

EHRlich, P. Experimentelle carcinomstudien na Mäusen. **Arb Inst Exp Ther Frankfurt**, v. 1, p. 78-80, 1906.

EL-ANSARY, A.; AL-DAIHAN, S. On the Toxicity of Therapeutically Used Nanoparticles: An Overview. **Journal of Toxicology**, v. 2009, p. 1-9, 2009.

ELDER, A.; GELEIN, R.; SILVA, V.; FEIKERT, T.; OPANASHUK, L.; CARTER, J.; POTTER, R.; MAYNARD, A.; FINKELSTEIN, J.; OBERDORSTER, G. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1172-1178, 2006.

ELMI, F.; ALINEZHAD, H.; MOULANA, Z. et al. The use of antibacterial activity of ZnO nanoparticles in the treatment of municipal wastewater. **Water Sci Technology**, v. 70, n. 5, p. 763-70, 2014.

ERNSTING, M. J.; MURAKAMI, M.; UNZYS, E. et al. A docetaxel-carboxymethylcellulose nanoparticle outperforms the approved taxane nanoformulation, Abraxane, in mouse tumor models with significant control of metastases. **Journal Control Release**, v. 162, p. 575-581, 2012.

ESTEVEZ, A. Y.; PRITCHARD, S.; HARPER, K. et al. Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. **Free Radical Biology Medicine**, v. 51, n. 6, p. 1155-63, 2011.

EVAN, G., LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. **Science**, v. 281, 1317–1322, 1998.

EVANS, G. O. **Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers**. 1 ed. Flórida: CRC Press, 2009.

EVANS, G. O. **Animal Clinical Chemistry: a primer for toxicologists**. 1 ed. Londres: Taylor & Francis, 2005.

EXTERMANN, M.; CHEN, H.; CANTOR, A. B.; CORCORAN, M. B.; MEYER, J.; GRENDYS, E.; CAVANAUGH, D.; ANTONEK, S.; CAMARATA, A.; HALEY, W. E.; BALDUCCI, L. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 1466, 2002.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 14, p.1456-1459, 2006.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 453-458, 2003.

FLYNN, T.; WEI, C. The pathway to commercialization for nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, p. 47-51, 2005.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 273-286, 2007.

FONSECA, A. S.; DAVIDSOBN, S. A. V. Correlação entre tontura e disfunções do metabolismo da glicose. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 3, p. 367-9, 2006.

FOTJOVA, M.; BOUDNY, V.; KOVARIK, A. et al. Development of IFN-gamma resistance is associated with attenuation of SOCS genes induction and constitutive expression of SOCS3 in melanoma cells. **British Journal of Cancer**, v. 97, p. 231–7, 2007.

FU, P. P.; XIA, Q.; HWANG, H. M. et al. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 64-75, 2014.

GACCHE, R. N.; MESHAM, R. J. Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 113, p. 333-354, 2013.

GACHE, R. N.; SHEGOKAR, H. D.; GOND, S. D. et al. Evaluation of selected flavonoids as antiangiogenic, anticancer, and radical scavenging agents: an experimental and in silico analysis. **Cell. Biochemistry and Biophysics**, v. 61, p. 651-663, 2011.

GACHE, R. N.; SHEKOGAR, H. D.; GOND, S. D. et al. Effect of hydroxyl substitution of flavone on angiogenesis and free radical scavenging activities: a structure-activity relationship studies using computational tools. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 37-44, 2010.

GAD, S. C. **Animal Models in Toxicology**. 2 ed. Flórida: CRC Press, 2007.

GALDIERO, M. R.; GARLANDA, C.; JAILLON, S. et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. **Journal Cellular Physiology**, v. 228, p. 1404–12, 2013.

GAO, Y.; CHEN, K.; MA, J. J. et al. Cerium oxide nanoparticles in cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 7, p. 835-840, 2014.

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Câncer: uma doença genética. *Genética na escola*, v. 3, n. 1, p. 4-7, 2008.

GIRI, S.; KARAKOTI, A.; GRAHAM, R. P. et al. Nanoceria: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer. **PLoS One.**, v. 8, n. 1, 2013.

GIULIANO, S.; PAGÈS, G. Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. **Biochimie**, p. 1-10, 2013.

GONCALVES, D. M.; GIRARD, D. Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. **Toxicology In Vitro**, v. 28, n. 5, p. 926-31, 2014.

GONZAGA, M. L.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; SOARES, S. A.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an alpha-(1→4)-glucan-beta-(1→6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **Journal of Natural Medicine**, v. 63, n. 1, p. 32-40, 2009.

GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. **Chemosphere**, v. 119, p. 608-619, 2014.

GURUVAYOORAPPAN, C.; KUTTAN, G. Amentoflavone, a biflavonoid from *Biophytum sensitivum* augments lymphocyte proliferation, natural killer cell and

antibody dependent cellular cytotoxicity through enhanced production of IL-2 and IFN-gamma and restrains serum sialic acid and gamma glutamyl transpeptidase production in tumor - bearing animals. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 6, n. 4, p. 285-95, 2007.

HALLETT, M. A.; VENMAR, K. T.; FINGLETON, B. Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13. **Cancer Research**, v. 72, p. 6338–43, 2012.

HANAHAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353-364, 1996.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HANSAKUL, P.; AREE, K.; TANOCHI, S. et al. Growth arrest and apoptosis via caspase activation of dioscoreanone in human non-small-cell lung cancer A549. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 413, 2014.

HAO, Q.; CHO, W. C. Battle against cancer: an everlasting saga of p53. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 22109-22127, 2014.

HASHIZUME, H.; BALUK, P.; MORIKAWA, S. et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. **American Journal of Pathology**, v. 156, p. 1363-1380, 2000.

HAYASHI, P. H.; FONTANA, R. J. Clinical features, diagnosis, and natural history of drug-induced liver injury. **Seminars in Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. 134-44, 2014.

HECKMAN, K. L.; DeCOTEAU, W.; ESTEVEZ, A. et al. Custom cerium oxide nanoparticles protect against a free radical mediated autoimmune degenerative disease in the brain. **ACS Nano**, v. 7, n. 12, p. 10582-10596, 2013.

HERNÁNDEZ-DELGADILLO, R. H.; VELASCO-ARIAS, D.; DIAZ, D. et al. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2109-13, 2012.

HENRY, J. B. **Diagnóstico clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. Barueri: Manole, 2008.

HIRST, S. M.; KARAKOTI, A.; SINGH, S. et al. Bio-distribution and *in vivo* antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. **Environmental Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 107-18, 2013.

HORIE, M.; NISHIO, K.; KATO, H. et al. Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells. **Journal of Biochemistry**, v. 150, n. 4, p. 461-71, 2011.

HORSSSEN, R. V.; TEN HAGEN, T. L. M.; EGGERMONT, A. M. M. TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. **The Oncologist**, v. 11, p. 397-408, 2006.

HOSSEINI, A.; BAEERI, M.; RAHIMIFARD, M. et al. Antiapoptotic effects of cerium oxide and yttrium oxide nanoparticles in isolated rat pancreatic islets. **Human & Experimental Toxicology**, v. 32, n. 5, p. 544-53, 2013.

HOSSNE, R. S. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação do modelo no Brasil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n.4, 2002.

HUBBS, A. F.; SARGENT, L. M.; PORTER, D. W. et al. Nanotechnology: Toxicologic Pathology. **Toxicologic Pathology**, v. 41, p. 395-409, 2013.

HUSSAIN, S.; AL-NSOUR, F.; RICE, A. B. et al. Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human peripheral blood monocytes. **ACS Nano**, v. 6, n. 7, p. 5820-9, 2012.

HYUK, S. W.; SUSLICK, S. K.; STUCKY, G. D.; YOO-HUN, S. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. **Progress in Neurobiology**, v. 87, n. 3, p. 133–170, 2009.

IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 13, p. 95–109, 2002.

IMINJAN, M.; AMAT, N.; LI, X. H. et al. Investigation into the toxicity of traditional Uyghur medicine Quercus infectoria galls water extract. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Nanopartículas para aplicação oncológica. 2011.

ISMAIL, A. F.; ALI, M. M.; ISMAIL, L. F. Photodynamic therapy mediated antiproliferative activity of some metal-doped ZnO nanoparticles in human liver adenocarcinoma HepG2 cells under UV irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 138, p. 99-108, 2014.

JATANIA, A.; SHIVALINGA, B. M. An in vitro study to evaluate the effects of addition of zinc oxide to an orthodontic bonding agent. **European Journal of Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 112-7, 2014.

JIA, G.; WANG, H.; YAN, L.; WANG, X.; PEI, R.; YAN, T.; ZHAO, Y.; GUO, X. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 1378-1383, 2005.

JORGE, S. G. **Exames laboratoriais**. Hepcentro, 2006. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>>. Acesso em: 28 out. 2014, 22:06:30.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAHRU, A.; IVASK, A. Mapping the dawn of nanoecotoxicological research. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 823-33, 2013.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v. 269, n. 2-3, p. 105–119, 2010.

KARMAKAR, A.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y. Neurotoxicity of nanoscale materials. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 147-60, 2014.

KASRAEI, S.; SAMI, L.; HENDI, S. et al. Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 39, n. 2, p. 109-14, 2014.

KERBEL, R.S. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. **Cancer Biology and Therapy**, v. 4, n.1, p. 134-143, 2003.

KHAN, S. T.; AHAMED, M.; MUSARRAT, J. et al. Anti-biofilm and antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against the oral opportunistic pathogens *Rothia dentocariosa* and *Rothia mucilaginosa*. **European Journal of Oral Science**, 2014.
[NO PRELO]

KHATTAR, J. A.; MUSHARRAFIEH, U. M.; TAMIN, H. et al. Topical zinc oxide vs. salicylic acid-lactic acid combination in the treatment of warts. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 4, p. 427-30, 2007.

KIM, M. H.; SEO, J. H.; KIM, H. M. et al. Zinc oxide nanoparticles, a novel candidate for the treatment of allergic inflammatory diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 738, p. 31-9, 2014.

KLAUBER-DEMORE, N. Are epsins a therapeutic target for tumor angiogenesis?. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 12, p. 4341-4343, 2012.

KLEIN, G.; KLEIN, E. Conversion of solid neoplasm into ascites tumors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 63, p. 640-661, 1956.

KOLLI, M. B.; MANNE, N. D.; PARA, R. et al. Cerium oxide nanoparticles attenuate monocrotaline induced right ventricular hypertrophy following pulmonary arterial hypertension. **Biomaterials**, v. 35, n. 37, p. 9951-62, 2014.

KONG, L.; CAI, X.; ZHOU, X. et al. Nanoceria extend photoreceptor cell lifespan in tubby mice by modulation of apoptosis/survival signaling pathways. **Neurobiology of Disease**, v. 42, n. 3, p. 514-23, 2011.

KORNBERG, R.D.; LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome fundamental particle of the eukaryotic chromosome. **Cell**, v. 98, p. 285–294, 1999.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **The Journal of Cell Biology**, v. 66, n. 1, p. 188-193, 1975,

KRUG, H. F. Nanosafety Research-Are We on the Right Track? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, p. 12304 – 12319, 2014.

KUMARI, M.; KUMARI, S. I.; GROVER, P. Genotoxicity analysis of cerium oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration. **Mutagenesis**, v. 29, n. 6, p. 467-79, 2014.

KYOSSEVA, S. V.; CHEN, L.; SEAL, S. et al. Nanoceria inhibit expression of genes associated with inflammation and angiogenesis in the retina of Vldlr null mice. **Experimental Eye Research**, v. 116, p. 63-74, 2013.

LEAL, J. H. S.; CUBERO, D.; GIGLIO, A. D. Hormonioterapia paliativa em câncer de mama: aspectos práticos e revisão da literature. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 8, n. 4, p. 338-43, 2010.

LEE, B.; SANDHU, S.; MCARTHUR, G. Cell cycle control as a promising target in melanoma. **Current Opinion in Oncology**, 2015. [NO PRELO]

LEE, T. L.; RAITANO, J. M.; RENNERT, O. M. et al. Accessing the genomic effects of naked nanoceria in murine neuronal cells. **Nanomedicine**, v. 8, n. 5, p. 599-608, 2012.

LI, Z. HULDERMAN, T.; SALMEN, R.; CHAPMAN, R.; LEONARD, S. S.; YOUNG, S. H.; SHVEDOVA, A.; LUSTER, M. I.; SIMEONOVA, P. P. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, p. 377-382, 2007.

LI, Z.; JIANG, J.; WANG, Z. et al. Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. **Cancer Research**, v. 68, p. 8687-94, 2008.

LIANG, X. W.; XU, Z. P.; GRICE, J.; ZVYAGIN, A. V.; ROBERTS, M. S.; LIU, X. Penetration of nanoparticles into human skin. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 35, p. 6353-66, 2013.

LIN, C. D.; KOU, Y. Y.; LIAO, C. Y. et al. Zinc oxide nanoparticles impair bacterial clearance by macrophages. **Nanomedicine**, v. 9, n. 9, p. 1327-39, 2014.

LINS, K. O.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; ALENCAR, N. M.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 20-6, 2009.

LIPPITZ, B.E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. **Lancet Oncology**, v. 14, p. 218–28, 2013.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmaceutical Therapy**, v. 46, p. 321-340, 1990.

LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, v. 432, p. 307-315, 2004.

LU, C.; SORIA, J. C.; TANG, X. Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, p. 4575-4583, 2004

LUNG, S.; CASSEE, F. R.; GOSENS, I. et al. Brain suppression of AP-1 by inhaled diesel exhaust and reversal by cerium oxide nanoparticles. **Inhalation Toxicology**, v. 26, n. 10, p. 636-41, 2014.

LUQMANI, Y. A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. **Medical Principles and Practice**, v. 14, p. 35-48, 2005.

MA, B.; YEO, W.; HUI, P.; WO, W. M.; JONSON, P. J. Acute toxicity of adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide for early breast cancer - a retrospective review of Chinese patients and comparison with an historic Western series. **Radiotherapy Oncology**, v.62, p. 185, 2002.

MA, J. Y.; MERCER, R. R.; BARGER, M. et al. Induction of pulmonary fibrosis by cerium oxide nanoparticles. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 262, n. 3, p. 255-64, 2012.

MA, J. Y.; ZHAO, H.; MERCER, R. R. et al. Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 3, p. 312-25, 2011.

MADERO-VISBAL, R. A.; ALVARADO, B. E.; COLON, J. F. et al. Harnessing nanoparticles to improve toxicity after head and neck radiation. **Nanomedicine**, v. 8, n. 7, p. 1223-31, 2012.

MAGALHÃES, H. I.; FERREIRA, P. M.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 407-416, 2010.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Natural Reviews Cancer**, v. 9, p. 153-166, 2009.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent Smancs. **Cancer Research**, v. 46, p. 6387-6392, 1986.

MCCARRON, P. A., OLWILL, S. A., MAROUF, W. M., BUICK, R. J., WALKER, B., SCOTT, C. J., Antibody conjugates and therapeutic strategies. **Molecular Interventions**, v. 5, p. 368-80, 2005.

MEDINA, C.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; RADOMSKI, A.; CORRIGAN, O. I.; RADOMSKI, M. W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, p. 552–558, 2007.

MINARCHICK, V. C.; STAPLETON, P. A.; PORTER, D. W. et al. Pulmonary cerium dioxide nanoparticle exposure differentially impairs coronary and mesenteric arteriolar reactivity. **Cardiovascular Toxicology**, v. 13, n. 4, p. 323-37, 2013.

MIRHOSSEINI, M.; ARJMAND, V. Reducing pathogens by using zinc oxide nanoparticles and acetic acid in sheep meat. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 9, p. 1599-604, 2014.

MITTAL, S.; PANDEY, A. K. Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis. **Biomedical Research International**, v. 2014, 2014.

MOCELLIN, S.; MARINCOLA, F. M.; YOUNG, H. A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 5, p. 1043-51, 2005.

MOGHIMI, S. M.; FARHANGRAZI, Z. S. Just so stories: The random acts of anti-cancer nanomedicine performance. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, p. 1661-1666, 2014.

MOMTAZ, P.; POSTOW, M. A. Immunologic checkpoints in cancer therapy: focus on the programmed death-1 (PD-1) receptor pathway. **Pharmgenomics Personalized Medicine**, v. 15, n. 7, p. 357-65, 2014.

MONTENEGRO, R. C.; FARIAS R. A. F.; PEREIRA, M. R. P.; ALVES, A. P. N. N.; BEZERRA, F. S.; ANDRADE-NETO, M. et al. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 454-7, 2008.

MUHAMMAD, H.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; POÇA, K. S.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; AFZAN, A.; SULAIMAN, S. A.; ISMAIL, Z.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 647-653, 2011.

MURTHY, S. K. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 2, p. 129-141, 2007.

MUTHURAMAN, P.; RAMKUMAR, K.; KIM, D. H. Analysis of Dose-Dependent Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activity in Adipocytes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2014. [NO PRELO]

NAGAJYOTHI, P. C.; SREEKANTH, T. V.; TETTEY, C. O. et al. Characterization, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities of ZnO nanoparticles using *Coptidis*

Rhizoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 17, p. 4298-303, 2014.

NASCIMENTO, F. R. F.; CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P. S.; BARROQUEIRO, S. B.; GUERRA, R. N. M. Ascitic and Solid Tumor Inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. **Life Sciences**, v.78, p. 2650-2653, 2006.

NALABOTU, S. K.; KOLLI, M. B.; TRIEST, W. E. et al. Intratracheal instillation of cerium oxide nanoparticles induces hepatic toxicity in male Sprague-Dawley rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2327-35, 2011.

NIU, J.; WANG, K.; KOLATTUKUDT, P. E. Cerium oxide nanoparticles inhibit oxidative stress and nuclear factor- κ B activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 338, n. 1, p. 53-62, 2011.

NÓBREGA, F. F. F. **Monoterpeno 4-terpineol – uma molécula com atividade anticonvulsivante: estudos comportamentais e eletrofisiológicos**. 2012. 159 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

O'BRIEN, W. J.; BOENKE, K. M.; LINGER J. B. et al. Cerium oxide as a silver decolorizer in dental porcelains. **Dental Materials**, v. 14, p. 365-9, 1998.

OBERDO, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, p. 89-105, 2010.

OBERDÖRSTER, E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1058–1062, 2004.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823-839, 2005.

OBERDÖRSTER, G.; SHARP, Z.; ATUDOREI, V.; ELDER, A.; GELEIN, R. KREYLING W.; COX, C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. **Inhalation Toxicology**, v. 16, p. 437-445, 2004.

OECD. Test No 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, 1995.

OECD. Test No 423: Acute oral toxicity – acute toxic class method, 2001.

OECD. Test No 425: Acute oral toxicity – up-and-down procedure, 2001.

OFT, M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 3, p. 194-9, 2014.

OGBOMO, H.; MICHAELIS, M.; ALTENBRANDT, B. et al. A novel immunomodulatory mechanism of ribavirin in suppressing natural killer cell function. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 2, p. 188-97, 2010.

OGINO, A.; YOSHINO, A.; KATAYAMA, Y.; WATANABE, T.; OTA, T.; KOMINE, E.; et al. The p15INK4b/p16INK4a/RB1 Pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 64, p. 398-403, 2005.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M.; MARINHO-FILHO, J. D.; FIGUEIREDO, I. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P.; RAMOS, M. V. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, n. 2, p. 139-149, 2010.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, p. 976, 2002.

OLIVEIRA, T. **A importância da alimentação durante o tratamento do câncer**. 2010. Disponível em:
<<http://www.oncoguia.com.br/site/interna.php?cat=75&id=344&menu=54>>. Acesso em: 27 out. 2014. 15:12:31.

PAGLIARI, F.; MANDOLI, C.; FORTE, G. et al. Cerium oxide nanoparticles protect cardiac progenitor cells from oxidative stress. **ACS Nano.**, v. 6, n. 5, p. 3767-75, 2012.

PALANIKUMAR, L.; RAMASAMY, S. N.; BALACHANDRAN, C. Size-dependent antimicrobial response of zinc oxide nanoparticles. **IET Nanobiotechnology**, v. 8, n. 2, p. 111-7, 2014.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **American Journal of Physiology and Cell Physiology**, v. 282, n. 5, p. 947-70, 2002.

PATTAN, G.; KAUL, G. Health hazards associated with nanomaterials. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 6, p. 499–519, 2014.

PATI, R.; MEHTA, R. K.; MOHANTY, S. et al. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. **Nanomedicine**, v. 10, n. 6, p. 1195-208, 2014.

PELLETIER, D. A.; SURESH, A. K.; HOLTON, G. A. et al. Effects of engineered cerium oxide nanoparticles on bacterial growth and viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 24, p. 7981-9, 2010.

PEREIRA, J V. **Bioquímica clínica**. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 1998.

PERSIDIS, A. Cancer multidrug resistance. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 94-95, 1999.

PIERSCIONEK, B. K.; LI, Y.; YASSEEN, A. A. et al. Nanoceria have no genotoxic effect on human lens epithelial cells. **Nanotechnology**, v. 21, n. 3, 2010.

PITA, J. C. L. R. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae)**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2010.

PONNURANGAM, S.; O'CONNELL, G. D.; CHERNYSHOVA, I. V. et al. Beneficial effects of cerium oxide nanoparticles in development of chondrocyte-seeded hydrogel constructs and cellular response to interleukin insults. **Tissue Engineering Part A.**, 2014 [NO PRELO].

PORTIELJE, J. E. A.; LAMERS, C. H. J.; KRUIT, W. H. J. et al. Repeated administrations of interleukin (IL)-12 are associated with persistently elevated plasma levels of IL-10 and declining IFN- γ , tumor necrosis factor- α , IL-6, and IL-8 responses. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 76–83, 2003.

POSTOW, M. A.; CALLAHAN, M. K.; WOLCHOK, J. D. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, 2015. [NO PRELO]

POURKHALILI, N.; HOSSEINI, A.; NILI-AHMADABADI, A. et al. Biochemical and cellular evidence of the benefit of a combination of cerium oxide nanoparticles and selenium to diabetic rats. **World Journal of Diabetes**, v. 2, n. 11, p. 204-10, 2011.

POURKHALILI, N.; HOSSEINI, A.; NILI-AHMADABADI, A. et al. Improvement of isolated rat pancreatic islets function by combination of cerium oxide nanoparticles/sodium selenite through reduction of oxidative stress. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 22, n. 6, p. 476-82, 2012.

PRADHAN, A. K.; MUNDLE, R. M.; SANTIAGO, K. et al. Extreme tunability in aluminum doped zinc oxide plasmonic materials for near-infrared applications. **Scientific Reports**, v. 14, n. 4, p. 6415, 2014.

QI, L.; XU, Z. *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 16, p. 4243-4245, 2006.

REDDY, L. S.; NISHA, M. M.; JOICE, M. et al. Antimicrobial activity of zinc oxide (ZnO) nanoparticle against *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 11, p. 1388-97, 2014.

REED, J. C. Apoptosis-based therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 1, p. 111-21, 2002.

REMER, M.; WHITE, A.; GLENNIE, M. The Use of Anti-CD40 mAb in Cancer. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 2015. [NO PRELO]

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SALVADOR, M. J. Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 974-977, 2012.

ROCCA, A.; MATTOLI, V.; MAZZOLAI, B. et al. Cerium oxide nanoparticles inhibit adipogenesis in rat mesenchymal stem cells: potential therapeutic implications. **Pharmaceutical Research**, 2014 [NO PRELO].

SÁ, R. C. S.; OLIVEIRA, L. E. G.; FONSECA, D. V. et al. Central nervous system effects of *Dioclea grandiflora* pods on mice. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.**, v. 12, n. 5, p. 446-456, 2013.

SACK, M.; ALILI, L.; KARAMAN, E. et al. Combination of conventional chemotherapeutics with redox-active cerium oxide nanoparticles - A novel aspect in cancer therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 7, p. 1740-9, 2014.

SAFARZADEH, E.; SANDOGHCHIAN SHOTORBANI, S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advances Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. 1, p. 421-7, 2014.

SANTOS, C. C. L. **Síntese e aplicação biotecnológica de nanoestruturas de óxido de cério (IV), obtidas pelo método hidrotermal de micro-ondas.** 2013. 134 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v.45, p. 528-37, 2000.

SCHANEN, B. C.; DAS, S.; REILLY, C. M. et al. Immunomodulation and T helper TH1/TH2 response polarization by CeO₂ and TiO₂ nanoparticles. **PLoS One.**, v. 8, n. 5, 2013.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, p. 163–89, 2004.

SEKER, S.; ELCIN, A. E.; YUMAK, T. et al. *In vitro* cytotoxicity of hydrothermally synthesized ZnO nanoparticles on human periodontal ligament fibroblast and mouse dermal fibroblast cells. **Toxicology In Vitro.**, v. 28, n. 8, p. 1349-58, 2014.

SELIGER, B.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. **Advances in Cancer Research**, v. 101, p. 249–76, 2008.

SHARMA, H. S.; SHARMA, A. Neurotoxicity of engineered nanoparticles from metals. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 11, n. 1, p. 65-80, 2012.

SHI, L. E.; LI, Z. H.; ZHENG, W. et al. Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.**, v. 31, n. 2, p. 173-86, 2014.

SIMKÓ, M.; NENTWICH, M.; GAZSÓ, A.; FIEDELER, U. How nanoparticles enter the human body and their effects there. **NanoTrust-Dossier**, n. 3, 2010.

SIVEEN, K. S.; KUTTAN, G. Effect of *Aerva lanata* on cell-mediated immune responses and cytotoxic T-lymphocyte generation in normal and tumor-bearing mice. **Journal of Immunotoxicology**, v. 9, n. 1, p. 25-33, 2012.

SLIFIERZ, M. J.; FRIENDSHIP, R.; WEESE, J. S. Zinc Oxide Therapy Increases Prevalence and Persistence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs: A Randomized Controlled Trial Zoonoses and Public Health. **Innate Immunity**, 2014. [NO PRELO]

SONG, Z. H.; XIAO, K.; KE, Y. L. et al. Zinc oxide influences mitogen-activated protein kinase and TGF- β 1 signaling pathways, and enhances intestinal barrier integrity in weaned pigs. **Innate Immunity**, 2014. [NO PRELO]

SNOW, S. J.; MCGEE, J.; MILLER, D. B. et al. Inhaled Diesel Emissions Generated With Cerium Oxide Nanoparticle Fuel Additive Induce Adverse Pulmonary and Systemic Effects. **Toxicology Sciences**, 2014. [NO PRELO]

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

SRINIVAS, A.; RAO, P. J.; SELVAM, G. et al. Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. **Toxicology Letters**, v. 205, n. 2, p. 105-115, 2011.

STERN, S. T.; MCNEIL, S. E. Nanotechnology safety concerns revisited. **Toxicological Sciences**, v. 101, p. 4-21, 2011.

STRASSER, A.; CORY, S. ADAMS, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO Journal**, v. 30, n. 18, p. 3667-83, 2011.

SUZUKI, Y.; TADA-OIKAWA, S.; ICHIHARA, G. et al. Zinc oxide nanoparticles induce migration and adhesion of monocytes to endothelial cells and accelerate foam cell formation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 278, n. 1, p. 16-25, 2014.

TALMADGE, J.E.; AND FIDLER, I.J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Research**, v. 70, p. 5649-5669, 2010.

TALMADGE, J. E.; SINGH, R. K.; FIDLER, I. J.; RAZ, A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for câncer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.

TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M. et al. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 491-500, 2005.

THORLEY, A.; TETLEY, T. D. New perspectives in nanomedicine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 140, p. 176-185, 2013.

TODARO, M.; ALEA, M. P.; DISTEFANO, A. B. et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. **Cell Stem Cell**, v. 1, p. 389–402, 2007.

TOOMER, K. H.; CHEN, Z. Autoimmunity as a double agent in tumor killing and cancer promotion. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 18, p. 1-14, 2014.

TSALIC, M.; BAR, S. G.; BENY, A.; VISEL, B.; HAIM, N. Severe toxicity related to the 5-fluorouracil/leucovorin combination (the Mayo Clinic regimen): a prospective study in colorectal cancer patients. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 103, 2003.

TSENG, M. T.; LU, X.; DUAN, X. et al. Alteration of hepatic structure and oxidative stress induced by intravenous nanoceria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 260, n. 2, p. 173-82, 2012.

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; PEREIRA, M. R.; LEMOS, T. L.; PESSOA, O. D. et al. Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, p. 1416-21, 2007.

VIEIRA, J.; MATSUZAKI, P.; NAGAMINE, M. K.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, GORNIK, G.; S. L.; DAGLI, M. L. Z. Inhibition of Ascitic Ehrlich Tumor Cell Growth by Intraperitoneal Injection of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) Butanolic Residue. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 53, n. 3, p. 609-613, 2010.

VOGT, A.; RANCAN, F.; AHLBERG, S. et al. Interaction of dermatologically relevant nanoparticles with skin cells and skin. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 5, p. 2363-2373, 2014.

WANG, H. M.; CHIU, C. C.; WU, P. F. et al. Subamolide E from *Cinnamomum subavenium* induces Sub-G1 cell-cycle arrest and caspase-dependent apoptosis and

reduces the migration ability of human melanoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8187-8192, 2011.

WANG, H.; YIN, H.; YAN, F. et al. Folate-mediated mitochondrial targeting with doxorubicin-polyrotaxane nanoparticles overcomes multidrug resistance.

Oncotarget, 2014. [NO PRELO]

WANG, J.; WU, A.; XU, Y. F.; LIU, J. W.; QIAN, X. H. M. A induces apoptosis and G2–M arrest via inhibiting PI3K/Akt pathway in HL60 cells. **Cancer Letters**, v. 283, p. 193–202, 2009.

WANG, Y. W.; CAO, A. JIANG, Y. et al. Superior antibacterial activity of zinc oxide/graphene oxide composites originating from high zinc concentration localized around bacteria. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 26, n. 6, p. 2791-8, 2014.

WANG, B.; FENG, W. Y.; WANG, M.; WANG, T. C.; GU, Y. Q.; ZHU, M. T.; OUYANG, H.; SHI, J. W.; ZHANG, F.; ZHAO, Y. L.; CHAI, Z. F.; WANG, H. F.; WANG, J. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, p. 263-276, 2008.

WANG, J. X.; CHEN, C. Y.; LIU, Y.; JIAO, F.; LI, W.; LAO, F.; LI, Y. F.; LI, B.; GE, C. C.; ZHOU, G. Q.; GAO, Y. X.; ZHAO, Y. L.; CHAI, Z. F. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. **Toxicology Letters**, v. 183, p. 72-80, 2008a.

WANG, Q.; PEREZ, J. M.; WEBSTER, T. J. Inhibited growth of *Pseudomonas aeruginosa* by dextran- and polyacrylic acid-coated ceria nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 3395-9, 2013.

WASON, M. S.; COLON, J.; SEAL, S. et al. Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production. **Nanomedicine**, v. 9, n. 4, p. 558-69, 2013.

WASON, M. S.; ZHAO, J. Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases. **American Journal Translation Research**, v. 5, n. 2, p. 126-131, 2013.

WHO. Câncer. 2010. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 24 nov. 2014. 9:38:20.

WONG, L. L.; HIRST, S. M.; PYE, Q. N. et al. Catalytic nanoceria are preferentially retained in the rat retina and are not cytotoxic after intravitreal injection. **PLoS One.**, v. 8, n. 3, 2013.

XIAO, X. Y.; HAO, M.; YANG, X. Y.; BA, Q.; LI, M.; NI, S. J.; WANG, L. S.; DU, X. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. **Cancer Letters**, v. 302, p. 69–75, 2011.

XU, M.; MIZOGUCHI, I.; MORISHIMA, N. et al. Regulation of Antitumor Immune Responses by the IL-12 Family Cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. **Clinical and Development Immunology**, p. 1-9, 2010.

YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D. et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. **Cancer Research**, v. 55, p. 3752-3756, 1995.

ZAIDI, M. R.; MERLINO, G. The two faces of interferon-gamma in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, p. 6118–24, 2011.

ZHANG, L.; JIANG, H.; SELKE, M. et al. Selective cytotoxicity effect of cerium oxide nanoparticles under UV irradiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 2, p. 278-86, 2014.

ZHANG, M.; JIN, J.; CHANG, Y. N. et al. Toxicological properties of nanomaterials. **Journal of Nanoscience and Nanotechnologies**, v. 14, n. 1, p. 717-29, 2014.

ZHAO, Y.; WANG, B.; FENG, W.; BAI, C. Nanotoxicology: Toxicological and Biological Activities of Nanomaterials. IN: **Nanoscience and Nanotechnologies**. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Disponível em: <http://www.eolss.net/sample-chapters/c05/e6-152-35-00.pdf>. Acesso em: 25 de novembro de 2014.

ZHOU, G.; GU, G.; LI, Y. et al. Effects of cerium oxide nanoparticles on the proliferation, differentiation, and mineralization function of primary osteoblasts *in vitro*. **Biological Trace Element Research**, v. 153, n. 1-3, p. 411-8, 2013.

ZHOU, X.; WONG, L. L.; KARAKOTI, A. S. et al. Nanoceria inhibit the development and promote the regression of pathologic retinal neovascularization in the Vldlr knockout mouse. **PLoS One**, v. 6, n. 2, 2011.

ZHU, M. T.; FENG, W. Y.; WANG, B.; WANG, T. C.; GU, Y. Q.; WANG, M.; WANG, Y.; OUYANG, H.; ZHAO, Y. L.; CHAI, Z. F. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. **Toxicology**, v. 247, p. 102-111, 2008.

ZIEGLER, R. G., Phytoestrogens and breast cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 183-184, 2003.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, p. 57-70, 2001.

Anexos

ANEXO A – Triagem farmacológica comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito aumentado, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Iritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose palpebral					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimajamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

ANEXO B – Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 300 mg/kg.

