



Natalia Maria Candido

Estudo da ação de nanopartículas magnéticas de ferro no
câncer oral

Natalia Maria Candido

Estudo da ação de nanopartículas magnéticas de ferro no
câncer oral

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Biologia Celular e Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Paula Rahal

Co-orientadora: Dr^ª. Marília de Freitas Calmon

São José do Rio Preto - SP
2013

Candido, Natalia Maria.

Estudo da ação de nanopartículas magnéticas de ferro no câncer oral /
Natalia Maria Candido. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2013.
112 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Paula Rahal

Co-orientadora: Marília de Freitas Calmon

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Câncer. 2. Boca - Câncer. 3. Carcinoma de células escamosas.
4. Hamster sírio. 5. Nanopartículas. 6. Ferromagnetismo. I. Rahal, Paula.
II. Calmon, Marília de Freitas. III. Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título

CDU - 616.31-002-4

Natalia Maria Candido

Estudo da ação de nanopartículas magnéticas de ferro no câncer oral

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Biologia Celular e Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Paula Rahal
Professora Livre Docente
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/IBILCE

Dr^ª. Patrícia Simone Leite Vilamaior
Assistente de Suporte Acadêmico e docente colaborador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/IBILCE

Dr. Fernando Lucas Primo
Pós-Doutorado em Nanotecnologia, Engenharia Tecidual e Fototerapia na Universidade de São Paulo – USP Ribeirão Preto e Pesquisador da empresa Nanophoton

São José do Rio Preto, 21 de fevereiro de 2013.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Genômicos, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedico este trabalho aos meus pais, Amaury e Neucir, a quem agradeço pelo amor que incondicionalmente dedicam a mim, por todos os ensinamentos que proporcionaram meu crescimento pessoal e por todo o apoio às minhas decisões e à minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Paula Rahal, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela amizade, por todos os ensinamentos, por confiar na minha capacidade e, desta forma, fazer com que eu buscasse pelo melhor em mim. Algumas palavras aqui escritas não poderiam estimar a gratidão que sinto. Você realmente é um exemplo a ser seguido!

"A melhor coisa que você pode fazer por uma pessoa é inspirá-la."

À minha co-orientadora, Dr^a. Marília de Freitas Calmon, pelas risadas, por ter acreditado no meu trabalho desde o início e por todo esforço para que se fizesse possível a implantação de uma nova linha de pesquisa dentro do laboratório. Muito obrigada por me tratar de igual para igual, mesmo sabendo que tenho um longo caminho a percorrer até chegar próxima ao conhecimento que você possui.

"Se você tratar as pessoas como irmãs, elas respondem de acordo."

Aos meus amigos do Laboratório de Estudos Genômicos, Ana Beatriz, André, Bruna, Bruno, Carol Bonfim, Carol Jardim, Cintia, Guilherme, Henrique, Jaqueline, Lucas, Mariana, Marina, Miyuki, Paola, Renata e Tasso pela companhia, por todos os auxílios prestados e por se empenharem em fazer do ambiente de trabalho um lugar confortável e repleto de momentos de diversão. Sem dúvida nenhuma, o sucesso de nossos projetos deve-se à colaboração de todos do laboratório, que pensam e agem como uma verdadeira equipe.

"Seja a mudança que você deseja ver no mundo."

À secretária do Laboratório, Lenira Bueno, pela eficiência e pelo tempo que sempre dedica à resolução de nossos problemas, sempre disposta a nos ajudar. Muito obrigada!

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água do mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Sebaca) por ser extremamente atencioso e minucioso, principalmente quando se trata de auxiliar quem lhe pede. Obrigada por ter aberto as portas de seu laboratório, por ter me dado ótimos conselhos e por passar adiante sua maneira única de enxergar grandes possibilidades.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original."

Ao Luiz Roberto Falleiros Jr., técnico do Laboratório de Microscopia e Microanálise, por todo auxílio prestado – que não foi pouco – e pela incrível capacidade de nos fazer rir de tudo. Muito obrigada por não me deixar abalar quando as coisas não saíam como o esperado e por sempre procurar uma alternativa para os obstáculos ao longo da trajetória.

“Não importa quanta seriedade a vida exija de você, cada um de nós precisa de um amigo brincalhão para se divertir junto”

Gostaria de deixar registrado o meu muito obrigada àqueles do Laboratório de Microscopia e Microanálise que não mediram esforços para que meu trabalho fosse finalizado e que aliaram isso à ótima convivência diária. Muitos que nem me conheciam, mas que realmente me mostraram o significado de “fazer o bem sem olhar a quem”. Agradeço, em especial, Ana Paula, Bianca, Carol Christante, Carol Frandsen, Carol Negrin, Cássia, Cintia, Diego, Elô, Fabi, Maê, Manoel, Mari Marcielo, Mari Pulegio, Mari Zanatelli, Marina, Ricardinho, Silvana, Thiago, Tião e Vanessinha.

A mesma gratidão se aplica a todos do Laboratório de Imunomorfologia, principalmente a Analice, Ayla, Kallyne, Laila, Nathy e Rubens. A vida uniu as pessoas certas no momento certo. Sinto-me em casa na presença de vocês.

“As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem.”

À Profª. Drª. Zulmira Guerrero Marques Lacava por ter me acolhido tão prontamente. Sinto como se já nos conhecêssemos há tempos. Sua simpatia e disposição em ajudar o próximo são incomparáveis. Tenho muita sorte de tê-la encontrado durante o percurso e sei que somente bons frutos surgirão de nossa parceria.

“Seja gentil quando for possível...Sempre é possível.”

À Profª. Drª. Emília Celma de Oliveira Lima, por ter gentilmente cedido a amostra de fluido ferromagnético e por sempre ser tão solícita.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

À Drª. Jane Lopes Bonilha, pela prontidão em analisar todas as amostras necessárias e sempre me receber com um sorriso em seu laboratório.

“Supor é bom, descobrir é melhor.”

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas pela formação e pelos ensinamentos que, com certeza, colaboraram muito para a elaboração deste trabalho e para meu crescimento pessoal.

“Professores há milhares. Mas professor como profissão, não é algo que se define por dentro, por amor. Educador, ao contrário, não é profissão, é vocação. E toda vocação nasce de um grande amor, de uma grande esperança.”

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e aos seus docentes, por estimularem nossa busca pelo conhecimento e serem exemplos admiráveis de profissionais.

“Ninguém educa ninguém. Ninguém se educa a si mesmo. Os homens se educam entre si, mediatizados pelo mundo.”

Aos membros da pré-banca e banca examinadora, Dr. Fernando Lucas Primo, Dr. José Geraldo Nery e Dr^a. Patrícia Simone Leite Vilamaior, pela disponibilidade em participar do enriquecimento e finalização deste trabalho.

“Não devemos permitir que alguém saia da nossa presença sem se sentir melhor consigo mesmo.”

A todos os amigos da faculdade que, de alguma forma, fizeram parte desta etapa da minha vida. Obrigada pela ajuda sempre imediata e por todo o carinho e companheirismo. Um agradecimento especial a Mari Franco, Mari Sabbag, Mari Zanatelli, Pablo, Val, Vanessa e Yuri pelo grande afeto que se faz presente mesmo com a distância. Obrigada pela amizade tão valiosa que descobri em vocês. Significam muito para mim.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Às minhas companheiras do “apê 24”, Ana e Bia, que compreendem a pressão e os dias de cansaço que se tornam presentes algumas vezes durante a pós-graduação. Obrigada por tornarem o convívio tão fácil e por passarem comigo o período de maior ganho em conhecimento e experiências que tive. Foram meu lar em Rio Preto.

“A única amizade que vale é a que nasceu sem razão.”

Aos meus amigos, Amanda, Arthur, Bruno, Caio, Camila, Cintia, Fábio, Fer, Gabo, Léo, Livia, Mário, Mayara, Naty, Nayara, Pinceta, Renato e Thá. Nada resume melhor a importância de vocês do que dizer que são a família que escolhi. Sempre presente, mesmo com a distância. A alegria que a companhia de vocês me traz é indiscutível e inigualável. Conservar os velhos amigos é realmente melhor do que fazer novos. Tenho a certeza de que é amizade inabalável e que cada detalhe que nos une se torna mais forte a cada dia.

“A gente não faz amigos, reconhece-os.”

Mais uma vez e para sempre serei grata aos meus pais, Amaury e Neucir, por terem me ensinado que dar sempre o melhor de si vale a pena. Vocês continuam sendo os principais responsáveis pelas minhas conquistas e pelas minhas escolhas acertadas. Espero que um dia se orgulhem tanto de serem meus pais quanto me orgulho de ser sua filha. É imensurável o tamanho do meu amor por vocês!

“Há pais que gostam de dar presentes. Há pais que gostam de estar presentes.

Há pais que investem para os filhos. Há pais que investem nos filhos.

Há pais que deixam de herança valores em reais. Há pais que deixam de herança valores reais.”

Às minhas irmãs, Fer e Bru, pela torcida, pelas palavras de incentivo e pelo carinho que sempre recebi. Cada uma com seu jeito especial, incondicionalmente ao meu lado. Estarão eternamente em meus melhores pensamentos. Vocês são meu passado, presente e futuro. Amo vocês.

“O que é um irmão? Uma única alma habitando dois corpos.”

À minha avó Yolanda, porque sem ela meu mundo ficaria tão vazio e cinzento. Sempre acreditando em mim, independente dos meus deslizes. Meu porto seguro. A melhor pessoa que conheço e de uma bondade infinita. Sou extremamente abençoada por ser sua neta. Você é incomparável e eu te amo muito. Você nem imagina o quanto!

“Não acrescente dias à sua vida, mas vida aos seus dias.”

Aos meus tios, “Dica” e Rita, pelo incentivo e por estarem sempre presentes em minha vida. Tenho um grande respeito e amor por vocês.

“Só tios podem abraçar como pais, guardar segredos como irmãos, dar conselhos como amigos e permitir travessuras como avós.”

Ao Evandro, meu sempre amigo, o melhor de todos! O amor da minha vida e a pessoa com quem mais gosto de conversar. Esta é mais uma etapa que completo ao seu lado. Obrigada por me fazer acreditar que você é a pessoa certa que estará junto a mim nos momentos incertos. Você me faz feliz, muitas vezes sem motivo óbvio. Em minha opinião, esse tipo de felicidade é a forma mais autêntica de todas e a que você, e só você, me proporciona! Te amo demais!

"O amor só é lindo quando encontramos alguém que nos transforma no melhor que podemos ser."

À FAPESP, pelo suporte financeiro concedido nas formas de bolsa de Mestrado e reserva técnica (processo nº 2010/14001-0).

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora e a beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."

E, por fim, a Deus, por iluminar meus passos e pelas graças recebidas diariamente.

"Se eu creio em Deus e Deus existe, eu ganhei tudo.

Se eu creio em Deus e Deus não existe, eu não perdi nada.

Se eu não creio em Deus e Deus não existe, eu não ganhei nada.

Se eu não creio em Deus e Deus existe, então eu perdi tudo."

*“Conta certa lenda, que estavam duas crianças patinando num lago congelado.
Era uma tarde nublada e fria, e as crianças brincavam despreocupadas.
De repente, o gelo quebrou e uma delas caiu, ficando presa na fenda que se formou.
A outra, vendo seu amiguinho preso, e se congelando, tirou um dos patins e começou a
golpear o gelo com todas as suas forças, conseguindo por fim, quebrá-lo e libertar o amigo.
Quando os bombeiros chegaram e viram o que havia acontecido, perguntaram ao menino:
- Como você conseguiu fazer isso? É impossível que tenha conseguido quebrar o gelo, sendo
tão pequeno e com mãos tão frágeis!
Nesse instante, um ancião que passava pelo local, comentou:
- Eu sei como ele conseguiu.
Todos perguntaram:
- Pode nos dizer como?
- É simples - respondeu o velho.
- Não havia ninguém ao seu redor para lhe dizer que não seria capaz.”*

Albert Einstein

RESUMO

O carcinoma oral epidermóide é a neoplasia mais frequente da cavidade bucal, representando, aproximadamente, 90% dos cânceres orais. A maioria das pessoas com câncer bucal realiza diagnóstico em estádios avançados quando o prognóstico é ruim e, conseqüentemente, a terapia é incerta com possibilidades de cura reduzidas. Sendo assim, o tratamento deste câncer envolve a utilização de recursos terapêuticos complexos, com resultados estéticos e fisiológicos pouco promissores. Portanto, outras terapias são almejadas a fim de reverter o quadro insatisfatório de qualidade de vida, amenizando os efeitos colaterais. Para isso, a nanoterapia aplicada ao tratamento do câncer tem-se desenvolvido rapidamente e nanopartículas, como as de óxidos de ferro, vem demonstrando vantagens sobre outros carreadores, sendo o tratamento do câncer por meio de hipertermia uma aplicação bastante visada. Portanto, o objetivo do trabalho foi investigar a citotoxicidade das nanopartículas magnéticas de ferro revestidas por polifosfato em linhagem celular de câncer de assoalho de boca (UM-SCC14A) e sua ação em carcinoma oral *in vivo*. As células foram incubadas com nanopartículas em diferentes concentrações ($0,35$; $0,7$ e $1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL) e, em seguida, foram realizadas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de luz, microscopia de fluorescência e ensaio de viabilidade celular. Os diferentes ensaios mostraram que apenas a incubação com $1,4 \times 10^{15}$ partículas desencadeou processo apoptótico significativo, refletindo alterações morfológicas e menor viabilidade celular. Sendo assim, a concentração de $0,7 \times 10^{15}$ partículas foi escolhida para os experimentos *in vivo*, já que não demonstrou caráter tóxico expressivo. Após os experimentos *in vitro*, trinta hamsters sírios foram divididos igualmente em cinco grupos, sendo um grupo controle normal no qual não foi induzido tumor. No restante dos animais foi feita a indução de câncer oral por meio da aplicação do carcinógeno DMBA na bochecha direita dos hamsters, resultando no desenvolvimento de carcinoma espinocelular oral. Os demais grupos com tumor foram tratados com nanopartículas. Dentre estes animais, um grupo foi tratado exclusivamente desta forma e outros dois grupos foram separados para combinar a terapia de nanopartículas à exposição a um campo magnético capaz de gerar hipertermia. Um grupo foi eutanasiado um dia pós-tratamento e outro grupo após sete dias. Os tecidos da cavidade oral foram corados com Hematoxilina-Eosina e Azul da Prússia, bem como seus corações, pulmões, fígados, rins e baços. Foram feitas imunocitoquímicas do tecido oral para os anticorpos PCNA e caspase-3 ativada, marcadores de proliferação celular e apoptose, respectivamente; e o sangue dos

animais foi retirado, para análise dos leucogramas. O grupo não tratado e os animais tratados somente com nanopartículas apresentaram carcinoma espinocelular oral *in situ* com diversas mitoses atípicas e presença de infiltrado mononuclear. Entretanto, os animais tratados com nanopartículas associadas à hipertermia como terapia demonstraram regressão do câncer, atestada pelas análises histopatológicas, imunocitoquímicas e pela quantidade normalizada de leucócitos. Dessa forma, a hipertermia mediada por tais nanopartículas é bastante encorajadora, sendo necessários mais estudos que visem à melhoria das abordagens terapêuticas atuais e ao entendimento dos mecanismos sistêmicos dessas nanopartículas, aperfeiçoando as técnicas disponíveis, especialmente em cânceres que carecem maior atenção, como o carcinoma oral.

Palavras-chave: Carcinoma oral, UM-SCC14A, Hamster sírio, Nanopartículas magnéticas de ferro revestidas por polifosfato, Magneto-hipertemia.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma is the most common neoplasm of the oral cavity, representing, approximately, 90% of oral cancers. Most people affected by oral cancer performs the diagnosis in advanced stages when the prognosis is poor and, therefore, therapy is uncertain with reduced chances of healing. Thus, treatment of this cancer involves the use of complex therapeutic resources, with hardly promising aesthetic and physiological results. Therefore, other therapies are desired to reverse the unsatisfactory quality of life, minimizing side effects. For this, nanotherapy applied to the treatment of cancer has developed rapidly and nanoparticles, such as iron oxides, have shown advantages over other carriers, being cancer treatment by hyperthermia quite an application newsworthy. So, the aim of this study was to investigate the cytotoxicity of iron magnetic nanoparticles coated with polyphosphate in cancer cell line from the floor of mouth (UM-SCC14A) and its action on oral carcinoma *in vivo*. Cells were incubated with nanoparticles at different concentrations (0.35 , 0.7 and 1.4×10^{15} particles/mL) and, then, were performed transmission electron microscopy, light microscopy, fluorescence microscopy and viability assay. Different tests have shown that only incubation with 1.4×10^{15} particles triggered significative apoptotic process reflecting morphological changes and reduced cell viability. Thereby, the concentration of 0.7×10^{15} particles has been chosen for the experiments *in vivo*, as demonstrated no expressive toxic character. After the *in vitro* experiments, thirty Syrian hamsters were divided into five groups, with a normal control group in which no tumor was induced. In the remaining animals was induced oral cancer by applying the carcinogen DMBA on the hamsters' right cheek, resulting in the development of oral squamous cell carcinoma. The other groups with tumor were treated with nanoparticles. Among these animals, one group was treated solely in this way and two other groups were separated to combine therapy nanoparticles exposure to a magnetic field capable of generate hyperthermia. One group was euthanized one day post-treatment and another group after seven days. The tissues of the oral cavity were stained with Hematoxylin-Eosin and Prussian blue, as well as their hearts, lungs, livers, kidneys and spleens. Were performed immunocytochemistry for PCNA and activated caspase-3 antibodies, markers of cell proliferation and apoptosis, respectively; and the animals' blood was withdrawn and analyzed their white cell counts. The untreated group and the animals treated with nanoparticles showed oral squamous cell carcinoma *in situ* with several atypical mitosis and presence of mononuclear cell infiltrates. However, animals treated with nanoparticles

associated with hyperthermia demonstrated cancer regression, confirmed by histopathologic and immunocytochemistry analysis and the normalized amount of total leukocytes. As a result, this nanoparticle-mediated hyperthermia is quite encouraging, however more studies are needed in order to advance the current therapeutic approaches and understand the systemic mechanisms of these nanoparticles, improving the available methodologies, especially in cancers that reflect the greater need of attention, as the oral carcinoma.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, UM-SCC14A, Syrian hamster, Iron magnetic nanoparticles coated with polyphosphate, Magnetohyperthermia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Hamsters sírios representando os grupos experimentais do estudo	37
Figura 2. Campo magnético de frequência alternada e metodologia utilizada	37
Figura 3. Caracterização das nanopartículas de maguema revestidas por polifosfato provenientes do fluido ferromagnético	43
Figura 4. Análise morfológica da linhagem celular UM-SCC14A	46
Figura 5. Análise ultraestrutural da linhagem celular UM-SCC14A	48
Figura 6. Ensaio de apoptose da linhagem celular UM-SCC14A	50
Figura 7. Percentual de viabilidade celular na linhagem UM-SCC14A avaliada por ensaio MTT	52
Figura 8. Análise biométrica dos hamsters sírios	53
Figura 9. Histopatologia dos cortes dos tecidos da cavidade oral direita dos hamsters	56
Figura 10. Fotomicrografias de tecido da cavidade oral esquerda dos hamsters	58
Figura 11. Fotomicrografias do fígado dos hamsters	59
Figura 12. Fotomicrografias do coração dos hamsters	60
Figura 13. Fotomicrografias do pulmão dos hamsters	61
Figura 14. Fotomicrografias dos rins dos hamsters	62
Figura 15. Fotomicrografias do baço dos hamsters	63
Figura 16. Análise morfométrica do epitélio da cavidade oral direita dos hamsters	64
Figura 17. Análise morfométrica da queratina da cavidade oral direita dos hamsters.....	65
Figura 18. Imunocitoquímica para marcação de proliferação celular (PCNA)	67
Figura 19. Imunocitoquímica para marcação de apoptose (caspase-3 ativada)	69
Figura 20. Contagem de leucócitos totais do sangue dos hamsters	71
Figura 21. Contagem de linfócitos do sangue dos hamsters	72
Figura 22. Contagem de neutrófilos do sangue dos hamsters	73
Figura 23. Contagem de eosinófilos do sangue dos hamsters	74
Figura 24. Contagem de monócitos do sangue dos hamsters	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm: Centímetro

cm²: Centímetro quadrado

cm³: Centímetro cúbico

CO₂: Dióxido de carbono

DAB: Diaminobenzidina

DMBA: 7,12-dimetilbenz(a)antraceno

DMSO: Dimetilsulfóxido

et al.: e outros

Fe: Ferro

Fe₃O₄: Magnetita

FFM: Fluido ferromagnético à base de nanopartículas magnéticas de maguemitas recobertas com polifostato de sódio

HCl: Ácido clorídrico

HE: Hematoxilina-eosina

HPV: *Human papillomavirus* (papilomavírus humano)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

MCL: *Magnetic cationic liposomes* (lipossomos catiônicos magnéticos)

MEM: Meio essencial mínimo

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

mL: Mililitro

mm³: Milímetro cúbico

mS: Milissegundo

MTT: 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromídeo

mV: Milivolt

nm: Nanômetro

PBS: *Phosphate buffered saline* (tampão salino de fosfato)

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen* (antígeno nuclear de proliferação celular)

PdI: *Polydispersity index* (índice de polidispersão)

pH: Potencial de hidrogênio

rpm: Rotações por minuto

s: Segundo

SFB: Soro fetal bovino

U: Unidades

UM-SCC14A: Linhagem celular de câncer de assoalho de boca (carcinoma escamoso oral)

UV: Ultravioleta

V: Volt

γ -Fe₂O₃: Maguemitita

μcm: Microcentímetro

μg: Micrograma

μL: Microlitro

°C: Grau Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Câncer oral	20
1.2 Experimentação <i>in vitro</i> ligada ao estudo do câncer oral	21
1.3 Modelo animal para tratamento de câncer oral	23
1.4 Nanobiotecnologia e tratamento do câncer	24
1.5 Tratamento do câncer envolvendo hipertermia mediada por nanopartículas magnéticas	26
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas de ferro	29
3.2 Linhagem celular de câncer UM-SCC14A	30
3.3 Incubação das nanopartículas na linhagem celular de câncer UM-SCC14A	31
3.4 Métodos de avaliação da internalização e citotoxicidade das nanopartículas magnéticas de ferro <i>in vitro</i>	32
3.4.1 Análise da morfologia da linhagem celular UM-SCC14A pós-incubação com o FFM	32
3.4.2 Análise da ultraestrutura da linhagem UM-SCC14A e verificação da internalização das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão	33
3.4.3 Ensaio de apoptose	34
3.4.4 Ensaio MTT	34
3.5 Experimentação <i>in vivo</i>	35
3.5.1 Animais	35
3.5.2 Delineamento experimental e tratamento <i>in vivo</i> combinando nanopartículas à hipertermia	36
3.5.3 Processamento histológico	38
3.5.4 Avaliação dos cortes pela coloração Hematoxilina-eosina e por sua combinação ao Azul da Prússia	38
3.5.5 Análise morfométrica populacional	39
3.5.6 Imunocitoquímica para avaliação da proliferação celular (PCNA)	39
3.5.7 Imunocitoquímica para avaliação da apoptose induzida pelo tratamento (caspase-3 ativada)	40
3.6 Análise da série branca sanguínea	41

3.6.1 Avaliação da contagem global de leucócitos	41
3.6.2 Avaliação da contagem diferencial de leucócitos	41
3.7 Análises estatísticas	42
4. RESULTADOS	42
4.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas de ferro <i>in vitro</i>	42
4.2 Métodos de avaliação da internalização e citotoxicidade das nanopartículas	44
4.2.1 Análise da morfologia da linhagem celular UM-SCC14A pós-incubação com o FFM	44
4.2.2 Análise da ultraestrutura da linhagem UM-SCC14A e verificação da internalização das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão	46
4.2.3 Ensaio de apoptose	49
4.2.4 Ensaio MTT	51
4.3 Experimentação <i>in vivo</i>	52
4.3.1 Avaliação biométrica	52
4.3.2 Avaliação dos cortes de tecido oral pela coloração Hematoxilina-eosina	53
4.3.3 Avaliação dos demais tecidos pela coloração Hematoxilina-eosina e por sua combinação ao Azul da Prússia	57
4.3.4 Análise morfométrica populacional	63
4.3.5 Imunocitoquímica para avaliação da proliferação celular (PCNA)	65
4.3.6 Imunocitoquímica para avaliação da apoptose induzida pelo tratamento (caspase-3 ativada)	68
4.4 Análise da série branca sanguínea	70
4.4.1 Avaliação da contagem global de leucócitos	70
4.4.2 Avaliação da contagem diferencial de leucócitos	71
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	112

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer oral

Os carcinomas de cabeça e pescoço correspondem, mundialmente, a 10% dos tumores malignos, ocupando o sexto lugar entre os mais prevalentes (TOLEDO et al., 2010). Cerca de 40% destes cânceres ocorrem na cavidade oral, sendo que 90% destes últimos são epidermóides (também denominados escamosos) (MARCU; YEOH, 2009; GRIMM et al., 2012) e a porcentagem restante refere-se a sarcomas, melanomas e tumores malignos de glândulas salivares (VASCONCELOS, 2006).

Apresenta uma distribuição variável nas diferentes regiões do mundo (GUERRA; MOURA-GALLO; MENDONÇA, 2005; KANETO, 2007), sendo mais recorrente em países desenvolvidos (MARUR; FORASTIERE, 2008; RUBACK et al., 2012). No Brasil, em estudos conduzidos a fim de investigar a ocorrência de câncer de boca na população, verificou-se que a maior taxa de incidência encontrava-se no estado de São Paulo (WUNSCH FILHO, 2002; ALVARENGA et al., 2008).

Para o ano de 2012, foram estimados dez mil novos casos deste tipo tumoral em homens e aproximadamente quatro mil novas ocorrências para mulheres (INCA, 2012 a). A maioria das pessoas acometidas pelo câncer oral tem idade superior a 45 anos, porém, ao longo da última década, houve um aumento significativo deste câncer entre indivíduos mais jovens, que está diretamente relacionado à crescente realidade de fumantes e alcoólatras numa faixa etária precoce (GILLISON et al., 2008; HENNESSEY; WESTRA; CALIFANO, 2009).

Dessa forma, os dois principais fatores de risco relacionados ao carcinoma oral são o tabagismo e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas (BROTHWELL; ARMSTRONG, 2004; CHIN et al., 2004; WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND; SCULLY, 2005; BUNNELL et al., 2010), existindo um efeito sinérgico entre esses fatores etiológicos e uma relação diretamente proporcional da quantidade e tempo de exposição com o grau patológico (KERR; CRUZ, 2002; FIOCRUZ, 2011; IBCC, 2012).

Entretanto, outros fatores também têm sido associados ao desenvolvimento do câncer oral, incluindo agentes biológicos, como o papilomavírus humano (HPV), fator que vem aumentando sua significância exponencialmente (VIDAL et al., 2006; THOMISON; THOMAS; SHROYER, 2008; CHUANG et al., 2012; INCA, 2012 b), além da higiene oral precária, dieta pobre em vegetais e frutas, história pregressa de neoplasia do trato digestivo e exposição excessiva à luz ultravioleta (PAVIA et al., 2006; MARTINS et al., 2008; PETERS et al., 2008; REZENDE et al., 2008; PRADO; PASSARELLI, 2009).

A maioria dos casos é diagnosticada em estágios clínicos avançados, quando o prognóstico é ruim e, conseqüentemente, a terapia é mais complexa e as possibilidades de cura são reduzidas (MACPHERSON et al., 2003; LEÃO et al., 2005; ZYGOGIANNI et al., 2011), sendo que o carcinoma oral possui uma das mais baixas taxas de sobrevida em cinco anos dentre os principais tipos de câncer, incluindo pele, mama, próstata e colo de útero (RAJENDRAN; SIVAPATHASUNDHARAM, 2006; BYAKODI et al., 2012). O diagnóstico precoce é crucial para a melhoria das taxas de sobrevida, possibilitando uma abordagem terapêutica conservadora, de recuperação mais rápida e prognóstico favorável. No entanto, esse caráter preventivo não é verificado na grande maioria dos casos (KUJAN et al., 2006; MAURICIO et al., 2009; DEVADIGA; PRASAD, 2010; SOUZA et al., 2012).

Portanto, o tratamento do câncer oral envolve a utilização de recursos terapêuticos complexos e de alto custo, com resultados estéticos pouco satisfatórios que implicam, conseqüentemente, no comprometimento social do paciente. Esse fato é devido às ressecções cirúrgicas combinadas aos tratamentos radioterápicos e quimioterápicos que originam mutilações na região de cabeça e pescoço (CANTO; HOROWITZ; CHILD, 2002; ARGIRIS et al., 2008; GANLY et al., 2012). Sendo assim, outras terapias são almejadas a fim de reverter o quadro insatisfatório de qualidade de vida, amenizando os efeitos colaterais e aperfeiçoando as técnicas já existentes (FALCÃO et al., 2010).

1.2 Experimentação *in vitro* ligada ao estudo do câncer oral

De acordo com o exposto acima, estudos que visem averiguar o padrão envolvido na carcinogênese deste tipo tumoral por meio de avaliações *in vitro* e *in vivo* são importantes para o desenvolvimento de estratégias eficientes de combate a esta doença. Devido à grande quantidade de estudos toxicológicos que a situação atual exige, o novo quadro legal apóia o desenvolvimento de métodos alternativos à experimentação animal, segundo a filosofia dos 3 R's (reduzir, reutilizar e reciclar). Esta circunstância representa uma oportunidade excepcional para a melhoria e a concepção de novas estratégias metodológicas para a avaliação toxicológica de nanocompostos, livres das variações sistêmicas que ocorrem dentro do organismo durante a homeostase normal, com destaque para estudos envolvendo o câncer (HENGSTLER et al., 2006; REINA, 2006).

Neste contexto, as culturas de células revelam-se um interessante campo, considerando o amplo espectro de metodologias disponíveis para avaliação toxicológica. Supondo que os efeitos tóxicos vistos em um organismo inteiro sejam devidos a falhas prévias das funções celulares básicas (EISENBRAND et al., 2002), estudos da citotoxicidade oferecem um bom

consenso entre o uso de métodos alternativos e a elucidação de mecanismos de ação tóxica, mesmo que estas abordagens sejam reducionistas da toxicidade aguda *in vivo* (FREIRE et al. 2009).

Dessa forma, as células de carcinoma escamoso oral, UM-SCC14A, que embora sejam um clássico exemplo de linhagem celular imortalizada decorrente de atividade alterada da telomerase, sendo utilizada em diferentes tipos de experimentos que investigam a biologia do câncer oral (LOTEMPPIO et al., 2005; CALMON et al., 2009; COHEN et al., 2009; SUBRAMANYA et al., 2010), nunca foi avaliada na presença de nanopartículas semelhantes às sintetizadas e analisadas pelo presente estudo.

Tais células crescem e se dividem de modo indefinido *in vitro* enquanto as condições ideais de manutenção são sustentadas. Além disso, tratam-se de células aderentes que perderam o caráter de inibição por contato, tendo a capacidade característica de desenvolvimento de células oncogênicas, acumulando-se em densidades superiores à da monocamada normal (CREE, 2011).

Portanto, essas características das linhagens celulares que mimetizam fielmente um ambiente comprometido por processo carcinogênico e que remetem às suas células tumorais de origem são as melhores opções para estudos iniciais (LANGDON, 2003) como, por exemplo, os que visem à verificação de caráter citotóxico de nanocompostos. Assim, as células que hoje são estudadas *in vitro*, servem de parâmetro e comparação ao tecido do qual foram retiradas, facilitando a visualização da resposta aos tratamentos aos quais são submetidas e tornando-se de grande valia já que esses testes são mais simples, rápidos, rentáveis e não levantam problemas éticos quando comparados a estudos *in vivo* (MAHMOUDI et al., 2010 a; 2010 b).

Não obstante, é de nítida imperatividade e não pode ser descartada a enorme importância da experimentação de novas abordagens terapêuticas em modelos animais por meio de testes prévios aos testes pré-clínicos e clínicos em humanos (HOGENESCH; NIKITIN, 2012). A fim de obter resultados confiáveis sobre a citotoxicidade das nanopartículas magnéticas de ferro revestidas por polifosfato de sódio, estudos sobre seus efeitos devem ser realizados em diferentes modelos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

1.3 Modelo animal para tratamento de câncer oral

Não existe uma única linhagem de células ou modelo *in vivo* de câncer que fielmente prediz a eficácia de fármacos anticancerígenos em ensaios clínicos humanos. Abordagens de cultura de células oferecem a vantagem de que as linhagens podem ser derivadas de origem humana ou fragmentos de tecido de tumores primários, mas não é capaz de imitar a complexidade da interação mútua entre o crescimento do tumor e o microambiente co-evoluindo (BARABASI; GULBAHCE; LOSCALZO, 2011).

Já um modelo animal experimental ideal de câncer humano apresenta mecanismos moleculares comuns ao tipo tumoral humano, tem patologia semelhante à neoplasia de interesse e mostra a progressão cancerosa, incluindo suas alterações metastáticas e respostas terapêuticas e imunes que se assemelham às dos pacientes (FRESE; TUVESON, 2007). Sendo assim, como alternativa às limitações significativas do estudo do câncer por meio de xenoenxertos, estão as linhagens de hamsters nas quais os cânceres são desenvolvidos espontaneamente (HARDISTY, 1985) ou por meio de indução, que pode ser decorrente de agentes químicos (BALMAIN; PRAGNELL, 1983), radiação (VAN KRANEN, 1995), vírus patogênicos (CARDIFF; KENNEY, 2007), outros microorganismos (ENNO et al., 1995) ou abordagens envolvendo manipulações genéticas (JONKERS; BERNIS, 2002).

Um dos exemplos clássicos de carcinogênese química é a indução de tumores orais em hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) por um protocolo de tratamento com aplicação tópica de 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) (HSUE; CHEN; LIN, 2008; CHEON; ORSULIC, 2011). Neste caso, os tumores originados na mucosa progridem para carcinomas *in situ* de células escamosas (WANG et al., 2008). Apesar de variações anatômicas e histológicas entre a mucosa da cavidade oral dos hamsters e o tecido bucal humano, os protocolos de carcinogênese experimental para induzir as mudanças pré-malignas e carcinomas assemelham-se aos que ocorrem durante o desenvolvimento análogo na mucosa oral humana (CHEN; HSUE; LIN, 2005).

Então, espera-se que os dados de indução de câncer e de tratamento do mesmo possam simular o regime experimental em humanos, traduzindo um imenso potencial para avanços futuros na medicina. Portanto, se o modelo animal for bem sucedido quando estabelecido, pode demonstrar como o organismo reagiria a diferentes estímulos positivos ou negativos, o que seria impossível de se visualizar em pacientes antes de testes pré-clínicos e clínicos (FRESE; TUVESON, 2007).

Uma abordagem de experimentação envolvendo cultivo celular de uma variedade de linhagens de células humanas combinada a testes *in vivo* em um modelo experimental que se

aproxime do tumor humano alvo apresenta uma maior chance de sucesso em prever a eficácia de novos tratamentos de câncer em humanos (TALMADGE et al., 2007; BONO, ASHWORTH, 2010). Portanto, a junção do estudo *in vitro* a este modelo de hamster sírio demonstra-se particularmente interessante para realização de testes envolvendo indução de câncer oral e verificação da resposta a diferentes tratamentos, já que este modelo animal apresenta características fenotípicas desejadas para a pesquisa em questão.

1.4 Nanobiotecnologia e tratamento do câncer

O conceito de medicina personalizada tem sido defendida como a próxima fronteira em desenvolvimento de tratamento de tumores sólidos (MAITLAND; SCHILSKY, 2011). Tradicionalmente, o tratamento de tumores orais tem-se baseado na combinação de redução cirúrgica e radioterapia ou quimioterapia citotóxicas para melhorar os resultados em pacientes com malignidades na região bucal. Ao contrário de muitas outras subespecialidades oncológicas, no entanto, as taxas de recidiva e sobrevida global melhoraram apenas modestamente ao longo das últimas décadas, apesar da contínua procura por novos regimes terapêuticos (CROZIER; SUMER, 2010; RUBACK et al., 2012). Dessa forma, espera-se que a identificação e utilização de agentes direcionadores levem a um tratamento individualizado que, por sua vez, conduzirá a resultados significativamente melhores, manifestados por mais curas e melhor qualidade de vida por meio de amenização da toxicidade (ROBERTS et al., 2011).

Com este intuito, a aplicação da nanotecnologia na área biológica, também denominada nanobiotecnologia, tem-se mostrado bastante promissora (JAIN, 2012) e vem contribuindo para a superação das limitações no tratamento de diferentes doenças, principalmente do câncer (PANKHURST et al., 2003). No que concerne ao tratamento do câncer, alguns problemas como o fato de muitos fármacos serem lipossolúveis e apresentarem baixa biodisponibilidade podem ser resolvidos com o uso de carreadores nanoestruturados (WANG; CHUI; HO, 2011; YANG et al., 2012). Nanopartículas magnéticas recobertas com monooleato de glicerol, por exemplo, ao serem associadas ao paclitaxel, aumentaram a meia vida do fármaco de cinco horas para mais de 15 horas (SINGH et al., 2011).

Aumentando a biodisponibilidade do fármaco e o acúmulo no tumor, a nanotecnologia se destaca por propiciar um aumento na eficácia terapêutica e uma redução da toxicidade da terapia em tecidos saudáveis (WERNER et al., 2012). Existem vários tipos de nanocarreadores que podem ser utilizados para se alcançar esses objetivos, tais como os lipossomos (CARNEIRO et al., 2011; SERWER et al., 2011), dendrímeros (WARD et al.,

2011), nanotubos de carbono (JI et al., 2012) e nanocompostos metálicos, como as nanopartículas magnéticas (JAIN et al., 2012).

Características interessantes podem ser encontradas nas nanopartículas de ferro. Além de serem importantes agentes de contraste na ressonância magnética, podem se apresentar como agentes de imagem multifatoriais ou responsáveis por terapia combinada a diagnóstico (CHUNFU et al., 2004; LACAVA; MORAIS, 2004; HEATH; DAVIS, 2008). Estes nanocompostos magnéticos podem ser constituídos de diferentes ferritas, como as de ferro, manganês, zinco e cobalto, sendo as mais comuns as de óxido de ferro magnetita (Fe_3O_4) e maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Devido ao tamanho em escala nanométrica, as nanopartículas de ferro exibem propriedades magnéticas diferentes dos materiais em escala micro ou macroscópicas (PISON et al., 2006).

Em tamanhos variando entre 10 e 20nm, cada nanopartícula se torna um domínio único carregado eletricamente que apresenta características superparamagnéticas, comportando-se como um átomo gigante paramagnético que responde rapidamente a um campo magnético, mas com coercividade e magnetismo residual quase nulos (MOGHIMI; HUNTER, MURRAY, 2005).

As nanopartículas de ferro utilizadas na nanobiotecnologia e nanomedicina recebem uma cobertura biocompatível que tem o objetivo de estabilizá-las, propiciando uma funcionalização dependendo da aplicação desejada que proteja contra a degradação em um ambiente fisiológico (GUPTA; GUPTA, 2005; LU; SALABAS; SCHUTH, 2007). Várias moléculas têm proporcionado essas características, como o ácido dimercapto-succínico (DMSA) (VALOIS et al., 2010) e diferentes polímeros (ARSALANI et al., 2012; AZBARZADETH et al., 2012) que permitem ainda a ligação química de moléculas direcionadoras como, por exemplo, anticorpos monoclonais (ACHARYA; DILNAWAZ; SAHOO, 2009).

Nanopartículas de magnetita recobertas com dextran (LACAVA, 2004) ou ácido poliaspártico (SADEGHIANI, 2004) e maguemitas revestidas por polifosfato (PORTILHO-CORRÊA, 2007) ou citrato (BRUGIN, 2007) mostraram resultados promissores quanto ao seu potencial biomédico. No entanto, nem sempre os revestimentos apresentam uma resposta favorável, como no caso das nanopartículas magnéticas iônicas de ferrita de manganês recobertas com citrato (LACAVA et al., 1999 a) e com tartarato (LACAVA et al., 1999 b), que injetadas intraperitonealmente em camundongos, provocaram alta toxicidade e mutagenicidade, não sendo consideradas biocompatíveis.

No entanto, uma vez biocompatíveis, as nanopartículas magnéticas demonstram um vasto campo de aplicação biomédica e vem sendo amplamente utilizadas no tratamento do câncer, como carreadores de quimioterápicos (TEDESCO, 2006; CARNEIRO et al., 2011; ESTEVANATO et al., 2011) e em terapia fotodinâmica (PRIMO et al., 2008). Além disso, devido ao núcleo de ferro, as nanopartículas magnéticas são adequadas para o tratamento por magneto-hipertermia (GUEDES et al., 2004; BALIVADA et al., 2010; PORTILHO et al., 2010).

Diante do exposto, pode-se perceber que o direcionamento de agentes terapêuticos é viável, mesmo que de forma passiva, já que as nanopartículas podem se acumular normalmente no tumor devido à maior permeabilidade e retenção, características do tecido canceroso (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002). Isso ocorre porque o rápido crescimento do câncer requer grandes quantidades de nutrientes que não é suportado pelos vasos sanguíneos adjacentes, fazendo com que a formação de novos vasos seja induzida. Do mesmo modo, devido à ausência de vasos linfáticos, a saída de moléculas do tumor é diminuída, fazendo com que as nanopartículas permaneçam por mais tempo no local (PARVEEN; SAHOO, 2006; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). Pelas razões descritas acima, o tratamento do câncer por meio de nanopartículas magnéticas é uma alternativa que se torna cada vez mais possível, especialmente quando combinada à hipertermia.

1.5 Tratamento do câncer envolvendo hipertermia mediada por nanopartículas magnéticas

Para a maioria dos pacientes, a cirurgia ainda é a metodologia mais recomendada como tratamento para diversos tipos de câncer (PURUSHOTHAM; LEWISON; SULLIVAN, 2012; WEI; HARARI, 2012), porém, a fim de aumentar a eficiência dos procedimentos cirúrgicos, utilizam-se atualmente terapias adjuvantes como a radioterapia (DELANEY et al., 2005) e a quimioterapia (BASKAR et al., 2012). No delineamento do tratamento para o câncer oral não é diferente; no entanto, o tipo de abordagem terapêutica depende, em sua grande maioria, do estadiamento da doença, tamanho do tumor e fatores pessoais, como idade e comprometimento social decorrente de mutilações na área da cabeça e pescoço do indivíduo (INCA, 2012 b).

Contudo, a eficiência destas metodologias terapêuticas não depende apenas dos agentes antineoplásicos utilizados, mas também da maneira como são entregues aos tecidos e células cancerígenas alvos (ALEXIOU et al., 2000; 2003), já que ambas terapias podem danificar consideravelmente os tecidos normais (TSENG et al., 2007). O surgimento de

efeitos adversos, como o fato de acarretar toxicidade sistêmica que se torna mais evidente à medida que o tratamento aumenta, é a confirmação do caráter generalizado que essas terapias desempenham (NIE et al., 2007; RIBEIRO et al., 2012).

Por essas razões, métodos alternativos que apresentam maior especificidade para os tecidos neoplásicos e/ou possam ser utilizados como adjuvantes às terapias convencionais têm sido, nas últimas décadas, um importante foco dos estudos científicos, como, por exemplo, o uso da hipertermia (MORNET et al., 2004).

A lógica subjacente à hipertermia é o fato de que as temperaturas entre 40 e 44°C são citotóxicas e menos toleradas pelas células tumorais do que pelas células saudáveis (JORDAN et al., 2001; RIEHEMANN et al., 2009), especialmente em ambientes com condições de hipóxia e valores de pH baixos que normalmente são encontrados nos tecidos tumorais devido à perfusão sanguínea insuficiente e pela incapacidade de expelir apropriadamente os produtos derivados do metabolismo anaeróbico (VAN DER ZEE, 2002). O aumento da temperatura ataca principalmente as células ácidas uma vez que essas apresentam membrana plasmática mais frágil que as células normais, bem como apresentam alterações de permeabilidade (GUFFY et al., 1982).

Além disso, a hipertermia interfere diretamente na vida das células malignas provocando necrose por efeito físico interferindo na membrana plasmática, no núcleo e no citoesqueleto. A oxidação sistêmica interfere em várias vias de transdução de sinais aumentando a apoptose, diminuindo a proliferação celular maligna e provocando antiangiogênese. Da maior relevância é que todos esses resultados podem aparecer nos mais variados tipos de tumores, isto é, independente de sua classificação. Seus benefícios sobre as terapias clássicas são, principalmente, a acessibilidade a diferentes tipos de tumores, especificidade induzida e redução dos efeitos colaterais (MILLERON; BRATTON, 2007; CHERUKURI; GLAZER; CURLEY, 2010).

A hipertermia combinada à nanotecnologia, também chamada de magneto-hipertermia, baseia-se no princípio de que uma nanopartícula magnética seja direcionada ao local de interesse e gere calor por meio de um campo magnético alternado, liberando energia térmica e eliminando, conseqüentemente, as células tumorais devido às elevadas temperaturas (ITO; HONDA; KOBAYASHI, 2006). Em contrapartida, o aquecimento convencional dos tecidos por microondas ou laser resulta também na destruição das células normais próximas ao tumor, sendo muitas vezes maléfico ao tratamento (FORTINA et al., 2007; JOHANNSEN et al., 2007).

Estudos em modelos animais com diferentes nanopartículas magnéticas já comprovaram a completa regressão de câncer de cólon usando hidroxiapatitas (HOU et al., 2009), tumores de próstata (KAWAI et al., 2006) e mama (ITO et al., 2003) com MCLs (lipossomos catiônicos magnéticos), sendo que neste último tipo tumoral também foi observada aquisição de imunidade antitumoral após exposições à hipertermia mesmo em tumores maiores que 15mm. Diversos outros estudos têm visado o uso da hipertermia associada às nanopartículas (GUEDES et al., 2004; LACAVA, 2006), mas há muito o que se explorar neste vasto e relativamente novo campo da nanobiotecnologia.

Portanto, pode-se afirmar que as nanopartículas apresentam capacidade tanto de auxiliar na busca de tratamentos eficientes quanto podem causar reações adversas, dependendo da concentração e do modo que são empregadas (MAHMOUDI et al., 2009 a; 2009 b; 2011). Logo, estudos como o presente são de grande valia a fim de caracterizar os efeitos benéficos, indiferentes ou prejudiciais do uso de nanopartículas magnéticas de ferro, recobertas ou desprovidas de revestimento, *in vitro* e *in vivo*.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar a ação de nanopartículas magnéticas de ferro revestidas por polifosfato de sódio em linhagem celular de carcinoma escamoso oral (UM-SCC14A), sua capacidade de internalização celular e sua citotoxicidade. Além disso, propôs-se analisar o padrão de resposta destas nanopartículas *in vivo* a fim de investigar esta nova terapia alvo contra o câncer oral.

Para isso, foram realizados experimentos no Laboratório de Estudos Genômicos localizado no IBILCE/UNESP - São José do Rio Preto, procurando atender os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a eficiência de transfecção das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas por polifosfato de sódio na linhagem celular de câncer de assoalho de boca UM-SCC14A.
- Analisar a taxa de morte desencadeada pela linhagem celular quando exposta às diferentes concentrações de nanopartículas.
- Aferir a viabilidade celular e o crescimento das células expostas a diferentes concentrações de nanopartículas.
- Registrar as diferenças morfológicas entre as células cancerosas incubadas ou não com as diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas.

- Observar o efeito do fluido ferromagnético nos tumores orais dos animais inoculados com nanopartículas magnéticas de ferro e induzidos ao tratamento magneto-hipertérmico por meio de um campo magnético de frequência alternada.
- Quantificar e classificar as diferenças entre os grupos tratados e não tratados com hipertermia, atestando a eficiência deste procedimento terapêutico por meio de análises histopatológicas, morfológicas e imunocitoquímicas, avaliando os resultados estatisticamente e destacando os pontos ímpares deste estudo.
- Verificar a existência de comprometimento histopatológico em outros órgãos e a biodistribuição das nanopartículas nos mesmos, constatando o tempo necessário para eliminação do fluido ferromagnético pelo modelo animal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas de ferro

A síntese e a caracterização do fluido ferromagnético (FFM) utilizado neste estudo foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG, Goiânia), sendo que as nanopartículas foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Dr^a. Emília Celma de Oliveira Lima.

O fluido utilizado foi desenvolvido à base de nanopartículas de maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), funcionalizadas com polifosfato de sódio. A concentração original da amostra de FFM empregada neste trabalho foi de $3,7 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM e a concentração de ferro de 3,3mg Fe/mL, determinada por colorimetria (método da ortofenantrolina). A partir daí, a amostra foi diluída em água milliQ imediatamente antes de cada experimento até atingir as concentrações utilizadas de 0,35, 0,7 e $1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM. As amostras permaneceram estáveis e com o mesmo valor de pH 7,2 durante todo o período experimental, sendo armazenadas ao abrigo de luz.

A caracterização física e a avaliação da ultraestrutura das amostras foram feitas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e, antes da análise, a amostra de FFM ainda sem revestimento foi diluída 1000 vezes em soro fisiológico e colocada sobre telas de microscopia eletrônica recobertas com Formvar. Após secarem por duas horas, as telas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio eletrônico JEOL 100CXII. Os diâmetros das partículas magnéticas foram obtidos por análise em computador, utilizando-se o programa ImagePro 4.0. A distribuição das partículas foi conseguida utilizando-se o melhor ajuste

lognormal. Além disso, o diâmetro modal médio de cada nanopartícula foi obtido por difração de raio-X.

Após a funcionalização das nanopartículas com polifosfato, o FFM foi sonificado à temperatura ambiente por dez minutos no sonicador Ultrasonic cleaner 2840 D e foram realizadas as medições do índice de polidispersão (PdI), potencial zeta, mobilidade elétrica e condutividade por espalhamento dinâmico de luz utilizando-se o equipamento Zetasizer Nono series Z590 (Malvern).

A técnica envolve direcionar um feixe de laser para uma amostra altamente diluída e contabilizar a luz espalhada em um fotomultiplicador posicionado em um determinado ângulo. Dessa forma, a intensidade de luz espalhada que atinge o detector é determinada pela interferência mútua das ondas de luz espalhadas pelas partículas individuais na suspensão. Este método também pode ser utilizado na determinação de diâmetro de partículas de 5nm a 5µm, porém para evitar imprecisões devidas ao espalhamento múltiplo e a interações que influenciam a difusão, as medidas devem ser feitas em diluições no intervalo de 10^{-5} a $10^{-2}\%$, como o realizado no presente estudo.

3.2 Linhagem celular de câncer UM-SCC14A

Para a realização da incubação das nanopartículas magnéticas de ferro, foi cultivada a linhagem celular contínua proveniente de câncer de assoalho de boca (UM-SCC14A) em meio essencial mínimo de Eagle modificado, MEM alfa 1x (GIBCO-BRL, Life Technologies, Nova Zelândia), suplementado com 100U de penicilina por mL, 100µg de estreptomicina por mL, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB) (GIBCO-BRL, Life Technologies, EUA).

O cultivo foi realizado em garrafa de poliestireno de 75cm² com dispositivo de aeração acoplado à tampa com filtro (TPP, Suíça), sendo que as células foram repicadas segundo a necessidade. Com essa finalidade, o meio de cultura da garrafa foi descartado e o tapete celular lavado com PBS (GIBCO-BRL, Life Technologies, EUA). Em seguida, foram adicionados aproximadamente 2mL de tripsina (GIBCO-BRL, Life Technologies, Canadá) e a cultura foi mantida por alguns minutos em estufa a 37°C na presença de 5% CO₂. A monocamada foi monitorada no microscópio invertido de luz para verificar o desprendimento das células. Posteriormente, a solução de tripsina foi inativada com meio de cultura e a suspensão foi homogeneizada. Parte da solução resultante foi devolvida à garrafa e o volume foi completado com meio de cultura fresco. Finalmente, a garrafa foi incubada em estufa e utilizada nos experimentos até atingir cerca de 20 passagens.

3.3 Incubação das nanopartículas na linhagem celular de câncer UM-SCC14A

No caso dos experimentos de coloração com Azul da Prússia e no ensaio de apoptose, foi inserida nas placas de microtitulação de seis poços (TPP, Suíça) uma lamínula por poço, lavada em etanol 70% e água milliQ, seca e esterilizada em luz UV a fim de evitar qualquer tipo de contaminante que pudesse interferir nos experimentos. Nestes experimentos, a linhagem foi semeada com densidade de 5×10^5 células por poço. Para o experimento envolvendo a análise por microscopia eletrônica de transmissão, as células foram semeadas diretamente na placa, sem lamínulas aderidas, com a mesma densidade dos experimentos anteriores. E, por fim, para o ensaio MTT, as células foram semeadas em placas de microtitulação de 96 poços (TPP, Suíça), com densidade de 10^4 células por poço.

Para o semeio das células, foi necessário retirar o meio de cultura da garrafa contendo a linhagem celular, com posterior lavagem utilizando-se PBS e incubação em estufa de CO₂ a 37°C por alguns minutos com tripsina, semelhante ao procedimento de repique descrito anteriormente. Após desprendimento das células da garrafa, adicionou-se meio de cultura suplementado com 10% de SFB e esta solução foi transferida para um tubo de polipropileno de 15mL.

Seguiu-se a centrifugação da solução, a fim de separar o meio contendo tripsina das células, foi retirado o sobrenadante, adicionado meio de cultura fresco e feita homogeneização. Separou-se em um tubo do tipo *ependorf* cerca de 50μL do conteúdo do tubo e foram acrescentados outros 50μL de Azul de Tripan (Vetec, Brasil) diluído em PBS, já que se pretendia conhecer a taxa de viabilidade dessa cultura a fim de não contabilizar para posterior transferência para a placa de microtitulação de células inviáveis ou em processo apoptótico. Posteriormente à incubação em temperatura ambiente por cerca de quatro minutos, parte do conteúdo foi transferido para a câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha) para efetuar a contagem das células.

No microscópio de luz (Leica CTR 4000), foi focalizada a área demarcada da câmara de Neubauer com a objetiva de 10x. O volume total desejado da câmara com a lamínula colocada corresponde a $0,1 \text{ mm}^3$; sendo assim, a contagem das células nas quatro áreas de um lado da câmara foi realizada e a média foi obtida. Como a suspensão foi inicialmente diluída a 1/2, o número de células contadas foi igual à média multiplicada pelo fator de diluição, no caso 2. Para se obter o número de células/mL, multiplicou-se o valor obtido por 10000 para correção, já que: $1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3$. Desta forma: $1 \text{ cm}^3 = 10 \times 10 \times 10 \text{ mm} = 1000 \text{ mm}^3$

Na câmara de Neubauer obtemos o número de células por $0,1\text{mm}^3$, então devemos multiplicar por 10, portanto $10 \times 1000 = 10000$. Finalmente, o volume desejado foi obtido pelo seguinte resultado:

$$\begin{aligned} &\text{Média da câmara de Neubauer} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 \rightarrow 1 \text{ mL de solução} \\ &5 \times 10^5 \text{ (ou } 10^4, \text{ dependendo do experimento)} \rightarrow X \text{ mL} \end{aligned}$$

Após transferir o volume X referido para os poços da placa de microtitulação, completou-se com meio específico MEM alfa até o volume final desejado de cada placa. A placa foi então incubada em estufa de CO_2 a 37°C , 24 horas antes da incubação.

Finalizada essa etapa, quando as células atingiram cerca de 60% de confluência, foi realizada a incubação do fluido ferromagnético, adicionando-se meio de cultura com as diferentes concentrações de nanopartículas ($0,35$; $0,7$ e $1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM) em cada poço da placa, também deixando poços sem nanopartículas para controle da reação e para verificar a ação das mesmas nas células. Seguiu-se incubação na estufa de CO_2 a 37°C e os testes foram realizados após 24 horas (ou, no caso do ensaio MTT, que foi realizado após 12 e 24 horas de incubação). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e, posteriormente, repetidos.

3.4 Métodos de avaliação da internalização e citotoxicidade das nanopartículas magnéticas de ferro *in vitro*

3.4.1 Análise da morfologia da linhagem celular UM-SCC14A pós-incubação com o FFM

A linhagem celular foi semeada nas placas de microtitulação sobre lamínulas esterilizadas e, após a incubação das nanopartículas descrita anteriormente no item 3.3, as células foram fixadas em solução Karnovsky (partes iguais de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4%, Sigma, Alemanha) por cerca de uma hora. Após lavagens com água destilada, realizou-se contraste com Hematoxilina-eosina, no qual foi adicionada aos poços hematoxilina de Harris (Sigma, Alemanha) por dez minutos. Seguiu-se lavagem com água corrente e etanol 80%, sendo posteriormente retirado e adicionada eosina (Merck, Alemanha) por cerca de quatro minutos. O material foi desidratado em série crescente de etanol e as lamínulas foram removidas dos poços com auxílio de uma pinça, secas em papel-filtro à temperatura ambiente e, para a montagem da lâmina, foi utilizado meio de entellan (Merck, Alemanha).

Para a captura de imagens e verificação qualitativa das alterações morfológicas nas células, utilizou-se o analisador de imagens Image ProPlus Media Cybernetics acoplado ao microscópio Olympus BX60, do Centro de Microscopia “Prof. Dr. Celso Abbade Mourão”.

3.4.2 Análise da ultraestrutura da linhagem UM-SCC14A e verificação da internalização das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão

As células foram semeadas de acordo com o item 3.3 e tratadas com nanopartículas como descrito anteriormente, na concentração de $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL. Após 24 horas, as células foram tripsinizadas, adicionou-se meio de cultura para inativar a tripsina e a solução foi repassada a um tubo de polipropileno. Este procedimento foi feito em todos os poços do mesmo grupo e o conteúdo foi transferido para o mesmo tubo. As células foram centrifugadas a 1000rpm, 4°C por 20 minutos para a retirada do sobrenadante e foi adicionado PBS, ressuspendida a solução para lavar as células e foi feita nova centrifugação. Esta lavagem com PBS foi repetida e o conteúdo foi repassado para um tubo *eppendorf*.

Para a fixação do material, foi utilizado o fixador paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5% a 4°C, seguido de uma solução 10% fixador e 90% tampão cacodilato de sódio (pH 7,4). Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato e a desidratação foi feita em série crescente de metanol (J. T. Baker, México). Por fim, as amostras foram pré-incluídas em mistura de partes iguais de LR gold (London Resin Co., Reading, Berkshire, Reino Unido) e metanol 100%, durante 24 horas a -20°C. Os conteúdos dos *eppendorfs* foram transferidos para cápsulas, foi feita uma centrifugação de 1500rpm a 4°C por 20 minutos e a polimerização foi realizada utilizando-se 200µL de LR gold puro por cápsula. Finalmente, foi adicionado LR gold e ativador (solução fresca 0,25%) nas cápsulas expostas à luz UV por cerca de 24 horas a -20°C (OLIANI et al., 2001).

As cápsulas foram retiradas, os blocos contendo as amostras foram trimados e deles obtidos cortes semifinos de 500nm e, posteriormente, ultrafinos de 50nm, cortados no ultramicrotomo Leica Ultracut UCT, sendo cada corte depositado em tela de cobre. Após esta etapa, as telas foram contrastadas em acetato de uranila por 20 minutos, seguindo lavagens em água destilada e, por fim, foram expostas ao citrato de chumbo por seis minutos, lavadas e secas.

Finalmente, as grides foram analisadas qualitativamente quanto à morfologia da linhagem celular e presença de FFM internalizado, sendo fotodocumentadas no microscópio eletrônico de transmissão Leo-Zeiss 906 EXII, do Centro de Microscopia “Prof. Dr. Celso Abbade Mourão”, IBILCE/UNESP.

3.4.3 Ensaio de apoptose

O Laranja de acridina é um corante metacromático seletivo para ácidos nucleicos útil para a determinação do ciclo celular. O corante pode penetrar e identificar células apoptóticas ligando-se ao DNA, enquanto as células viáveis não são permeáveis, possibilitando tal diferenciação (KASTEN, 1967).

Sendo assim, o procedimento inicial de fixação das células nas lamínulas seguiu o protocolo descrito para a coloração por HE (item 3.4.1). A metodologia baseou-se em adicionar a cada poço Alumen férrio 4% (Carlo Erba, Itália) por cerca de quatro minutos e, depois de retirada a solução e as lamínulas bem lavadas com água destilada, foi empregado Laranja de acridina (Sigma, EUA) por dez minutos. O corante foi removido, as lamínulas lavadas com água destilada e colocadas para secar.

A montagem da lâmina foi realizada com glicerina (Synth, Brasil) somente antes da visualização no analisador de imagens (Image ProPlus Media Cybernetis acoplado ao microscópio Olympus BX60, do Centro de Microscopia “Prof. Dr. Celso Abbade Mourão”, IBILCE/UNESP) para captura de fotomicrografias, análise da morfologia e verificação de morte celular. Após a visualização das fotomicrografias, foram contados 15 campos diferentes, sob o mesmo aumento no microscópio (400x), nos quais foram quantificadas as células nas quais havia ocorrido apoptose e as quais não foram afetadas, a fim de encontrar a taxa relativa de morte desencadeada pelas diferentes concentrações de FFM.

3.4.4 Ensaio MTT

O MTT amarelo é reduzido a formazan roxo nas mitocôndrias das células e essa redução ocorre somente quando enzimas redutases mitocondriais estão ativas e, portanto, a conversão pode ser diretamente relacionada ao número de células viáveis (SLADOWSKI et al., 1993).

Então, a citotoxicidade foi analisada por meio do ensaio colorimétrico MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difeniltetrazolium bromídeo, Sigma, Brasil) após a incubação da cultura celular juntamente às nanopartículas em placas de microtitulação de 96 poços, durante 12 e 24 horas. O teste abrangeu tais períodos de tempo já que é sabido que as nanopartículas são internalizadas pelas células em até 24 horas, tornando desnecessário um acompanhamento, neste caso, durante outros períodos de tempo ou a longo prazo (CALMON et al., 2012). Também foram reservados poços para células UM-SCC14A, servindo de controle negativo em solução de meio de cultura sem FFM e células expostas a meio de cultura em conjunto

com dimetilsulfóxido 100% (DMSO) (Sigma, Reino Unido), para controle positivo no qual era sabido que desencadearia morte celular.

Sendo assim, as células foram semeadas e foi feita a incubação das nanopartículas como descrito anteriormente no item 3.3. Nos tempos indicados de cada experimento (12 e 24 horas pós-incubação com FFM), o meio de cultura foi removido dos poços e trocado pela solução previamente preparada de MTT, em concentração de 1mg/mL em 100µL (por orifício) de meio de cultura suplementado com antibióticos, sem SFB. Posteriormente, a placa envolta em papel alumínio foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 30 minutos. Após a formação dos cristais de formazan, a solução MTT foi removida e foram adicionados 100µL de DMSO por orifício, sendo a placa incubada sob agitação de 60rpm, à temperatura ambiente por cinco minutos.

A absorbância foi determinada pelo espectrofotômetro Spectra Max Plus 384 sob comprimento de onda de 570nm, sendo que os valores brutos obtidos de cada grupo foram comparados aos valores referentes às células não tratadas, tomadas como controle com 100% de viabilidade, e a viabilidade celular relativa (%) em relação ao controle foi então calculada.

3.5 Experimentação *in vivo*

3.5.1 Animais

Foram utilizados trinta hamsters Sírios machos de oito semanas de vida, não isogênicos, adquiridos comercialmente (empresa Anilab Animais de Laboratório, Paulínia, Brasil). Durante a fase experimental, os animais foram mantidos em recintos com dieta balanceada e água *ad libitum*, além de condições fixas de temperatura e umidade, com ciclo de claro/escuro de 12 horas (KRISHNAKUMAR et al., 2009).

Os hamsters foram acondicionados e tratados de acordo com o a lei 11.794/2008 que dita os parâmetros de criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica. No momento da coleta do material para o estudo, os animais foram anestesiados em câmara de CO₂ e, por fim, eutanasiados por decapitação. Este projeto e seu delineamento experimental proposto foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP (protocolo CEUA nº 029/2010).

3.5.2 Delineamento experimental e tratamento *in vivo* combinando nanopartículas à hipertermia

Após os experimentos *in vitro* para delineamento da concentração biocompatível de FFM a ser inoculada para tratamento *in vivo* de câncer oral, os trinta hamsters sírios foram divididos igualmente em cinco grupos (n=6), sendo um grupo reservado para se enquadrar como controle normal (Figura 1 A), no qual não foi induzido tumor (Grupo Normal). No restante dos animais foi feita a indução do carcinoma oral, por meio da aplicação de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) (Sigma, Reino Unido), um hidrocarboneto aromático policíclico iniciador e promotor de carcinogênese e mutagênese frequentemente utilizado em experimentação animal. No presente estudo, uma solução 0,5% de DMBA em óleo mineral (Nujol, Brasil) foi aplicada na região interna da bochecha direita dos animais por meio de um pincel (Condor 441) durante 16 semanas (três vezes por semana), resultando em mudanças histológicas e finalmente no desenvolvimento de carcinoma espinocelular na cavidade oral (VENGADESAN; ARUNA; GANESAN, 1998; MANOHARAN et al., 2009; PANJAMURTHY et al., 2009).

Dessa forma, um grupo foi tomado como controle com câncer (Figura 1 B), no qual foi somente administrado o carcinógeno DMBA diluído em óleo mineral (Grupo C+). Os demais grupos com tumor induzido foram tratados com nanopartículas (Figura 1 C). Estes animais foram anestesiados por meio de solução contendo 40µL de xilasina (Rompum, Bayer, Brasil) e 160µL de quetamina (Dopalen, Vetbrands, Brasil). Enquanto a anestesia surtiu efeito, o FFM foi aplicado sob a concentração de $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL, sob um volume total de 40µL para tumores de 3mm. As nanopartículas foram aplicadas subcutaneamente no local do tumor por meio de uma seringa descartável de insulina Injex 1 mL (agulha 0,45x13; 2G1/2; BD) e, esta aplicação foi realizada lentamente, a fim de evitar quaisquer complicações decorrentes da rápida injeção contendo a significativa concentração de FFM estranho ao organismo dos animais.

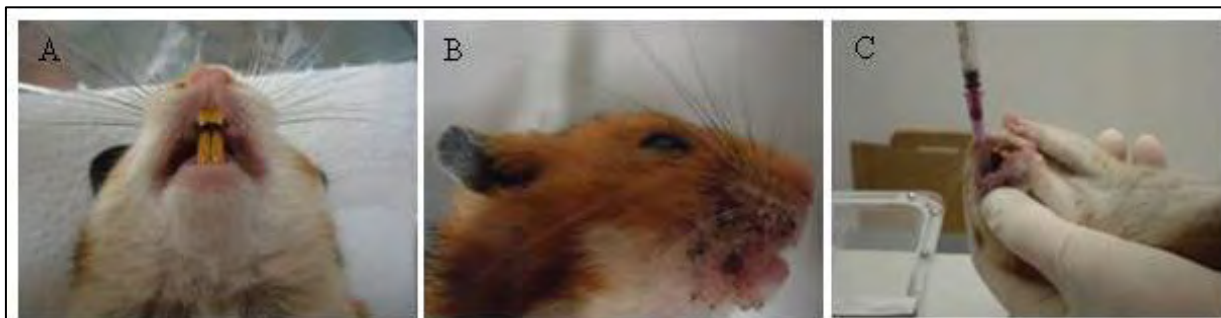


Figura 1. Hamsters sírios representando os grupos experimentais (A) normal, (B) com carcinoma escamoso oral *in situ* e (C) tratados com $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM, aplicado topicamente na região interna da bochecha direita.

Dentre estes três grupos de hamsters, um grupo foi tratado exclusivamente com FFM (Grupo Nanos) e outros dois grupos foram separados para combinar a terapia de nanopartículas à exposição a um campo magnético de frequência alternada (desenvolvido pelos alunos do Laboratório de Nanobiotecnologia e gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Zulmira Guerrero Marques Lacava da Universidade de Brasília) (Figura 2 A). O procedimento de exposição ao campo magnético foi realizado durante 15 minutos por três dias consecutivos, logo após a aplicação do FFM (Figura 2 B) (PORTILHO-CORRÊA, 2007). Um grupo foi eutanasiado após um dia de tratamento (Grupo N+CM1dia) e outro grupo após sete dias (Grupo N+CM7dias), a fim de verificar a resposta à terapia em diferentes períodos de acompanhamento dos animais.

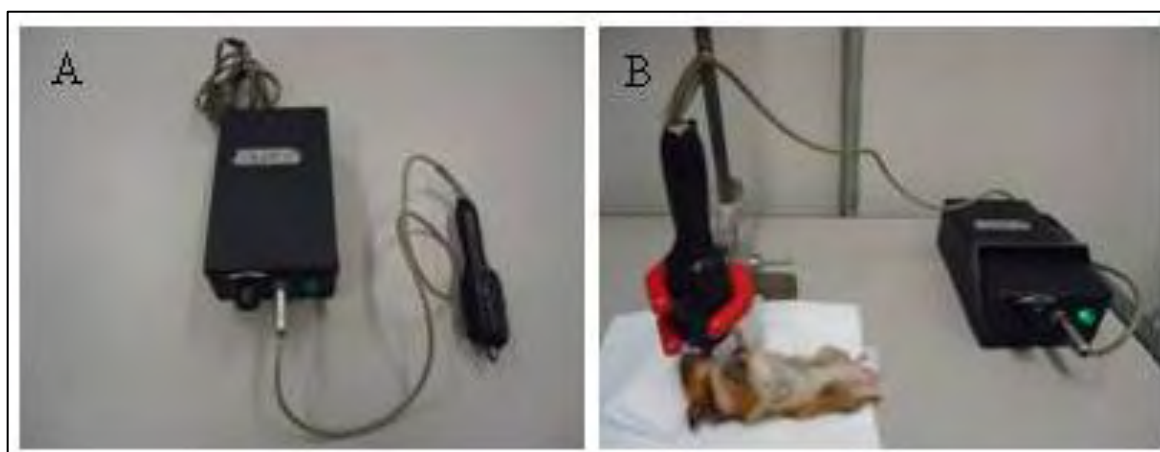


Figura 2. (A) Aparato do campo magnético de frequência alternada, cedido pela Prof^a. Dr^a. Zulmira Guerrero Marques Lacava. (B) Exposição tópica do hamster sírio ao campo magnético.

O procedimento cirúrgico e a coleta dos tecidos das bochechas (direitas – alvo do tratamento – e esquerdas), fígados, corações, pulmões, rins e baços (órgãos retirados para possibilitar a verificação de reações adversas às nanopartículas e ao tratamento) foram realizados seguindo normas gerais e básicas para dissecação de mamíferos. Os animais foram anestesiados via inalação de CO₂ em câmara apropriada (modelo GCSCO2G, Beira-mar) e acomodados em decúbito dorsal sobre a placa de dissecação. Além disso, foi realizada pesagem de todos os animais e retirada de sangue para análise de seus leucogramas.

Por fim, todos os tecidos de interesse foram corados com Hematoxilina-eosina e Azul da Prússia e foram realizadas imunocitoquímicas dos tecidos da cavidade oral direita para os anticorpos PCNA e caspase-3 ativada, marcadores de proliferação celular e apoptose, respectivamente.

3.5.3 Processamento histológico

Os animais foram eutanasiados após os devidos tempos descritos anteriormente e as amostras de tecido normal, canceroso e tratado foram retiradas das bochechas direitas de todos os animais. Além disso, os demais órgãos de interesse do estudo também foram removidos, sendo, em seguida, o material devidamente identificado e processado. Para o processamento em parafina (Histosec, Merck, Alemanha), foi realizada a fixação em Metacarn (razão de 6 metanol: 3 clorofórmio: 1 ácido acético) por quatro horas a 4°C, desidratação em série crescente de etanol, diafanização em xilol (Sigma, Bélgica) e, finalmente, inclusão em parafina.

Dos blocos, foram obtidos cortes de 4µm em micrótomo rotativo (Leica RM2155). Os cortes foram primeiramente depositados em banho-maria (Leica HI 1210) para distendê-los e, por fim, foram arranjados em lâminas de vidro previamente silanizadas e incubados em estufa 37°C (Odontobrás ECB 1.2) para retirada do excesso de parafina, seguindo para os devidos testes.

3.5.4 Avaliação dos cortes pela coloração Hematoxilina-eosina e por sua combinação ao Azul da Prússia

Para início do protocolo de coloração, as lâminas foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em série decrescente de etanol, chegando à água. Logo depois, foi feita coloração com Hematoxilina-eosina, primeiramente com hematoxilina, lavagem rápida em água destilada para retirar o excesso do corante, seguido de mergulho em diferenciador (partes

iguais de HCl 1% e etanol 70%) (Sigma, EUA; Merck, Alemanha), gotejamento de água corrente, lavagem em etanol 80%, imersão em eosina, desidratação em etanol, clarificação com xilol e montagem da lâmina com bálsamo do Canadá (Synth, Brasil).

Após a montagem das lâminas, foi realizada análise histopatológica pela Dr^a. Jane Lopes Bonilha da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) para confirmação do diagnóstico de todos os animais. Foram analisadas variáveis quanto à presença de infiltrado mononuclear, neoangiogênese e aspecto da amostra em geral, verificando o comprometimento tecidual.

Para verificação da presença de nanopartículas remanescentes nos diferentes tecidos, foi realizada, em conjunto à coloração HE, a contracoloração com Azul da Prússia (combinação previamente preparada de HCl 20% e ferrocianeto de potássio 10% em proporções iguais) (Sigma, EUA). O protocolo seguiu-se de forma similar, apenas adicionando uma etapa de 20 minutos de contracoloração logo após a hidratação dos cortes. O ferro intracelular foi marcado em azul, possibilitando atestar qualitativamente a presença do FFM nos cortes pela análise em microscópio de luz.

Por fim, também foi utilizado o Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image ProPlus Media Cybernetics, para a análise morfológica e fotodocumentação das possíveis áreas de comprometimento por metástase ou biodistribuição/acúmulo de FFM nos diferentes tecidos coletados. As figuras obtidas foram avaliadas qualitativamente quanto à presença de características morfológicas de tecidos tumorais e normais.

3.5.5 Análise morfométrica populacional

A análise morfométrica foi realizada para que se determinassem as medidas de altura (μm) da camada do epitélio e de queratina. Todas as medições foram feitas a partir de imagens capturadas em aumento de 100x de cortes histológicos corados por HE de seis animais por grupo, por meio do Sistema Analisador de Imagens. Isto foi realizado de maneira automatizada pelo programa Image ProPlus Media Cybernetics devidamente calibrado por régua micrométrica. Para esta análise foram utilizadas 200 medidas para cada variável de cada grupo experimental e a determinação da frequência populacional por tecido bucal foi feita a partir da transformação dos valores das medidas por grupo experimental em porcentagem.

3.5.6 Imunocitoquímica para avaliação da proliferação celular (PCNA)

Foi realizada desparafinização dos cortes em xilol e hidratação em série decrescente de etanol (absoluto, 95%, 70% e 50%), seguido de lavagem em água destilada. Logo após, foi

feita a recuperação antigênica com tampão citrato (pH6,0) em panela (Philips Walita) a 100°C e resfriado à temperatura ambiente e, bloqueio da peroxidase endógena, pela solução de peróxido de hidrogênio 3% (Merck, Alemanha) em metanol à temperatura ambiente em local escuro.

Seguiu-se a inibição de ligações inespecíficas com *background sniper* em câmara escura à temperatura ambiente, sendo que entre todas as etapas desta imunocitoquímica, foram realizadas lavagens em tampão PBS. A incubação com anticorpo primário PCNA (sc56, clone PC10, IgG mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, EUA) foi feita pela diluição de 1µL de anticorpo em 100µL de BSA1%, em câmara úmida por uma hora em estufa a 37°C. Para o controle negativo da reação, o anticorpo primário foi omitido e substituído pelo soro.

Posteriormente, o polímero (BioCare Medical, EUA) foi gotejado sobre o material, em câmara escura por 40 minutos à temperatura ambiente, a revelação do material foi feita com DAB cromogênico líquido (Dako, EUA) por 50 segundos e, finalmente, foi realizada a contracoloração com hematoxilina de Harris por 40 segundos. A desidratação foi feita em série crescente de etanol (95% e absolutos), seguida de lavagens em xilol e montagem da lâmina com bálsamo do Canadá.

As imunocitoquímicas dos cortes foram fotodocumentadas e a análise da expressão da proteína foi realizada pela demarcação nuclear, quantificada por densitometria óptica pelo programa analisador de imagem AxioVision do Microscópio AxioSkop 2 (Zeiss), do Laboratório de Morfologia, IBILCE-UNESP. A partir das fotomicrografias das imunomarcações, foram avaliados dois campos aleatórios de cada animal, nos quais 15 valores foram obtidos a partir de pontos escolhidos aleatoriamente (unidades arbitrárias de 0 a 255). Estes valores foram expressos como média de cada grupo $\pm$ desvio padrão.

3.5.7 Imunocitoquímica para avaliação da apoptose induzida pelo tratamento (caspase-3 ativada)

Foi realizada desparafinização, hidratação, recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase endógena do material de maneira similar à descrita no item 3.5.6, sendo que o tampão, neste caso, tratou-se do TBS. Seguiu-se para a permeabilização com triton 0,2% em TBS em câmara escura à temperatura ambiente, bloqueio de proteínas inespecíficas com leite 5% em TBS e incubação com o anticorpo primário (ab13847, IgG rabbit polyclonal, ABCam, EUA) por meio da diluição de 1µL de anticorpo em 50µL de BSA1% em TBS, *overnight* na câmara escura na geladeira. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi substituído pelo soro.

No dia seguinte, foi realizada incubação com 1µl de anticorpo secundário (sc-2018, Rabbit ABC Staining System ImmunoCruz, Santa Cruz Biotechnology, EUA) em 200µl BSA1% por 45 minutos em câmara escura na estufa 37°C. Posteriormente, houve incubação com o complexo AB, revelação do material com DAB cromogênico líquido e a contracoloração com hematoxilina. A análise por densitometria foi realizada da mesma forma que no item 3.5.6.

3.6 Análise da série branca sanguínea

3.6.1 Avaliação da contagem global de leucócitos

Para a contagem global de leucócitos, foram pipetados 20µL de sangue em tubos *ependorff* com 400µL de líquido diluidor no qual o material foi homogeneizado por 20 minutos. O líquido diluidor era composto de 2mL de ácido acético glacial, 1mL de azul de metileno em 100mL de água destilada. Após a homogeneização, 10µL da solução foi transferida para a câmara de Neubauer, onde se procedeu a contagem em quatro retículos laterais da câmara em microscópio de luz. Por fim, a soma dos quatro retículos foi multiplicada pelo fator de cálculo para expressar o total de células por microlitro. Os dados foram obtidos em termos de quantidade de leucócitos totais.

3.6.2 Avaliação da contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial ou específica é feita em esfregaço sanguíneo, com a finalidade de contar, em valores percentuais, as várias células da série branca (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos, principalmente) circulantes no sangue periférico (VALLE, 2001).

Para a realização da análise citométrica, esfregaços sanguíneos foram obtidos a partir da coleta do sangue após a eutanásia dos grupos. Depois da secagem, as lâminas foram fixadas em metanol por cinco minutos e coradas com Wright/Giemsa. A análise foi feita em microscopia de luz (aumento de 100x) possibilitando, assim, a distinção do tipo celular sanguíneo (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos) e suas possíveis alterações. Foram contadas 500 células por animal e os dados foram expressos em porcentagem de cada tipo celular em relação ao total da série leucocitária.

3.7 Análises estatísticas

A partir das imagens obtidas em microscopia de luz por meio do Sistema Digital de Análise de Imagens, foram efetuadas avaliações quantitativas dos diferentes ensaios.

A análise exploratória e tratamento estatístico dos dados foram realizados em planilhas e gráficos do software GraphPad Prism versão 5.01 (Software Inc., 1992-2007). Para a comprovação da significância dos resultados, foram utilizados os testes Anova – análise de variância de fator único, por meio de combinação entre dois fatores – e, quando havia significância, eram seguidos do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas de ferro

O fluido utilizado neste trabalho, sintetizado no Instituto de Química da UFG, foi desenvolvido à base de nanopartículas de maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), sendo que a microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou que as nanopartículas de óxido de ferro sem a camada de revestimento apresentam morfologia esférica, mesmo estando aglomeradas, já que se tratam de nanopartículas magnetizadas. Também se pôde atestar que se apresentam com 10nm de diâmetro nestas condições, corroborando o perfil nanoestrutural das partículas sintetizadas (Figura 3 A). Por difração de raio-X, a distribuição lognormal dos diâmetros mostrou que as nanopartículas da amostra possuem diâmetro modal de aproximadamente 8nm.

Como não é possível funcionalizar com polifosfato cada maguemita individualmente, são funcionalizados agregados de nanopartículas e, a partir daí, o diâmetro hidrodinâmico, que representa o diâmetro médio dos agregados, foi obtido apresentando-se em uma distribuição gaussiana com polidispersão de tamanho (Figura 3 B), que girou em torno de 80,58nm ($\pm 4,14$).

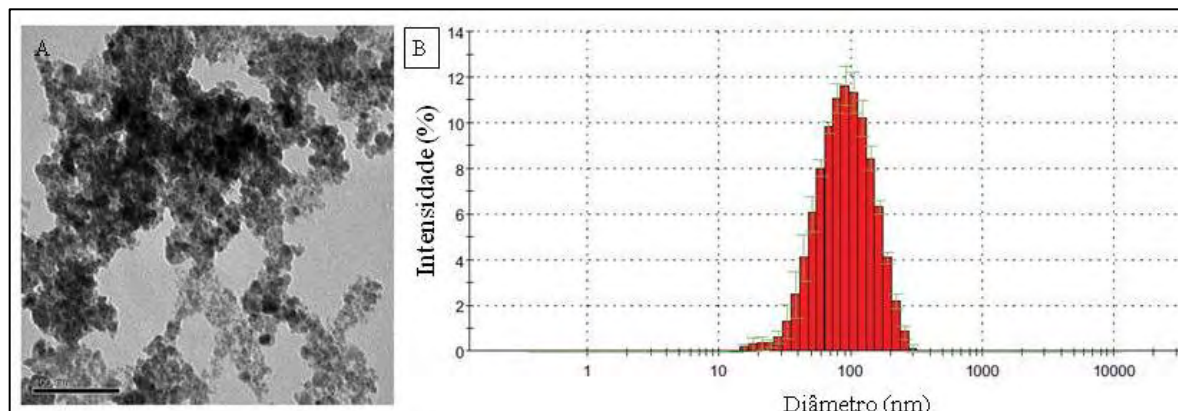


Figura 3. (A) Fotomicrografia eletrônica proveniente de análise de MET, mostrando nanopartículas magnéticas de óxido de ferro da amostra de FFM sem revestimento. Escala: 100nm. (B) Histograma dos diâmetros das nanopartículas revestidas por polifosfato da amostra de FFM, obtidos por espalhamento dinâmico de luz.

A polidispersão é um parâmetro calculado a partir da análise da função de autocorrelação em medições por espalhamento de luz. Nesta análise, assume-se que todas as nanopartículas possuem o mesmo tamanho e um ajuste exponencial simples é aplicado a esta função anterior. Então, o índice de polidispersão (PdI) mediu a uniformidade do tamanho das nanopartículas e mostrou o quanto seu tamanho desviou da faixa mais frequente de tamanho, verificando o grau de homo ou heterogeneidade da amostra. A maior uniformidade do fluido ferromagnético depende de um menor PdI. Dessa forma, foi obtido o valor de $0,193 (\pm 0,01)$ que se encaixa nos padrões aceitáveis de um lote homogêneo de nanopartículas.

Além disso, foi obtido o potencial zeta das amostras em meio aquoso de $-43,4\text{mV} (\pm 3,55)$, valor que é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície. Tal valor foi considerado adequado para manter o sistema sem agregação e precipitação das nanoestruturas, devido à repulsão eletrostática que as nanopartículas apresentam resultante da densidade de carga de superfície. Partículas com alto potencial zeta e mesmo sinal de carga, tanto positivo quanto negativo, irão se repelir. Então, quanto maior o valor do potencial zeta em módulo, mais estável se torna a suspensão diminuindo a probabilidade de formação de agregados, que foi o caso do fluido sintetizado.

Quando um campo elétrico é aplicado através de eletrodos, as partículas carregadas suspensas no eletrólito são atraídas para o eletrodo de carga oposta. A mobilidade elétrica representa, então, a habilidade de partículas carregadas de mover-se através de um meio em resposta a um campo elétrico que as está puxando. Portanto, quanto maior a capacidade de se

mover neste ambiente (expresso por valores próximos a zero), mais magnética a amostra. No presente estudo, foi obtido o valor de $-0,4\mu\text{cm/V.s}$ ($\pm 0,05$), que se adequa a uma nanopartícula de qualidade.

Por fim, foram adquiridos os valores de condutividade, demonstrando que quanto maior carga de superfície, melhor condutividade e menor a resistividade. Sendo assim, o valor de condutância de $0,05\text{mS/cm}$ ($\pm 0,003$) reflete a presença de uma boa amostra quanto a estes parâmetros

4.2 Métodos de avaliação da internalização e citotoxicidade das nanopartículas magnéticas de ferro *in vitro*

4.2.1 Análise da morfologia da linhagem celular UM-SCC14A pós-incubação com o FFM

Depois de verificados padrões aceitáveis para utilização destas nanopartículas, tais como tamanho, formato ultraestrutural, natureza, revestimento e carga de superfície, foi iniciada a experimentação *in vitro* na linhagem celular de câncer UM-SCC14A. As células foram transferidas para as placas de microtitulação e incubadas com o FFM, de acordo com o item 3.3. Posteriormente, foi realizada a coloração HE, descrita no item 3.4.1.

No controle do experimento, no qual as células não foram incubadas com nanopartículas, pôde-se observar expansão da linhagem celular de acordo com os padrões de proliferação de células tumorais, fato verificado pela sua morfologia característica inalterada, pelas divisões celulares recorrentes e pelo processo apoptótico verificado principalmente em casos de elevado contato célula-célula, ocorrência bastante comum em células cancerígenas já que as mesmas não respondem aos sinais de regulação para cessar seu crescimento e divisão celular (Figura 4 A, B e C). Nas células incubadas com nanopartículas, nas diferentes concentrações ($0,35$; $0,7$ e $1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL), foram notadas algumas diferenças morfológicas, principalmente nas células expostas à maior concentração de FFM (Figuras 4 J-L).

Nas células incubadas com $0,35 \times 10^{15}$ partículas/mL (Figura 4 D, E e F), a maior parte da linhagem permaneceu se dividindo e morrendo de forma semelhante ao controle, apesar da presença das nanopartículas, sendo que algumas células apresentaram alterações morfológicas e de desenvolvimento, como mitoses irregulares e atípicas (Figura 4 D). Neste caso, foi verificada a presença de células multinucleadas e bastante vacuoladas (Figura 4 D e F), que não mantêm um desenvolvimento similar às demais células desta linhagem, tornando-se maiores e apresentando um marcado caráter proliferativo diferente do demonstrado pelas

demais. Nas células incubadas com a concentração intermediária de nanopartículas, de $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL (Figura 4 G, H e I), observou-se morfologia semelhante àquela apresentada pelas células expostas à menor concentração de FFM.

Por fim, nas células incubadas com a concentração de $1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL, foi averiguada a presença de grandes alterações morfológicas, como vesículas hipercromáticas e membranas plasmáticas com projeções disformes, culminando na formação de corpos apoptóticos (Figura 4 J e K), além de aglomerados de células (Figura 4 L). Esse fato pode ser explicado devido à elevada quantidade de FFM a que as células foram expostas e que, conseqüentemente, tornaram o meio tóxico e impediram que a maior parte das nanopartículas fosse internalizada, excedendo sua capacidade de absorção e aumentando as alterações que refletem tal toxicidade.

Esta análise demonstrou que o aumento da quantidade de nanopartículas disponíveis no meio de cultura foi diretamente proporcional à quantidade de alterações morfológicas observadas.

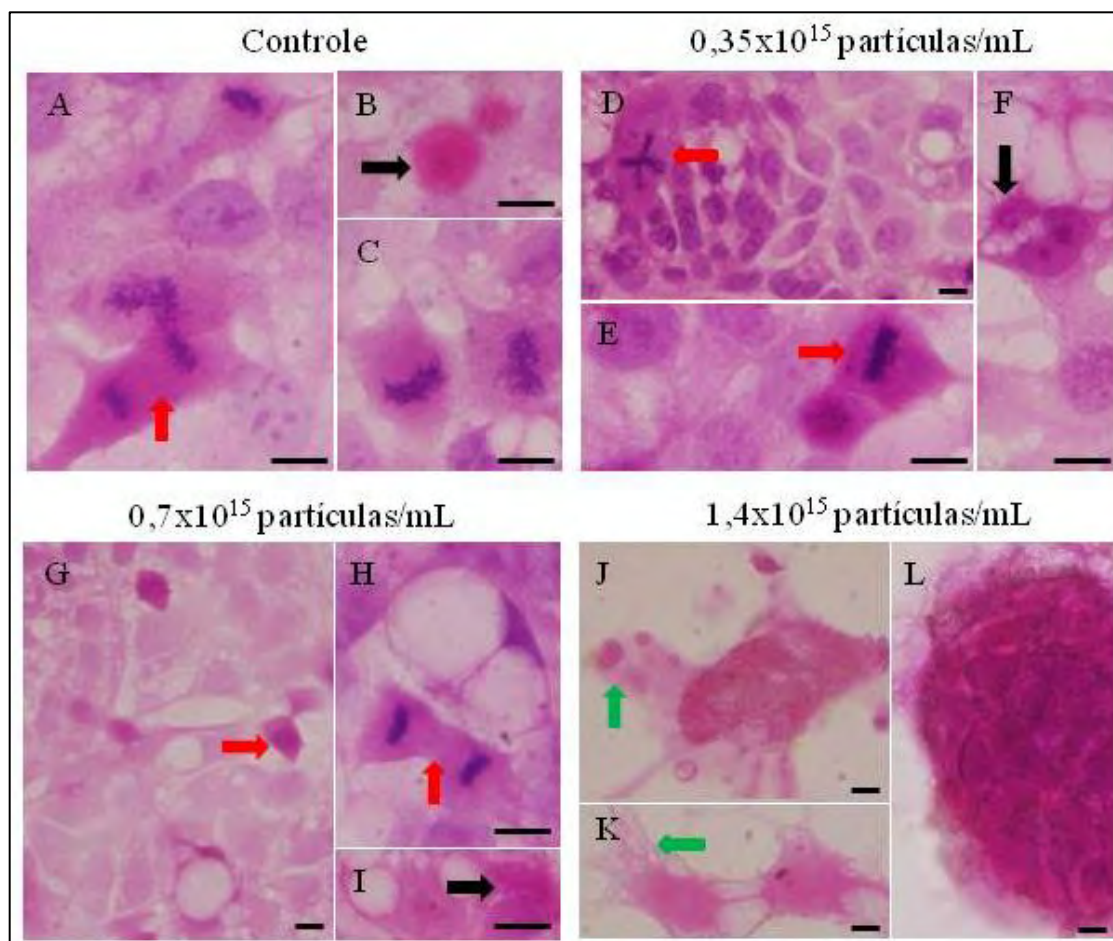


Figura 4. Imagens de microscopia de luz da linhagem celular de carcinoma escamoso oral UM-SCC14A, corada com HE, (A, B e C) na ausência de nanopartículas magnéticas de ferro e incubada na presença de maguemitas na concentração de (D, E e F) $0,35 \times 10^{15}$; (G, H e I) $0,7 \times 10^{15}$ e (J, K e L) $1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM. Escala: $10 \mu\text{m}$. Setas vermelhas: células em processo de mitose. Setas pretas: células em processo apoptótico. Setas verdes: vesículas hipercromáticas e alterações do contorno celular.

4.2.2 Verificação de alterações ultraestruturais na linhagem UM-SCC14A e análise da internalização das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão

As células UM-SCC14A variaram ligeiramente suas formas, volumes e quantidades de nucléolos (Figura 5 A e D), quando incubadas ou não com FFM na concentração de $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL. Uma feição proeminente, observada em muitas células, foram projeções digitiformes da membrana plasmática, como microvilos (Figura 5 B e E).

Como a atividade mitótica da linhagem era alta, foi possível identificar células que mostraram no citoplasma extenso complemento de organelas citoplasmáticas, principalmente

mitocôndrias e vacúolos. Aliada a essa abundância de organelas, a natureza neoplásica destas células também foi atestada pela grande quantidade de núcleos e de nucléolos.

Várias células apresentaram grandes vacúolos digestivos eletrolucentes, de variados tamanhos no citoplasma, redondos ou ovalados. Alguns pareciam cisternas dilatadas do retículo endoplasmático liso (Figura 5 F) na forma de canais tortuosos e de diâmetro irregular. Além disso, o complexo de Golgi (Figura 5 C) foi repetidamente observado, bem como o elevado contato célula-célula, característico do crescimento e alta proliferação da UM-SCC14A.

A abundância de citoplasma encontrada em todas as células, riqueza de mitocôndrias e microvilos na superfície dão idéia da intensa atividade metabólica destas células cancerosas e permitem supor que haveria internalização eficiente das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas por polifosfato neste tipo celular (Figura 5 D, E e F), já que poderiam endocitar ou fagocitar diferentes compostos biocompatíveis que estivessem disponíveis no meio de cultura.

Dessa forma, foi inferida a presença destas nanopartículas no interior celular em vesículas, provavelmente endocíticas ou mesmo fagolisossomos, as quais possibilitaram a entrada do FFM e que o encaminhava para sua degradação. Tais vesículas eram ora eletrolúcidas (vacúolos autofágicos) ora eletrodensas (endossomos). Isso confirmou que as células UM-SCC14A são capazes de internalizar este FFM e que o procedimento foi bem sucedido, não demonstrando diferenças ultraestruturais extremas entre as células incubadas com as nanopartículas quando comparadas ao controle.

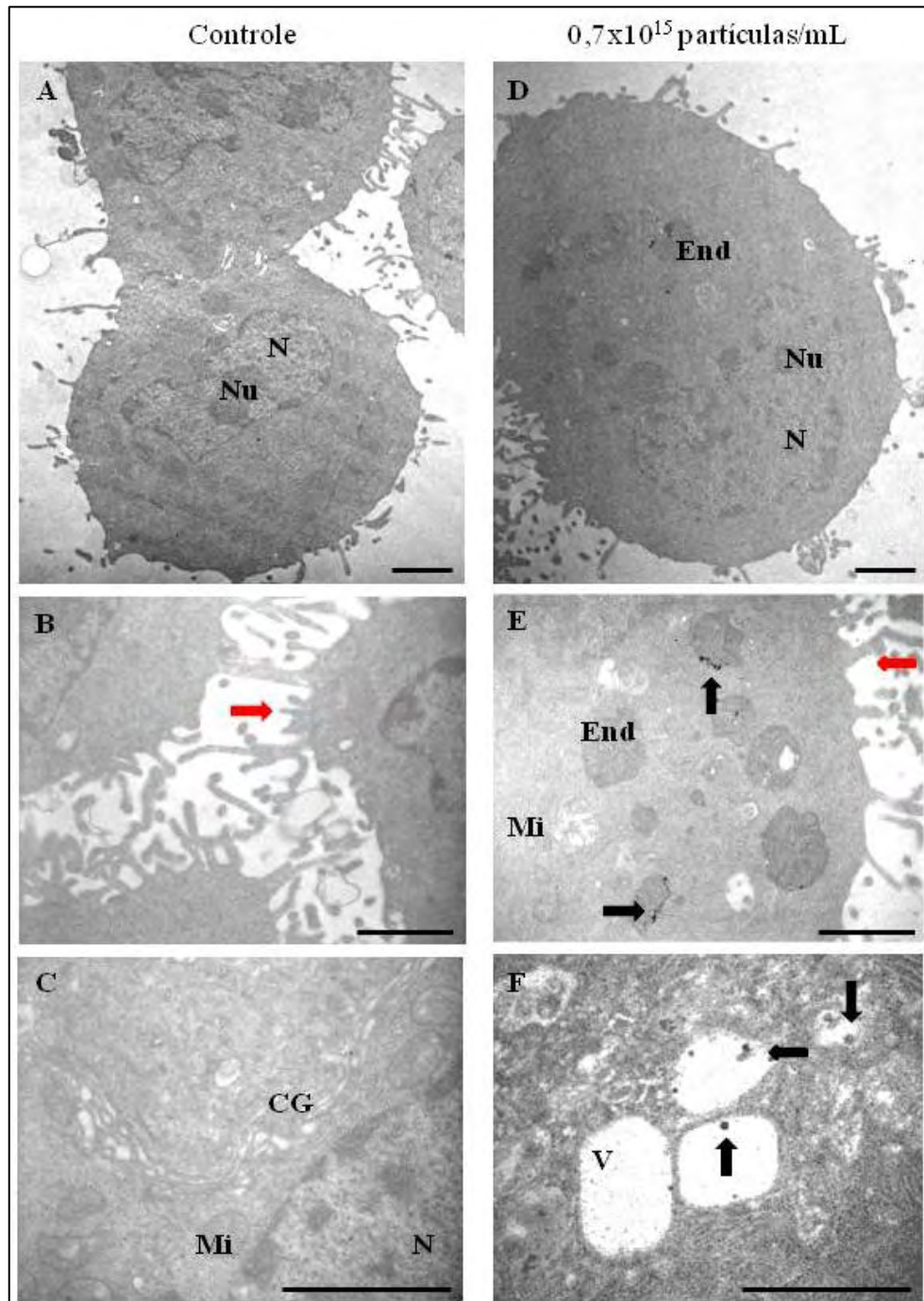


Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão da linhagem celular UM-SCC14A, das células controle (A, B e C) na ausência de nanopartículas magnéticas de ferro e quando incubadas na presença de (D, E e F) $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM, sob aumento variando de 6000 a 27800x. Escala: 500nm. Setas pretas: indicam nanopartículas internalizadas em vesículas eletrolúcidas ou eletrodensas no citoplasma. Setas vermelhas: projeções da membrana plasmática. CG: complexo de Golgi. End: endossomo eletrodense. Mi: mitocôndria. N: núcleo. Nu: nucléolo. V: vacúolo autofágico eletrolúcido.

4.2.3 Ensaio de apoptose

Depois da transferência das células para as placas de microtitulação e realização da metodologia dos itens 3.3 e 3.4.3, a linhagem foi avaliada quanto ao seu perfil de morte celular quando incubadas com diferentes concentrações de nanopáticas, a fim de distinguir se houve diminuição da atividade metabólica ou no número de células. Por meio desta técnica, foi possível verificar que as células apoptóticas concentram o corante Laranja de acridina e, dessa forma, possibilitam a confirmação dos locais onde ocorreu processo apoptótico.

Apesar de não terem sido administradas nanopáticas magnéticas de ferro às células referentes ao controle, também foi observada apoptose neste caso, já que se trata de um processo fisiológico (Figura 6 A, B e C). Além de evidenciarem células em crescimento semelhante ao controle, a linhagem incubada com diferentes concentrações de FFM demonstrou mudanças morfológicas como presença de células multinucleadas e grandes vacúolos no citoplasma, bem como características de células apoptóticas, como arredondamento celular, formação de bolhas na membrana e fragmentação do núcleo em corpos apoptóticos (Figura 6 D-O).

Mais especificamente, quando as células foram incubadas com a maior concentração de FFM, $1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL (Figura 6 L-O), foram observadas alterações no citoplasma, formação de vesículas hipercromáticas (Figura 6 M e N) e de aglomerados de células (Figura 6 O), provavelmente devidas ao aumento da citotoxicidade do meio celular combinado à elevada quantidade de nanopáticas, mesmo após um período curto de tempo como o de 24 horas.

Finalmente foi verificado de forma quantitativa que os níveis de apoptose aumentaram gradualmente de maneira dose-dependente (Figura 6 P), fato observado pelas células que se desprenderam dos poços da placa de microtitulação e que se encontravam no meio de cultura no momento da realização da técnica, também visualizado pela coloração em si e pelo aumento da área vazia, onde deveriam estar as células viáveis aderidas às lamínulas. A taxa de células apoptóticas/células viáveis obedeceu a ordem crescente dos valores de 0,015, para 0,029, 0,041 e, por fim, 0,112, para as amostras controle, 0,35, 0,7 e $1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM, respectivamente. Houve diferença estatística bastante significativa ($p \leq 0,001$) apenas em relação à maior concentração de FFM quando comparada às demais amostras, demonstrando seu caráter tóxico para este tipo celular nas condições estabelecidas.

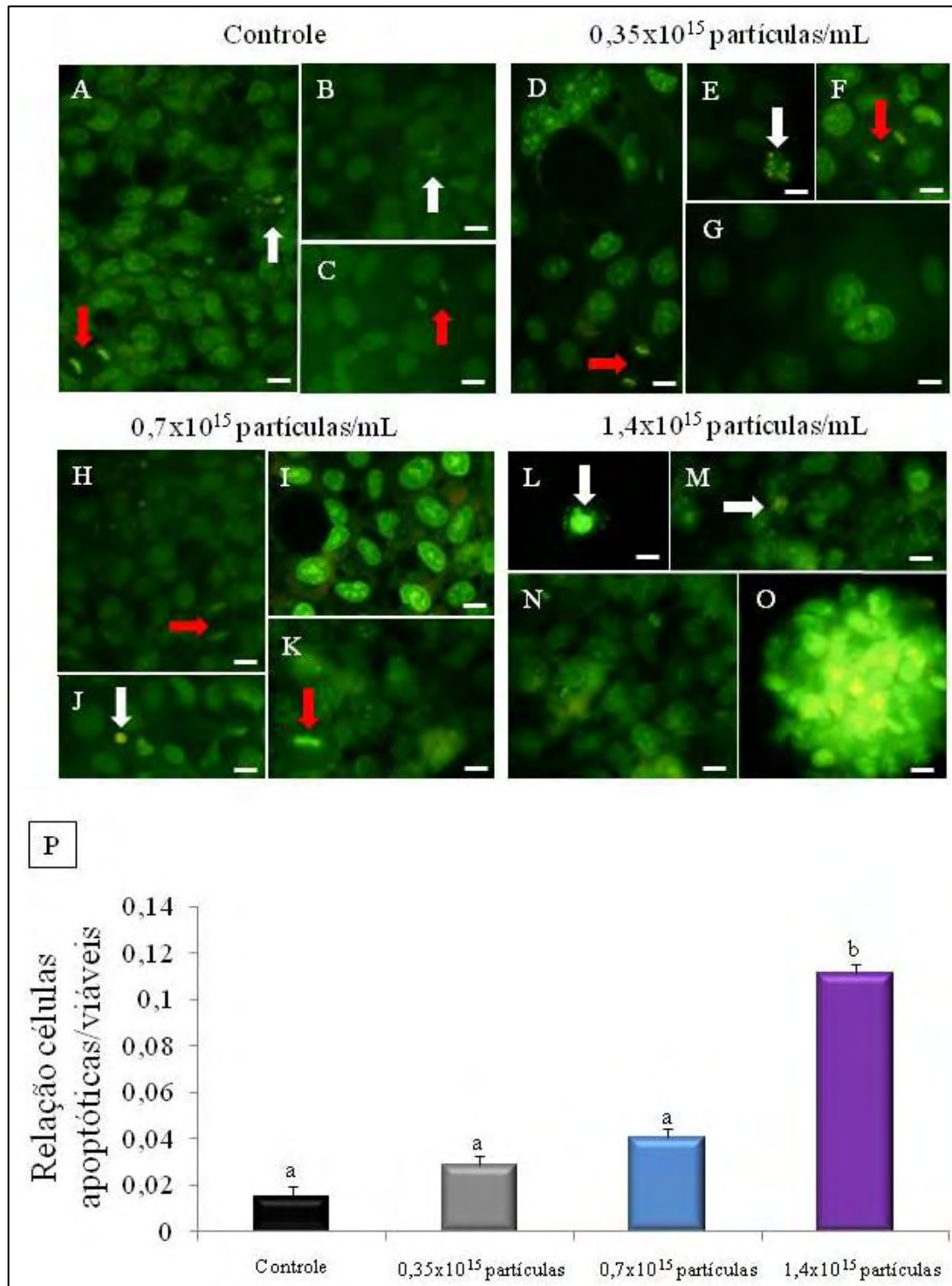


Figura 6. Fotomicrografias das mudanças morfológicas das células controle (A, B e C) na ausência de FFM e quando expostas a nanopartículas, (D, E, F e G) na concentração de 0,35; (H, I, J e K) 0,7 e (L, M, N e O) 1,4 $\times 10^{15}$ partículas/mL de FFM, visualizadas em microscópio de fluorescência. Escala: 10 μ m. Setas vermelhas: células mitóticas. Setas brancas: células apoptóticas. P. Análise quantitativa da taxa de morte celular dada pela média de células apoptóticas em relação às células viáveis. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,001$.

4.2.4 Ensaio MTT

Neste ensaio, cujo objetivo foi verificar a viabilidade celular, as células foram semeadas, em seguida foi realizada a incubação das nanopartículas como descrito no item 3.3 e o emprego da metodologia de ensaio MTT segundo o item 3.4.4.

No controle do experimento, no qual não foi efetuada incubação das células com FFM, os valores das médias de absorbância foram transformados em porcentagem de células viáveis presentes em cada poço, tomados como 100% de viabilidade celular (Figura 7). Sendo assim, verificou-se que a linhagem proliferou normalmente e, que dessa forma, a quantidade de células em processo de divisão foi superior à taxa de mortalidade das mesmas. Esse fato foi observado mesmo sabendo-se que há células que competem pelos nutrientes do meio de cultura e morrem em decorrência disso.

Tal como mostrado pelo ensaio de apoptose, quando expostas ao FFM, o número de células viáveis diminui com o tempo e conforme a concentração de nanopartículas disponíveis no meio aumenta. Sendo assim, nas células incubadas com as diferentes concentrações de nanopartículas foi verificada diminuição das médias de absorbância e, consequentemente, atenuação da viabilidade celular (Figura 7).

Para a concentração de $0,35 \times 10^{15}$ partículas de ferro/mL de FFM, a porcentagem de viabilidade celular foi levemente diminuída após 24 horas, não sendo essa diferença estatisticamente significativa (ligeira diminuição de 94,74% para 91,71%). Para tratamento com $0,7 \times 10^{15}$ partículas de ferro/mL de FFM, os resultados revelaram que não houve alteração da viabilidade celular, não representando diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, sendo que induziu um leve aumento na frequência de células vivas nos tempos de 12 a 24 horas, de 90,41% para 90,84% (Figura 7).

Por fim, para a concentração de $1,4 \times 10^{15}$ partículas de ferro/mL de FFM, as células não foram capazes de tolerar a elevada quantidade de nanopartículas no meio, aumentando a citotoxicidade e a morte celular. Isso foi verificado pela diminuição significativa ($p \leq 0,01$) da viabilidade celular de 61,23% para 46,31% ao longo dos períodos de exposição ao FFM, assemelhando-se à viabilidade celular vista no controle positivo com DMSO, no qual foram observados valores extremamente baixos ($p \leq 0,01$), tais como 19,84%, 14,78% durante os tempos de acompanhamento do experimento (Figura 7). Além disso, o meio de cultura foi-se tornando ácido devido à falta de nutrientes e, dessa forma, as células podem ter entrado em processo apoptótico não somente pela variável presença de nanopartículas, mas também por não conseguirem reter todos os componentes necessários à sua manutenção ideal.

Então, o tratamento das células UM-SCC14A com as diferentes concentrações de nanopartículas resultou na supressão da proliferação celular de maneira dose e tempo dependente. Não foi observada variação significativa entre os valores obtidos nas triplicatas, verificados pelos desvios padrões inferiores a 10% (referente à concentração de $1,4 \times 10^{15}$ partículas Fe/mL), tornando dessa forma, o experimento confiável.

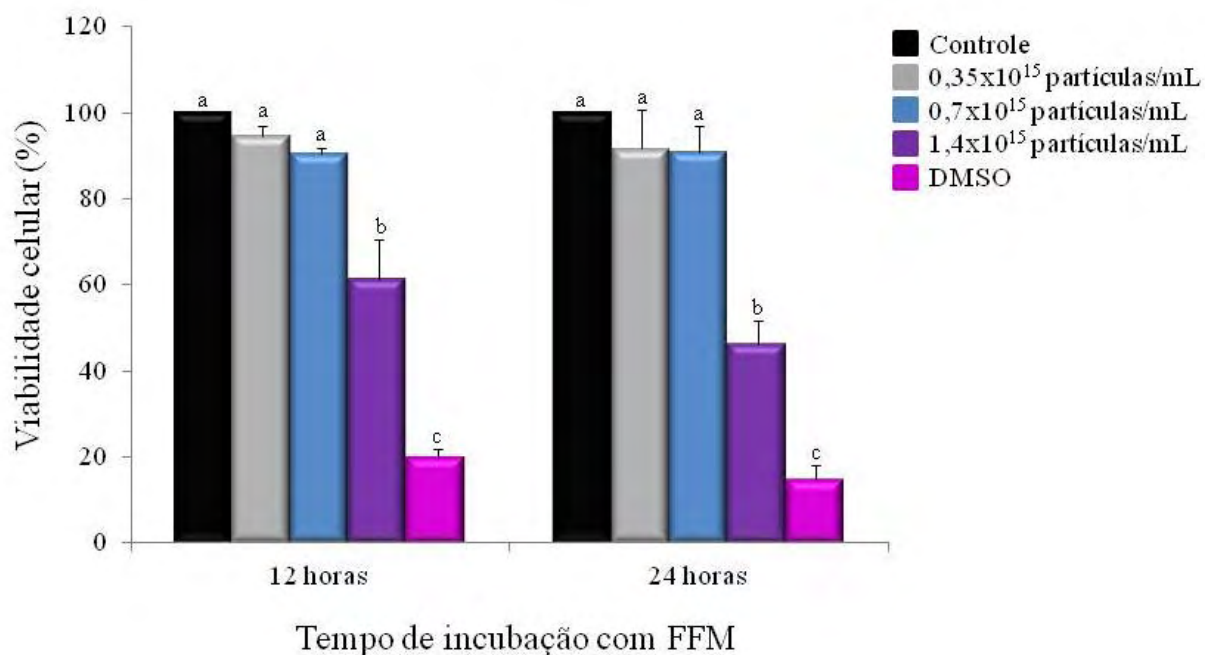


Figura 7. Ensaio MTT analisando viabilidade celular. Porcentagem de células viáveis na linhagem UM-SCC14A não expostas ao FFM, incubadas com nanopartículas nas concentrações de 0,35, 0,7 e $1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM e com DMSO (controle positivo indutor de apoptose), após 12 e 24 horas. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,01$.

4.3 Experimentação *in vivo*

4.3.1 Avaliação biométrica

Apesar de ter sido verificada a presença de carcinoma oral nos animais em que foram induzidos os tumores, não foi atestada perda de peso nos mesmos. Isso pode ser devido ao fato de não ter sido um câncer sistêmico e não terem sido verificadas metástases, as quais acarretariam, em muitos casos, a perda de massa muscular. Na Figura 8, pôde-se observar que não houve diferença significativa entre as massas corporais dos animais normais e com carcinoma oral.

Os animais tratados com FFM provavelmente sentiram um ligeiro incômodo no primeiro dia pós-tratamento, já que a região bucal é crucial para a alimentação. Esse fato foi verificado devido à diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) do peso entre os animais eutanasiados após um dia do tratamento e os animais controle normal e positivo do experimento. Porém, aparentemente, os animais foram se adaptando, chegando próximo à sua massa corporal normal e se recuperando após sete dias da terapia com magneto-hipertermia (Figura 8).

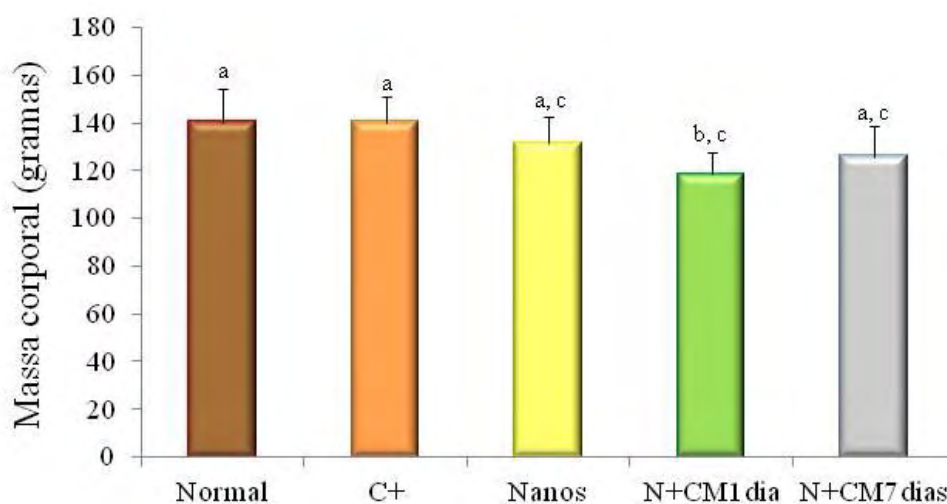


Figura 8. Massa corporal dos hamsters sírios normais, com carcinoma oral, tratados somente com FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, eutanasiados um e sete dias pós-tratamento. Foi adotado como diferença significativa valor de $p \leq 0,05$, indicada por letras distintas.

4.3.2 Avaliação dos cortes de tecido oral pela coloração Hematoxilina-eosina

Para a avaliação histopatológica e confirmação do diagnóstico e eficiência do tratamento, os fragmentos de tecido oral foram corados com Hematoxilina-eosina e analisados por meio de microscópio de luz.

No grupo de animais nos quais não foi induzido o tumor oral, foram visualizadas características celulares e teciduais normais (Tabela 1), como epitélio pavimentoso estratificado e camada de queratina com espessura regular (Figura 9 A-D). Já para os hamsters em que foram induzidos os tumores por meio do carcinógeno DMBA, puderam ser visualizadas algumas características gerais que distinguem células neoplásicas de células normais.

Nestes animais foi observado pleomorfismo celular (várias formas de células no mesmo tecido), núcleos com formas diversas, hipercromáticos e relativamente grandes quando comparados ao citoplasma, células gigantes com vários núcleos e nucléolos prominentes, além de mitoses em elevado número (Figura 9 E-H).

Quanto à disposição tecidual, foi visualizada hiperplasia (aumento da quantidade de células) da camada basal, hipergranulose (hiperplasia do estrato granuloso), hiperqueratose (espessamento do estrato córneo), paraceratose (queratinização com retenção de núcleos celulares no estrato córneo) e acantose (hiperplasia epidérmica difusa). Além disso, foi verificada uma extensão irregular do epitélio da lesão através da membrana basal para dentro do tecido conjuntivo, células escamosas epiteliais e ilhas de células invasivas dentro do tecido conjuntivo sem ligação com o epitélio. Do mesmo modo, estavam presentes pérolas de queratina em áreas focais redondas de células queratinizadas (Figura 9 E-H).

Em menor evidência, mas também constatada, a papilomatose (elevação da superfície causada por hiperplasia) e, ainda observou-se na área comprometida infiltrado inflamatório misto, além de neoformação vascular (Figura 9 E-H). Em resumo, um tumor epitelial, ainda que não invasivo, apresentando várias destas características é considerado maligno com elevada probabilidade de invasão subsequente se não for retirado, sendo denominado carcinoma *in situ* (Tabela 1).

Estas características descritas anteriormente também foram encontradas, em ligeira menor escala, nos animais tratados apenas com FFM. Houve uma leve recuperação do aspecto tumoral em parte dos animais do grupo, porém, sem completa regressão (Figura 9 I-L e Tabela 1).

Já nos animais que combinaram o tratamento com nanopartículas à exposição ao campo magnético de frequência alternada que gera hipertermia, pôde-se observar que houve resposta à terapia de forma tempo dependente, já que os resultados foram mais satisfatórios nos animais que foram eutanasiados após sete dias do tratamento (Figura 9 Q-T) comparado aos sacrificados um dia pós-tratamento (Figura 9 M-P). Esta resposta favorável foi atestada pela verificação de tecido praticamente normal, apesar das células que sofreram apoptose, porém sem as características descritas para o grupo de animais com carcinoma *in situ*. Em termos quantitativos da representabilidade da eficiência da terapia por magneto-hipertermia envolvendo nanopartículas magnéticas de ferro revestidas por polifosfato, houve recuperação de 100% (12/12) dos hamsters sírios tratados dessa maneira (Tabela 1).

Tabela 1. Análise histopatológica de lâminas coradas com HE da cavidade oral direita dos grupos experimentais do trabalho.

Grupo controle sem câncer e sem tratamento	
Identificação da lâmina	Mucosa
A1/Normal	Normal
A2/Normal	Normal
A3/Normal	Normal
A4/Normal	Normal
A5/Normal	Normal
A6/Normal	Normal
Grupo controle positivo com câncer e sem tratamento	
Identificação da lâmina	Mucosa
A1/C+	Câncer espinocelular “in situ” + hiperqueratose acentuada
A2/C+	Câncer espinocelular “in situ” + hiperqueratose acentuada
A3/C+	Câncer espinocelular “in situ” + hiperqueratose acentuada
A4/C+	Câncer espinocelular “in situ” + hiperqueratose acentuada
A5/C+	Câncer espinocelular “in situ” + hiperqueratose moderada
A6/C+	Câncer espinocelular “in situ” + hiperqueratose moderada
Grupo com tratamento exclusivo por nanopartículas (4 dias)	
Identificação da lâmina	Mucosa
A1/Nanos	Câncer espinocelular “in situ” + hiperqueratose moderada
A2/Nanos	Câncer espinocelular “in situ” + hiperqueratose leve
A3/Nanos	Câncer espinocelular “in situ”
A4/Nanos	Hiperqueratose acentuada
A5/Nanos	Hiperqueratose acentuada
A6/Nanos	Hiperqueratose moderada
Grupo com tratamento por nanopartículas e exposição ao campo magnético (eutanasiados 1 dia pós-tratamento)	
Identificação da lâmina	Mucosa
A1/N + CM1dia	Normal
A2/ N + CM1dia	Normal
A3/ N + CM1dia	Normal
A4/ N + CM1dia	Hiperqueratose moderada
A5/ N + CM1dia	Hiperqueratose moderada
A6/ N + CM1dia	Hiperqueratose leve
Grupo com tratamento por nanopartículas e exposição ao campo magnético (eutanasiados 7 dias pós-tratamento)	
Identificação da lâmina	Mucosa
A1/N + CM7dias	Normal
A2/N + CM7dias	Normal
A3/ N + CM7dias	Normal
A4/ N + CM7dias	Normal
A5/ N + CM7dias	Normal
A6/ N + CM7dias	Normal

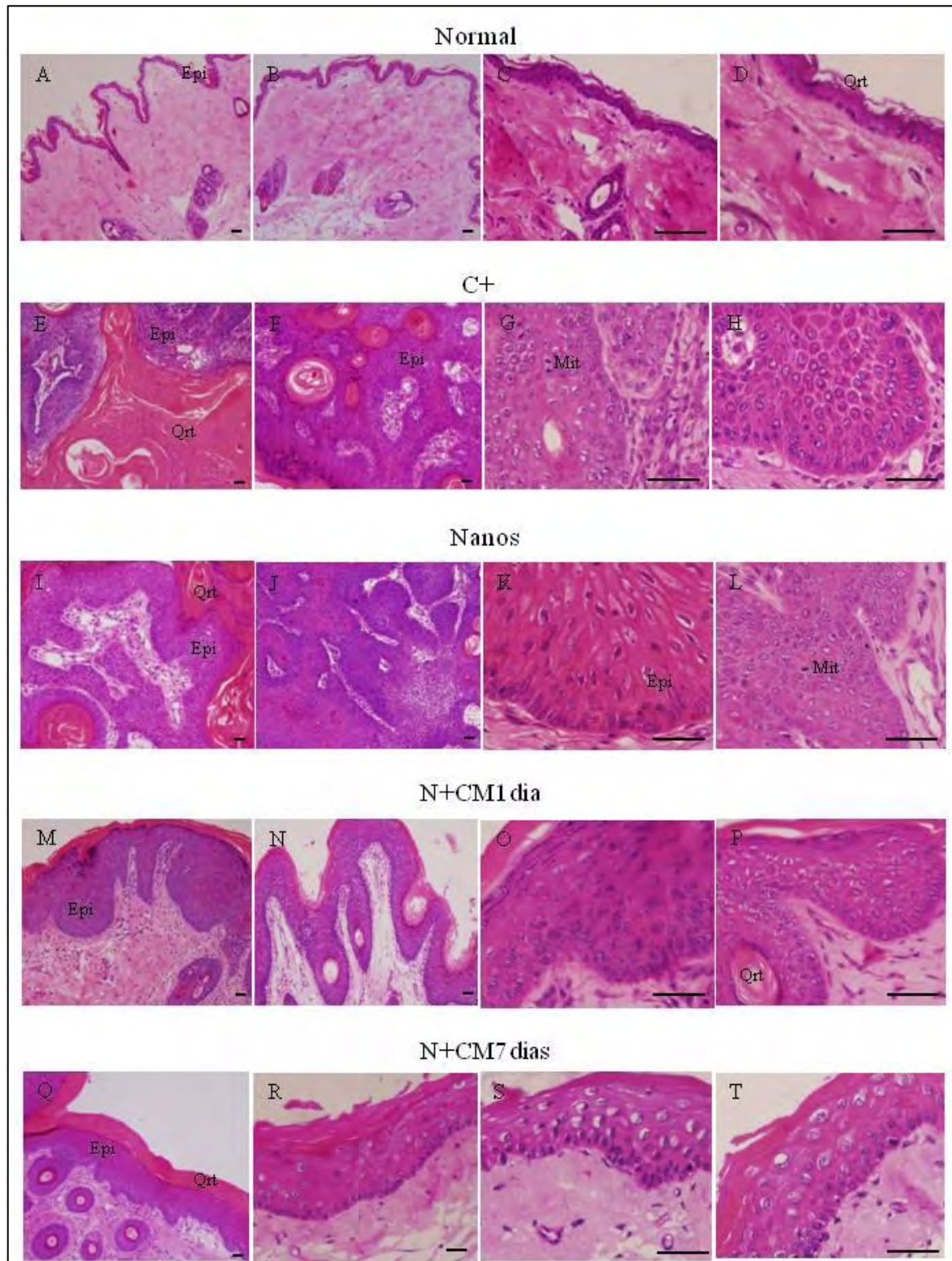


Figura 9. Análise histopatológica dos cortes dos tecidos da cavidade oral dos hamsters, corados com HE. Os animais foram divididos em grupos (A, B, C e D) normal, (E, F, G e H) com carcinoma oral, (I, J, K e L) tratados somente com FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, sendo eutanasiados após (M, N, O e P) um dia e (Q, R, S e T) sete dias do término do tratamento. Epi: epitélio. Mit: mitose. Qrt: queratina. Escala: 20µm.

4.3.3 Avaliação dos demais tecidos pela coloração Hematoxilina-eosina e por sua combinação ao Azul da Prússia

Para visualizar o ferro (endógeno ou proveniente das nanopartículas magnéticas), os cortes foram submetidos ao método de Azul da Prússia associados a HE, procedimento que evidencia os agregados de ferro em coloração azul brilhante.

Então, para confirmar que o carcinógeno DMBA utilizado na indução do tumor oral tivesse ação unicamente local, sem afetar outra área bucal ou demais órgãos por meio de metástases, foram avaliados cortes da região da bochecha esquerda, fígado, coração, pulmões, rins e baço. O fato de outras áreas ocasionalmente estarem afetadas dificultaria o tratamento e, possivelmente, acarretaria em resultados equivocados, não se tratando do foco da pesquisa uma terapia sistêmica, mas sim, local. Além disso, estes mesmos tecidos foram coletados a fim de verificar a biodistribuição e o tempo de ação das nanopartículas antes de sua eliminação pelo organismo.

Dessa forma, não foi verificada nenhuma alteração histopatológica de aspecto canceroso nos tecidos retirados. A bochecha esquerda dos animais não apresentou qualquer mudança no seu perfil morfométrico, sendo visível pelas camadas epidérmica e dérmica inalteradas, bem como pela delgada camada queratinizada. Seu epitélio estratificado pavimentoso mostrou células semelhantes entre si e coesas, e o tecido em geral não revelou neovascularização (Figura 10).

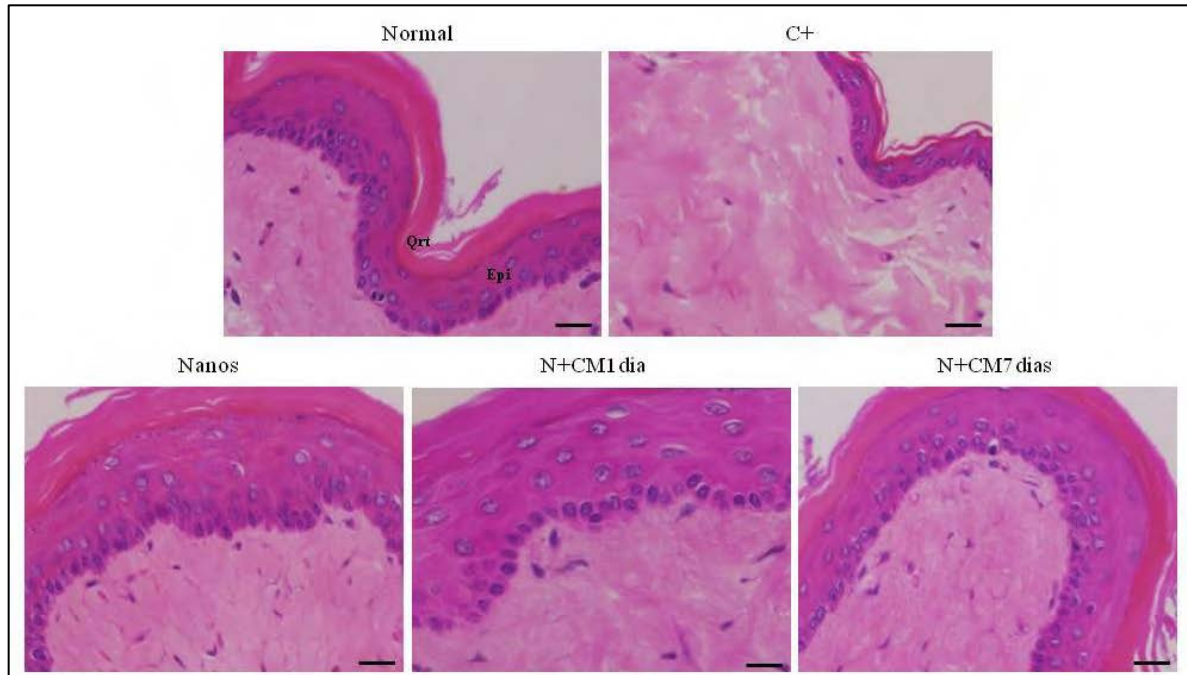


Figura 10. Análise histopatológica do tecido da cavidade oral esquerda (bochecha), sem visualização de diferenças entre hamsters normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e combinando a terapia com FFM à magneto-hipertermia, eutanasiados um e sete dias pós-tratamento. Escala: 20 μ m.

A morfologia geral do fígado demonstrou-se normal também, com placas de hepatócitos dispostas radialmente nas suas diversas unidades básicas (lóbulos hepáticos) circundadas por tecido conjuntivo íntegro. Apresentaram parênquima bem preservado e as células do fígado propriamente dito, os hepatócitos, também se encontravam sem alterações morfológicas, bem como o espaço-porta e artérias e vênulas adjacentes (Figura 11).

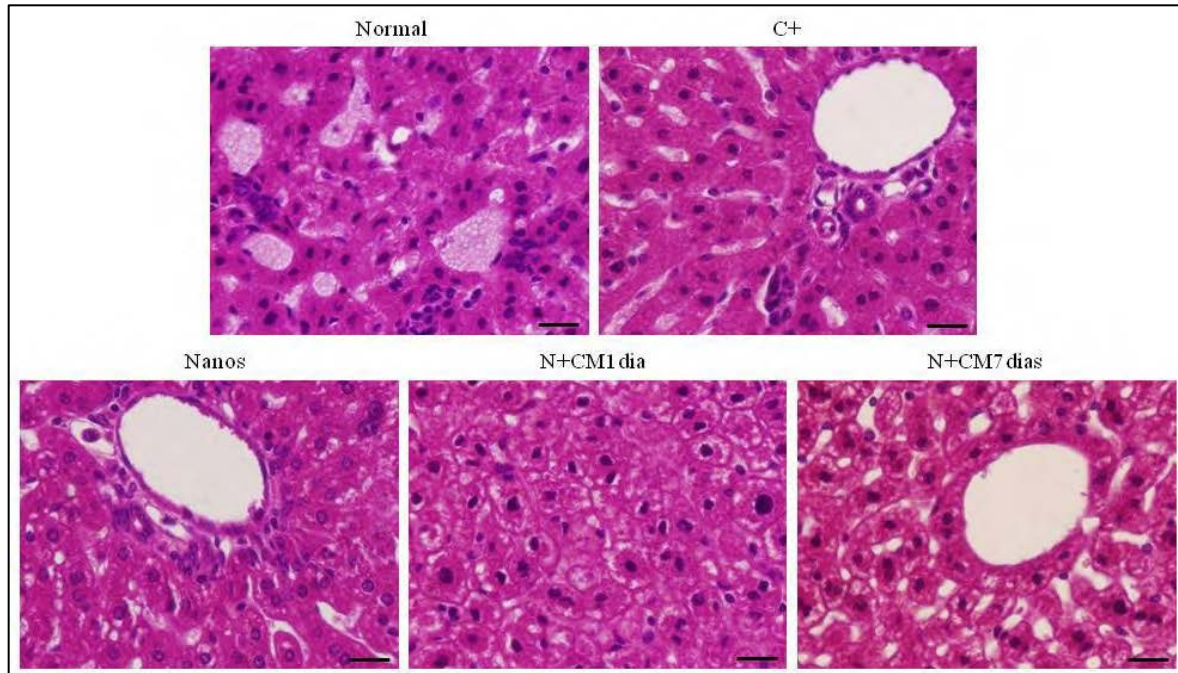


Figura 11. Análise histopatológica do fígado sem visualização de diferenças entre hamsters normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e combinando a terapia com FFM à magneto-hipertermia, eutanasiados um e sete dias pós-tratamento. Escala: 20 μ m.

O coração de todos os grupos de hamsters exibiu características normais do músculo estriado esquelético cardíaco, dispondo-se em feixes bem compactos com miócitos multinucleados na periferia das longas e cilíndricas células. Bastante irrigado, cujos vasos sanguíneos penetram no músculo através dos septos de tecido conjuntivo e correm entre as fibras musculares, como o visualizado na Figura 12.

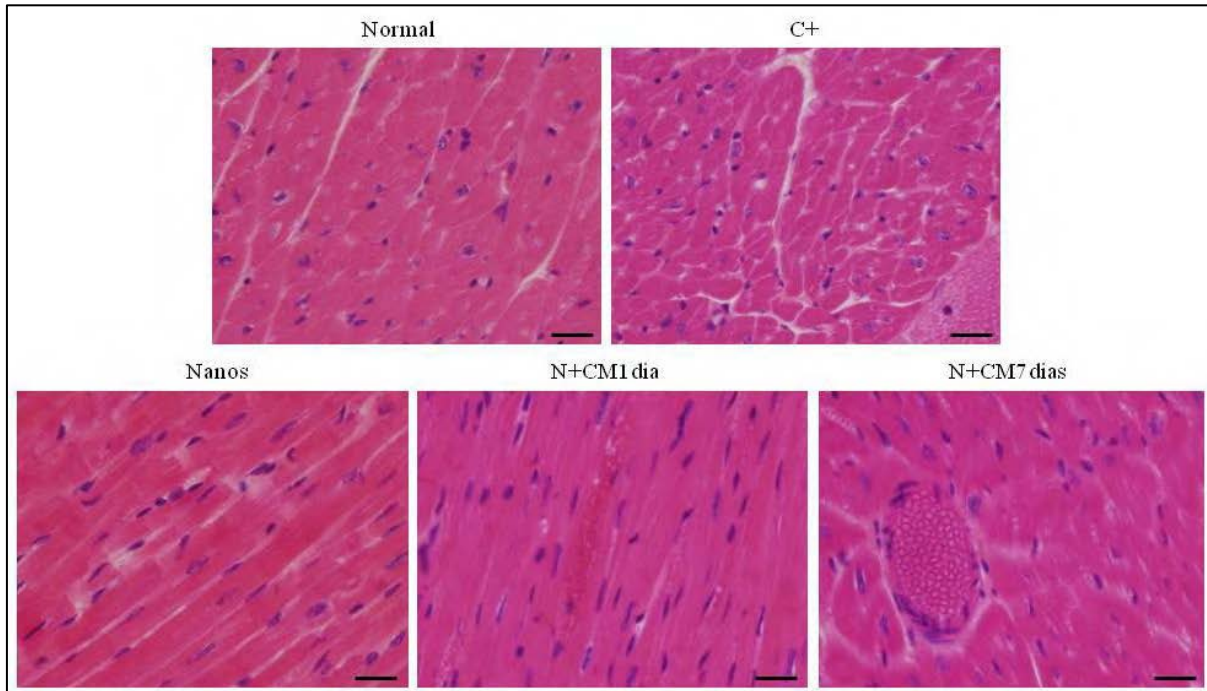


Figura 12. Análise histopatológica do coração, sem visualização de diferenças entre hamsters normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e combinando a terapia com FFM à magneto-hipertermia, eutanasiados um e sete dias pós-tratamento. Escala: 20 μ m.

Em condições normais dos pulmões, como as encontradas em todos os animais dos grupos experimentais, foram visualizados brônquios, bronquíolos e alvéolos de contornos regulares, ricamente supridos por capilares de calibre normal contendo hemácias, vasos sanguíneos e bronquíolos de aspecto e tamanho normais (Figura 13).

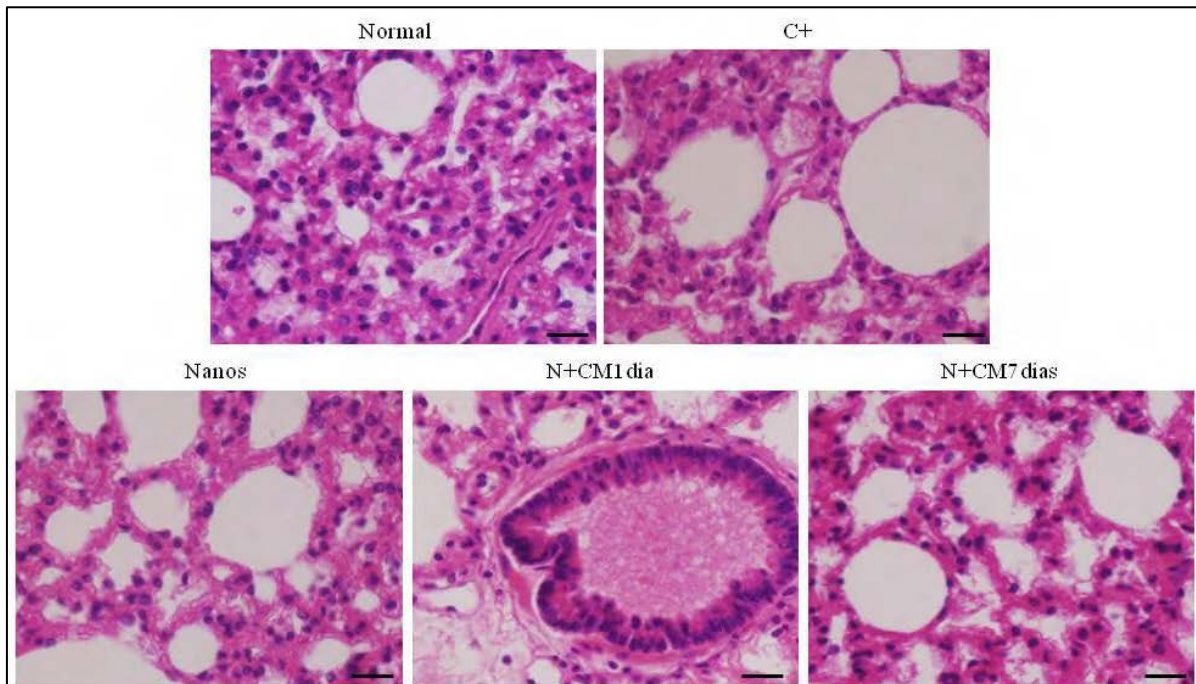


Figura 13. Análise histopatológica dos pulmões, sem visualização de diferenças entre hamsters normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e combinando a terapia com FFM à magneto-hipertermia, eutanasiados um e sete dias pós-tratamento. Escala de 20 μ m.

Anatomicamente, os rins mostraram suas zonas corticais e medulares também inalteradas (Figura 14).

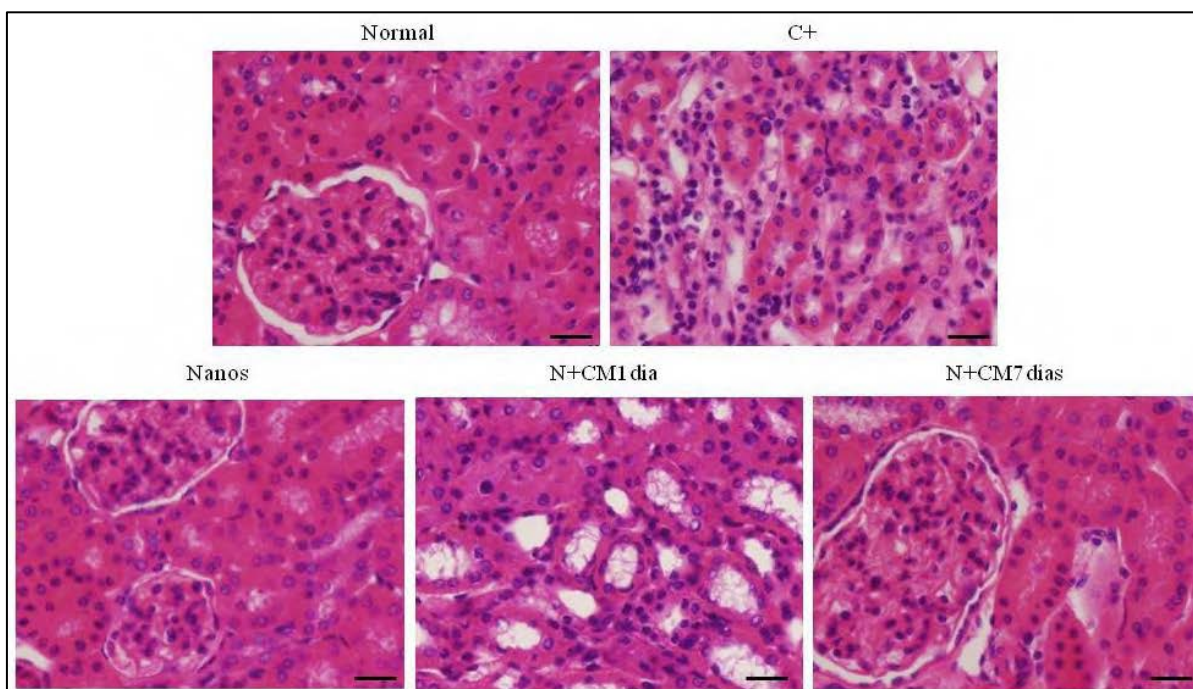


Figura 14. Análise histopatológica dos rins, sem visualização de diferenças entre hamsters normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e combinando a terapia com FFM à magneto-hipertermia, eutanasiados um e sete dias pós-tratamento. Escala: 20 μ m.

Por fim, o baço mostrou sua cápsula constituída de tecido conjuntivo inalterado, além da polpa esplênica dividindo-se em polpa branca e polpa vermelha, que foram claramente diferenciadas; sendo que a polpa branca é constituída por tecido linfóide e, já a polpa vermelha, é rica em vasos sanguíneos (Figura 15).

Quanto à procura pelo FFM nos diferentes cortes, não foi possível verificar intracelularmente as nanopartículas no tecido da cavidade oral direita (onde o fluido foi injetado topicamente para o tratamento) tampouco na maioria dos demais órgãos. A única exceção foi no baço de cerca de 83% (5/6) dos animais do grupo eutanasiado após um dia do tratamento, nos quais foi observada quantidade variável de pequenos aglomerados de coloração azul brilhante. Isso nos mostra que a biodistribuição deste tipo de nanopartículas sintetizadas com óxido de ferro e revestidas por polifosfato de alguma forma passam pelo baço antes de ser eliminadas (Figura 15).

No entanto, também nos foi mostrado que não há acúmulo das nanopartículas pelo organismo, já que após alguns dias as mesmas não foram mais encontradas no órgão. Há diferentes mecanismos *in vivo* que governam o comportamento das nanopartículas, sendo que já foi averiguado que diferentes formatos e cargas de superfície das partículas influenciam na distribuição biológica das mesmas. O fato de apenas o baço ter sido seletivo para este tipo de

FFM pode ser explicado por este ser um órgão linfóide secundário, que degrada hemácias e apresenta função imunológica. Sendo assim, está ligado à eliminação de ferro e, consequentemente, capturou o fluido ferromagnético a fim de realizar esta função dentro do organismo (Figura 15).

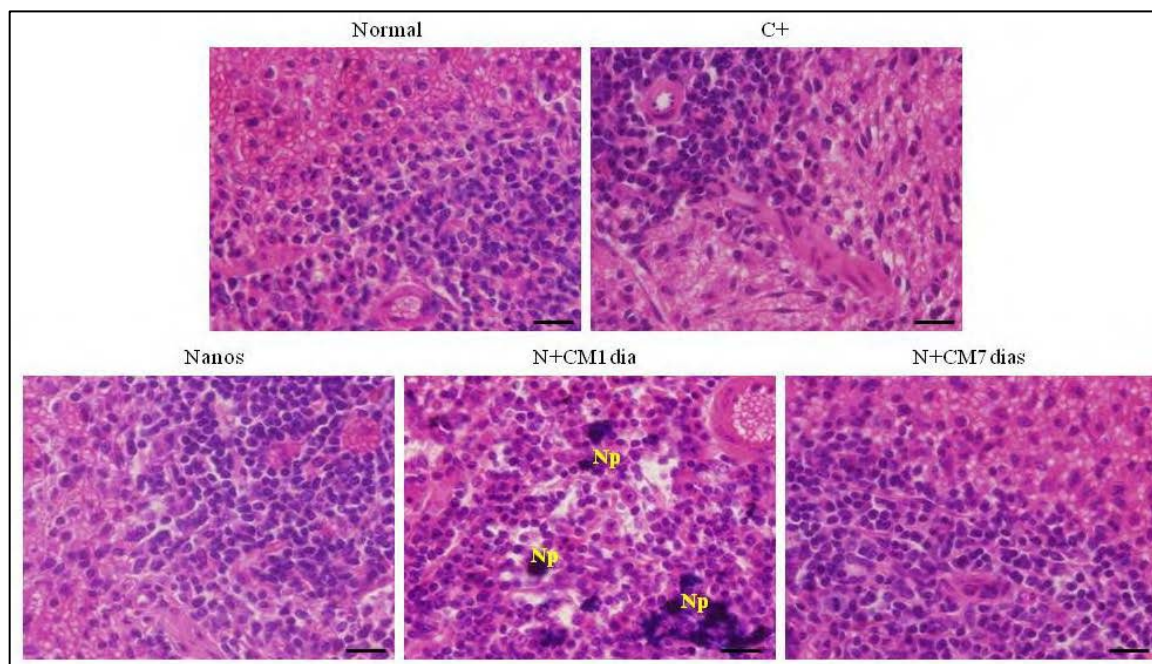


Figura 15. Análise histopatológica do baço de hamsters normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e combinando a terapia com FFM à magneto-hipertermia, eutanasiados um e sete dias pós-tratamento. Foram visualizadas em azul as nanopartículas (Np) do fluido ferromagnético somente nos animais do grupo N+CM1dia. Escala: 20 μ m.

4.3.4 Análise morfométrica populacional

A morfologia geral do tecido oral mostrou que a camada epitelial dos animais normais ($19,31\mu\text{m} \pm 4,22$) é significativamente menor ($p \leq 0,001$) quando comparado aos hamsters com câncer ($775,27\mu\text{m} \pm 188,87$) e tratados apenas com FFM ($665,67\mu\text{m} \pm 168,93$). Porém, houve uma grande regressão estrutural da espessura do epitélio dos animais expostos à magneto-hipertermia que foram eutanasiados após sete dias do tratamento ($114,76\mu\text{m} \pm 44,54$), quando comparada à do grupo controle neoplásico ($p \leq 0,001$), assemelhando este primeiro grupo aos animais normais. O mesmo não foi observado estatisticamente ($p > 0,05$) para os animais sacrificados um dia pós-terapia ($343,24\mu\text{m} \pm 126,83$) (Figura 16).

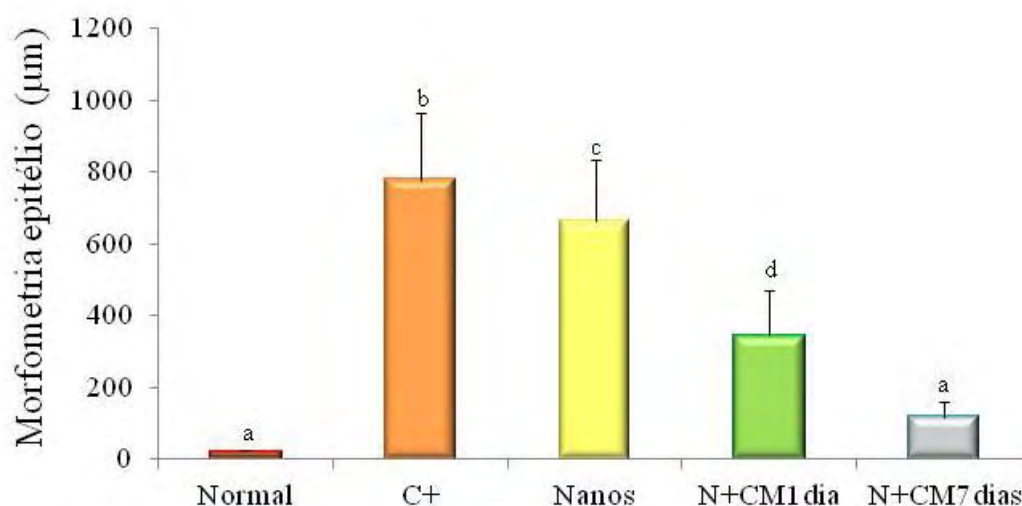


Figura 16. Análise morfométrica do epitélio presente nos tecidos da cavidade oral dos animais normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, eutanasiados um e sete dias pós-tratamento. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,05$.

Para a análise morfométrica da espessura da camada de queratina (Figura 17), foi observado que os valores obtidos para o grupo normal ($11,97\mu\text{m} \pm 3,63$) foram semelhantes aos encontrados nos animais após sete dias de tratamento com hipertermia ($93,94\mu\text{m} \pm 42,91$) e próximos aos eutanasiados um dia pós-tratamento ($231,3\mu\text{m} \pm 137,44$) ($p > 0,05$), demonstrando o retorno ao perfil comum dos animais sem neoplasias epiteliais. No entanto, para os grupos com carcinoma ($888,6\mu\text{m} \pm 181,31$) e tratado somente com FFM ($727,79\mu\text{m} \pm 203,08$), a espessura da camada córnea aumentou significativamente ($p \leq 0,001$) em relação grupo normal, confirmando a presença do tumor e atestando que o tratamento realizado apenas com nanopartículas é insuficiente para uma resposta positiva contra o câncer.

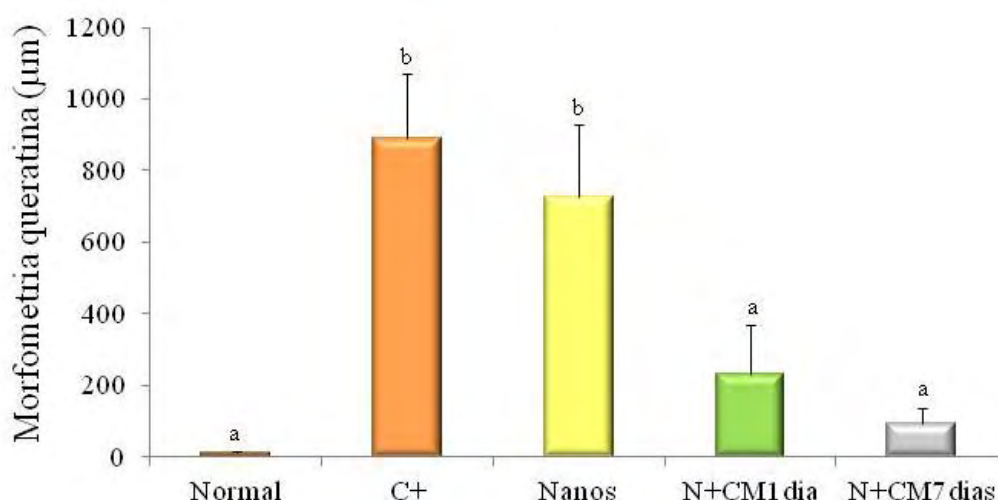


Figura 17. Análise morfométrica da camada de queratina presente nos tecidos da cavidade oral de hamsters sírios normais, com carcinoma oral, tratados com $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, eutanasiados um e sete dias pós-tratamento. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,001$.

Como já descrito anteriormente para a Figura 9 e agora corroborado pela análise morfométrica, o epitélio e a camada de queratina dos tecidos orais comprometidos apresentou configuração ondulada, disforme e maior, que destoavam do padrão estrutural do tecido, mostrando lesões e projeções epiteliais em direção ao tecido conjuntivo. Isso gerou a importante reestruturação no arranjo tecidual quando comparado ao grupo experimental normal. Os tecidos dos hamsters tratados com hipertermia mostraram uma reversão no processo carcinogênico evidenciada pela morfologia celular, havendo clara diminuição da altura das células epiteliais e espessura da camada de revestimento córneo. Isso revelou que a neoplasia regrediu nos grupos experimentais tratados com magneto-hipertermia, com pequena variação do conjunto de dados.

4.3.5 Imunocitoquímica para avaliação da proliferação celular (PCNA)

O PCNA, que é o antígeno nuclear de proliferação celular cuja proteína está associada à atividade proliferativa, é sintetizado durante a interfase e desaparece no final da mitose. Neste caso do epitélio pavimentoso estratificado presente na mucosa das bochechas direitas dos animais, foi verificada uma imunomarcacão extremamente menor de PCNA e localizada apenas na camada basal nos tecidos normais (Figura 18 A-C) e tratados com hipertermia (Figura 18 J-O), quando comparada aos tecidos dos animais com carcinoma espinocelular (Figura 18 D-F) e os tratados apenas com FFM (Figura 18 G-I), os quais exibiram alta e

difusa expressão de PCNA ao longo do tecido. Na Figura 18 P está demonstrado o controle da imunorreação, no qual foi omitido o anticorpo primário, não havendo marcação nuclear de nenhuma célula em proliferação.

A imunorreatividade densitométrica da expressão do PCNA foi realizada nos tecidos da cavidade oral e refletiu a análise qualitativa da imunocitoquímica. Foi possível observar que houve um aumento significativo da expressão endógena da proteína (Figura 18 Q), principalmente nas células do tecido canceroso ($205,16 \pm 20,56$; $p \leq 0,001$) e que passaram pelo tratamento unicamente com nanopartículas ($187,77 \pm 26,81$; $p \leq 0,01$), mostrando que uma das características marcantes da carcinogênese é o aumento e descontrole da proliferação celular.

A expressão do PCNA (Figura 18 Q) não apresentou diferença significativa entre os epitélios dos tecidos normais ($152,14 \pm 29,51$) e tratados com campo magnético eutanasiados após um ($178,05 \pm 20,82$) ou sete dias do término do tratamento ($149,57 \pm 28,75$) ($p > 0,05$). Isso mostrou que a magneto-hipertermia possibilitou uma recuperação do estado canceroso dos animais a um aspecto praticamente normal do tecido em questão, no qual a proliferação celular refletiu a manutenção da homeostase do organismo.

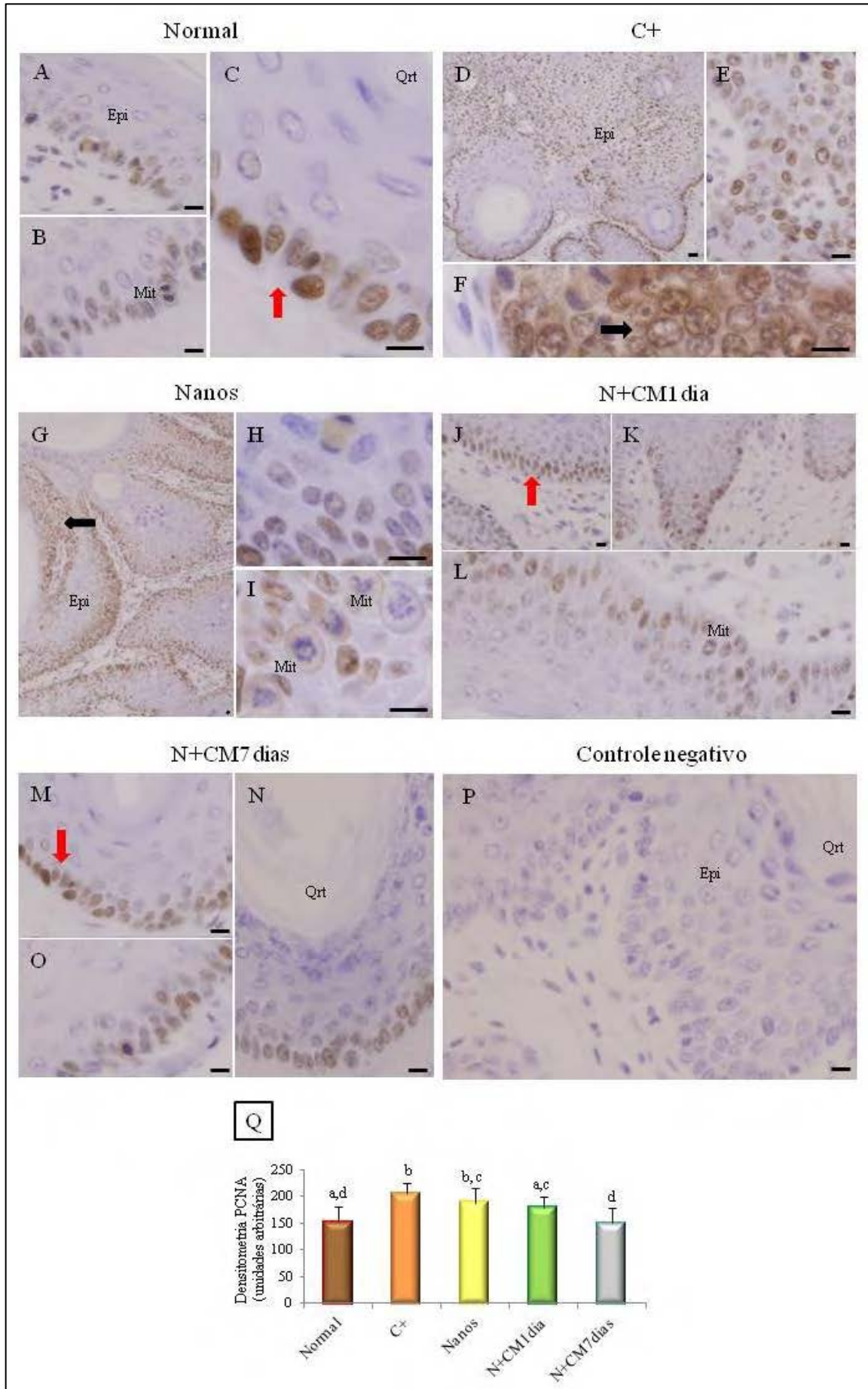


Figura 18. Secções histológicas submetidas à imunocitoquímica para o PCNA (marcador de proliferação celular) nos epitélios da mucosa oral de hamsters sírios (A, B e C) normais, (D, E e F) com carcinoma oral, (G, H e I) tratados com $0,7 \times 10^{15}$ partícula de ferro/mL de FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, eutanasiados após (J, K e L) um e (M, N e O) sete dias do término do tratamento. (P) Controle negativo. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Escala: 10 μ m. Epi: epitélio. Mit: mitose. Qrt: queratina. A marcação nos grupos Normal, N+CM1dia e N+CM7dias apresentam-se limitadas à membrana basal do epitélio (setas vermelhas); já os grupos C+ e Nanos mostraram mitoses atípicas e marcação dispersa por todo o tecido (setas pretas). (Q) Análise quantitativa da imunomarcação do PCNA nos diferentes grupos experimentais. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,05$.

4.3.6 Imunocitoquímica para avaliação da apoptose induzida pelo tratamento (caspase-3 ativada)

A família das caspases representa um importante papel no processo apoptótico, sendo a caspase-3 a mais extensivamente estudada entre os membros desta família. Sendo assim, foi possível verificar marcação acentuada de caspase-3 ativada, localizada principalmente na camada superior do epitélio, próximo à camada de queratina, nos tecidos normais (Figura 19 A-C) e tratados com magneto-hipertermia (Figura 19 H-L), quando comparada com a reduzida marcação nos tecidos dos animais com carcinoma espinocelular (Figura 19 D e E) e nos tratados somente com nanopartículas (Figura 19 F e G). Já a Figura 19 M, mostra o controle negativo da imunocitoquímica.

Na análise quantitativa por densitometria (Figura 19 N), foi visualizada elevada marcação da caspase em tecidos normais ($200,63 \pm 24,89$) e nos que passaram por tratamento com magneto-hipertermia, sendo sacrificados após um dia ($188,82 \pm 36,27$) ou sete dias ($203,21 \pm 27,58$). Já para os hamsters com câncer oral ($173,51 \pm 28,84$) e para os que foram tratados unicamente com FFM ($175,84 \pm 31,30$), não houve diferença significativa entre si ($p > 0,05$), porém foi observada diferença estatística ($p \leq 0,001$) quando comparados aos animais controle sem carcinoma. Isso demonstra, mais uma vez, o caráter canceroso que foi obtido pela indução do tumor e também evidencia que a terapia realizada apenas com nanopartículas, sem a presença de hipertermia induzida, não é capaz de eliminar eficientemente as células tumorais e reverter o quadro patológico.

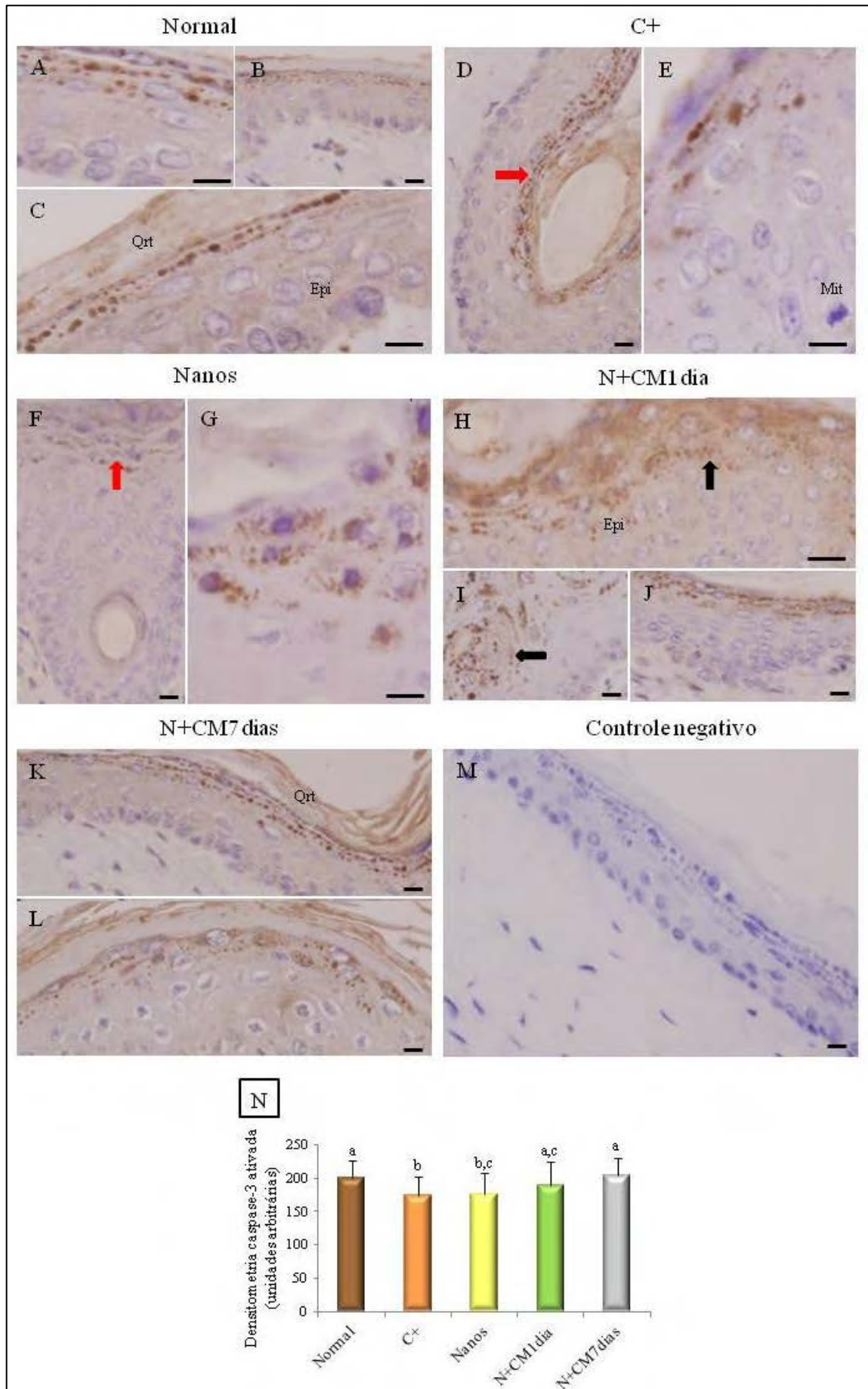


Figura 19. Imunocitoquímica para a caspase-3 ativada (marcador de apoptose) nos epitélios de hamsters sírios (A, B e C) normais, (D e E) com carcinoma oral, (F e G) tratados com $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, eutanasiados após (H, I e J) um e (K e L) sete dias do término do tratamento. (M) Controle negativo. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Escala: 10 μ m. Epi: epitélio. Mit: mitose. Qrt: queratina. A marcação nos grupos C+ e Nanos apresentam-se limitadas à camada superior do epitélio, próxima da camada ou das ilhas de queratina (setas vermelhas); já os grupos Normal, N+CM1dia e N+CM7dias mostraram, além da marcação na já referida região do epitélio, marcação acentuada dispersa em camadas inferiores (setas pretas). (N) Análise quantitativa da expressão da caspase nos diferentes grupos experimentais. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,05$.

4.4 Análise da série branca sanguínea

4.4.1 Avaliação da contagem global de leucócitos

O efeito pró-inflamatório da administração do FFM foi verificado por meio da contagem das células do sangue periférico, sendo que a contagem global de leucócitos mostrou variações de acordo com os diferentes grupos experimentais. Nos hamsters com carcinoma oral (8300 leucócitos $\pm$ 1658,92) houve um aumento da resposta inflamatória, verificada pela diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo normal (6333,33 $\pm$ 1270,7) sem indução de câncer (Figura 20).

Contudo, nos animais tratados com hipertermia (5283,33 $\pm$ 1212,3 para N+CM1dia; 6416,67 $\pm$ 832,87 para N+CM7dias), houve um expressivo decréscimo nesta população de leucócitos em relação aos animais com câncer ($p \leq 0,05$). Foi verificado retorno ao estado normal, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos normal e tratados com campo magnético ($p > 0,05$). Além disso, apesar de não tão evidente, os animais tratados apenas com FFM (7483,33 $\pm$ 1720,95) também não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado ao grupo normal e, em última análise, nem em relação aos animais com tumor (Figura 20).

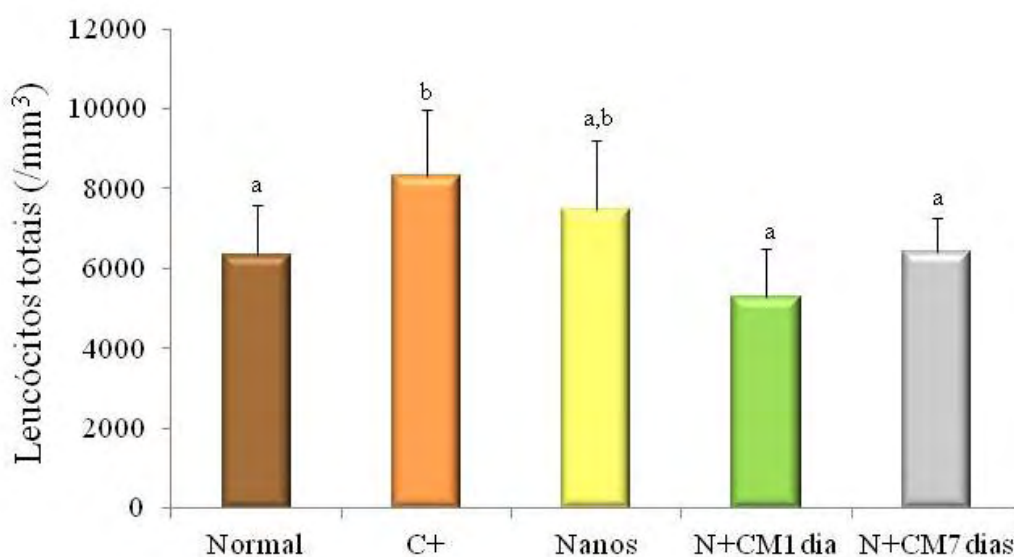


Figura 20. Contagem global de leucócitos de animais normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, eutanasiados após um e sete dias do término do tratamento. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,05$.

4.4.2 Avaliação da contagem diferencial de leucócitos

A citometria de fluxo é uma das análises utilizadas para avaliação dos efeitos citotóxicos dos fluidos magnéticos em sangue periférico. As células brancas do sangue de interesse no estudo (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos) foram quantificadas na análise em microscopia de luz, sendo contadas 500 células em cada lâmina obtida dos animais investigados.

A população de linfócitos sofreu um decréscimo considerável após a aplicação das nanopartículas, sendo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) somente após sete dias do tratamento com campo magnético ($37,5\% \pm 11,15$) em relação aos controles experimentais normal e canceroso (Figura 21). Para o restante dos grupos não foi visualizada diferença estatística em quaisquer comparações ($p > 0,05$). Os animais normais ($55\% \pm 13,39$), com câncer ($51,67\% \pm 9,4$), tratados com FFM ($44,33\% \pm 13,59$) e tratados com FFM em conjunto à magneto-hipertermia sendo eutanasiados após um dia do tratamento ($44,5\% \pm 5,96$) encontravam-se incluídos em um padrão considerado ideal da quantidade de linfócitos para um hamster sírio saudável, que varia de 40 a 77%.

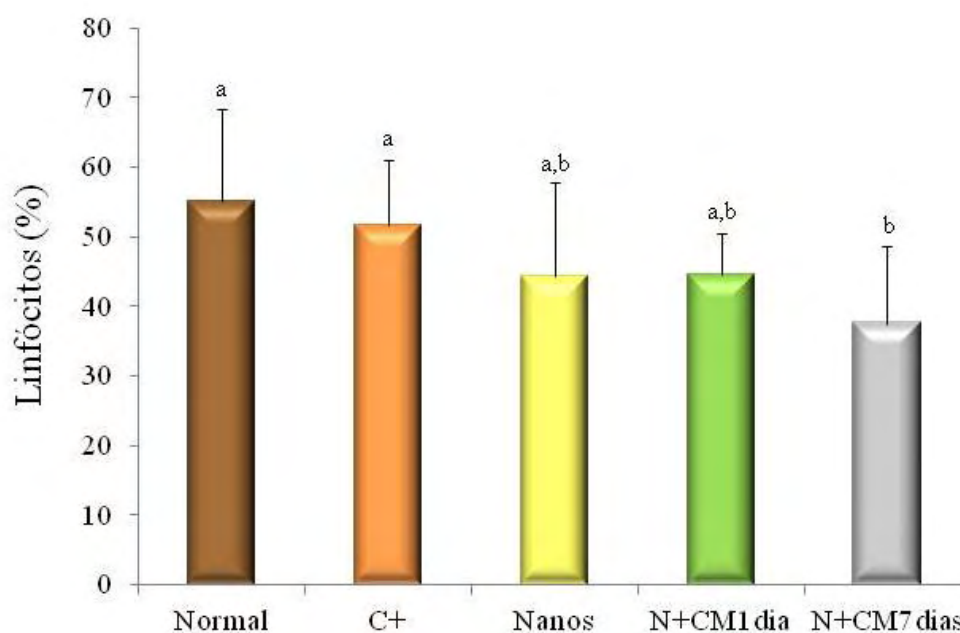


Figura 21. Contagem de linfócitos de animais normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, eutanasiados após um e sete dias do término do tratamento. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,05$.

Pela mensuração da quantidade de neutrófilos (Figura 22) foi possível observar o mesmo padrão de diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos que o verificado na análise da contagem dos linfócitos, sendo que o grupo N+CM7dias ($58,5\% \pm 9,59$) não se encaixou nos arquétipos desta linhagem de hamsters, estando um pouco acima do esperado, valor que deveria representar de 20 a 54% dos leucócitos totais.

Já o restante dos grupos, normal ($48,33\% \pm 6,59$), com neoplasia ($44,17\% \pm 9,09$), o que empregou nanopartículas como forma única de tratamento ($53,33\% \pm 13,72$) e o que utilizou magneto-hipertermia e foi sacrificado após um dia ($52,67\% \pm 6,06$), apresentaram quantidades totais de neutrófilos permeando o ideal.

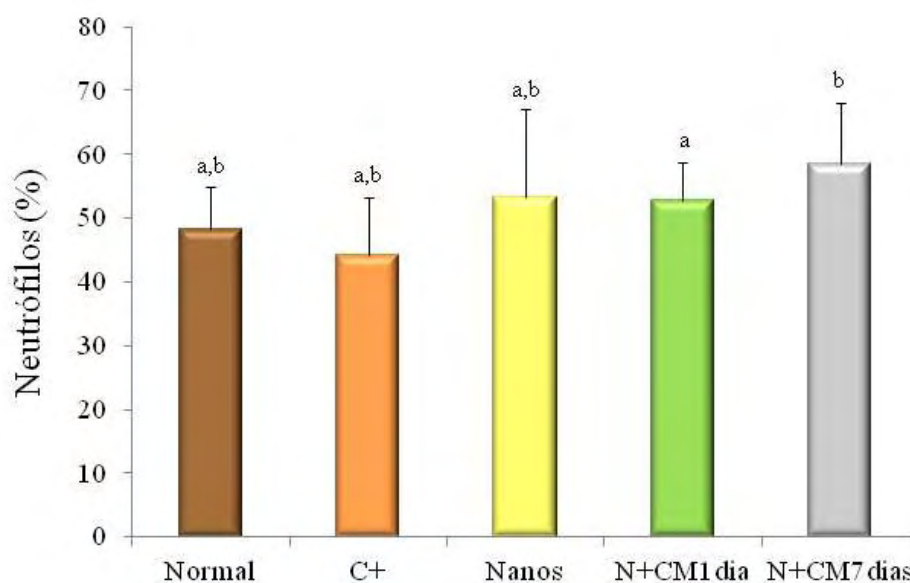


Figura 22. Contagem de neutrófilos de animais normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, eutanasiados após um e sete dias do término do tratamento. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,05$.

Em relação à população de eosinófilos, observaram-se muitas variações (Normal com $0,33\% \pm 0,52$; C+ com $0,83\% \pm 0,41$ e Nanos com $0,5\% \pm 0,55$), que culminam em diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) somente entre os grupos de animais tratados com hipertermia ($0,83\% \pm 0,41$ para N+CM1dia; e ausência deste tipo celular no grupo N+CM7dias), no entanto, todos os grupos adequaram-se à faixa admissível de zero a 3% de eosinófilos circulantes (Figura 23).

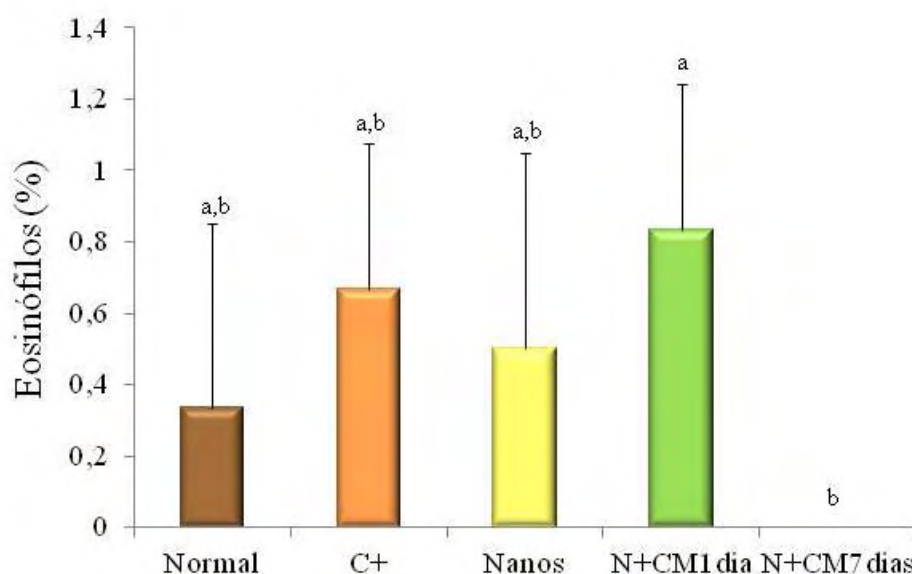


Figura 23. Contagem de eosinófilos de animais normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, eutanasiados após um e sete dias do término do tratamento. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,05$.

Por fim, analisada a porcentagem de monócitos circulantes (Figura 24), verificou-se que todos os grupos experimentais se encaixavam no intervalo aceitável de zero a 4% deste tipo celular. Durante o período experimental, os resultados mostraram uma redução estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$) dos grupos tratados com FFM ($2,17\% \pm 0,75$) e tratados com hipertermia, eutanasiados após um dia ($2,33\% \pm 0,52$), em relação ao grupo com carcinoma oral ($3,5\% \pm 0,55$). Entretanto, os valores foram aumentando, até que se normalizaram após sete dias ($3\% \pm 1,27$) e tornaram-se semelhante ao encontrado nos animais normais ($2,83\% \pm 1,17$), não havendo diferença significativa entre os mesmos.

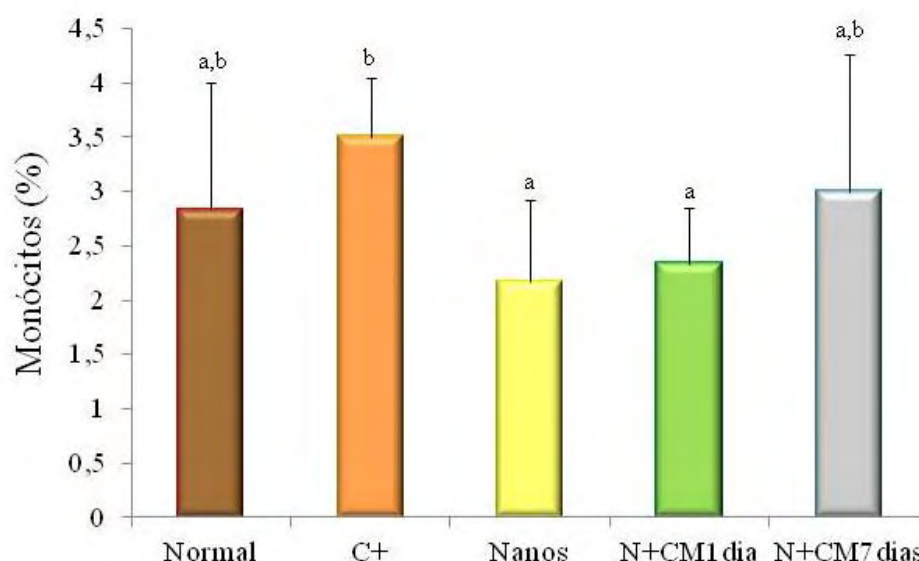


Figura 24. Contagem de monócitos de animais normais, com carcinoma oral, tratados com FFM e tratados com FFM combinado à magneto-hipertermia, eutanasiados após um e sete dias do término do tratamento. Diferença significativa indicada por letras distintas: $p \leq 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O tratamento do carcinoma oral de células escamosas inclui terapias convencionais envolvendo, principalmente, cirurgia, quimioterapia e radioterapia, e são constantemente avaliadas a fim de determinar sua eficácia em promover, a longo prazo, uma sobrevida livre do câncer (FEKRAZAD et al., 2011). A terapia térmica é uma nova abordagem por meio de tratamento não invasivo e que está sendo rapidamente reconhecida como uma das estratégias terapêuticas mais eficazes para ser direcionada especificamente às células do tumor. Combinada à hipertermia, a nanotecnologia abre caminho para um vasto campo de possibilidades de aplicação na terapia do câncer, em especial, para o tratamento do carcinoma oral. Para isso, é necessária constante renovação das técnicas de síntese e caracterização das nanopartículas.

Conforme vários grupos têm desenvolvido novas nanopartículas a fim de aperfeiçoar a biocompatibilidade e a eficiência de internalização (HIRSCH et al., 2003; REYNOLDS; MOGHIMI; HODIVALA-DILKE, 2003; BERNARDI et al., 2008), uma caracterização profunda dessas novas partículas torna-se necessária a fim de comparar seus efeitos biológicos e utilidades (SHEIKHOLESLAMI et al., 2010). Em vista disso, diversos grupos têm focado seu trabalho no desenvolvimento de novos métodos que possam fornecer dados adicionais referentes às características das mesmas (BERNARDES et al., 2010).

Sendo assim, a biocinética de nanomateriais depende, principalmente, de características como tamanho, formato, composição química, estrutura superficial, solubilidade e capacidade de agregação. Esses parâmetros podem modificar a captação pela célula, o deslocamento até o local alvo e a possibilidade de causar danos teciduais (LEMKE et al., 2004; NEL et al., 2006).

O diâmetro é um parâmetro tão importante (CUI et al., 2012), que revelou, em uma série de experimentos toxicológicos, que partículas de politetrafluoretileno com tamanho de 20nm foram letais quando inaladas, enquanto que as mesmas partículas de tamanho maior, 130nm, não produziram qualquer efeito prejudicial no ar respirado (SERVICE, 2003). Neste trabalho, as nanopartículas magnéticas à base de maguemita recobertas por polifosfato constituintes de um fluido ferromagnético (FFM) apresentaram diâmetro modal que variou de 8 a 10nm, aproximadamente. A escolha destas nanopartículas magnéticas para o desenvolvimento da amostra foi feita por diversas razões, várias delas relacionadas ao seu tamanho.

Partículas muito pequenas, com diâmetro inferior a 7nm, além de serem tóxicas, podem perder a capacidade de responder ao campo magnético de frequência alternada e, conseqüentemente, não permitir a elevação da temperatura no local de aplicação, impedindo seu emprego na magneto-hipertermia (MA et al., 2004). Nanopartículas com diâmetros na faixa de 8 a 15nm, quando constituídas da mesma composição e mesma cobertura, apresentaram menor toxicidade do que as menores que 8nm ou maiores que 15nm (LACAVA; MORAIS, 2004).

O tamanho pode representar uma estratégia de seletividade para atingir apenas o tecido tumoral. As nanopartículas podem ser capazes de penetrar tumores devido à natureza descontínua ou até mesmo avariada de sua microvasculatura, que tipicamente apresenta poros de 100 a 1000nm de diâmetro. A microvasculatura de tecidos saudáveis varia de acordo com o tipo de tecido, mas em sua maioria, há junções intercelulares justas, menores que 10nm. Dessa forma, partículas menores que os poros presentes na vasculatura tumoral e maiores do que os poros de tecidos saudáveis apresentam, provavelmente, tamanhos muito adequados para o tratamento do câncer (HUGUES, 2005).

Outro fator relevante para a utilização de nanopartículas magnéticas em aplicações biológicas é a cobertura destes nanomateriais. O revestimento é um fator estabilizante para o fluido, pois permite que as partículas não se aglomerem e nem se precipitem em meio líquido. Encontra-se disponível um extenso repertório de revestimentos que podem ser utilizados nas nanopartículas. Dessa forma, a amostra do presente estudo foi selecionada já que a cobertura

com fosfato, molécula abundante nos seres vivos, sendo que o fósforo é o segundo elemento mineral mais abundante em nosso organismo, desempenha ampla gama de funções essenciais. Além disso, confere potencial de biocompatibilidade às nanopartículas, pré-requisito para que possam ser consideradas potenciais candidatas para mediar aplicações biomédicas, como a magneto-hipertermia (PORTILHO-CÔRREA, 2007).

A carga de superfície das nanopartículas é outro parâmetro que influencia de maneira significativa o comportamento da amostra, interferindo principalmente na estabilidade da suspensão e no tempo de circulação em sistemas vivos. Tem sido demonstrado que nanopartículas neutras ou de carga negativa permanecem mais tempo na circulação e a sua composição e características de superfície têm influência no seu padrão de distribuição, sobretudo devido à ação do sistema fagocitário mononuclear (LEMKE et al., 2004).

O potencial de carga de superfície (potencial zeta) da amostra revelou que sua carga é negativa, pois variou em torno de $-43,4\text{mV}$, valor próximo ao de outro sistema nanoparticulado que apresentou excelente estabilidade (SANTOS et al., 2006; GREENHALGH, 2007). O potencial zeta é dado em função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Por ser um indicador útil da carga efetiva das partículas, esse dado pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões coloidais. Quanto maior o valor absoluto do potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem e essa força supera a tendência natural à agregação (SCHAFFAZICK et al., 2003; NANOCOMPOSIX, 2012). Esta é, portanto, outra característica interessante da amostra em questão.

A constituição química do núcleo das nanopartículas, ou seja, a parte que lhes atribui propriedades magnéticas, é um fator essencial na determinação da biocompatibilidade de amostras à base de nanopartículas magnéticas, pois dependendo de sua natureza, podem exibir comportamentos significativamente diferentes. Em muitas amostras investigadas, o composto utilizado é a magnetita (Fe_3O_4), ou sua forma oxidada, a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), que por assim estar, parece ser mais promissora em aplicações biomédicas, uma vez que a possibilidade de desencadear processos oxidativos no organismo é menor (GUPTA; GUPTA, 2005).

Foi constatado que nanopartículas de maguemita recobertas com citrato causaram toxicidade menor do que as nanopartículas de magnetita também recobertas com citrato (BRUGIN, 2007). Corroboram este fato os achados de Sonvico e colaboradores (2005) com testes *in vitro* com nanopartículas de maguemita recobertas com folato, na qual foi constatada apenas toxicidade branda e temporária.

Amostras de composições diversas exibem comportamentos também variados. Fluidos contendo nanopartículas à base de ferrita de manganês induziram genotoxicidade, diarreia, inflamação severa e morte em camundongos após o tratamento (LACAVA et al., 1999 a), enquanto nanopartículas magnéticas à base de ferrita de maguemitita revestidas por citrato (BRUGIN, 2007) ou polifosfato (PORTILHO-CORRÊA, 2007) mostraram um brando e transitório efeito inflamatório, sem letalidade aos animais. Neste estudo, o FFM sintetizado não mostrou qualquer efeito prejudicial ao organismo, nas condições experimentais testadas; fato que foi corroborado pela contagem global de leucócitos.

Além disso, o trabalho ainda se justifica já que podem ser encontrados diversos testes com nanopartículas à base de magnetita (FREITAS et al., 2003; LACAVA et al., 2003; 2004; GUEDES et al., 2004; 2005; CHAVES et al., 2005), porém, até o momento, testes *in vivo* com nanopartículas de maguemitita semelhantes à do presente trabalho, se restringem somente ao do estudo realizado por Portilho-Côrrea (2007).

A pesquisa de novos fármacos e sistemas terapêuticos deve passar por uma série de etapas até ser avaliada por autoridades regulatórias e aprovada para uso em humanos. Testes *in vitro* e *in vivo* (HOU et al., 2009; YANG et al., 2010; 2012) em diferentes espécies animais consistem as primeiras etapas de estudos, os pré-clínicos, que depois passam aos estudos clínicos, em seres humanos, que avaliam em suas fases a segurança do novo composto, tolerância, dose adequada, farmacocinética, efeitos adversos, entre outros parâmetros (ANVISA, 2012). Alguns sistemas baseados em nanotecnologia já se encontram em fase de estudos clínicos e têm mostrado um potencial enorme para melhorar o perfil farmacológico de agentes antineoplásicos (GRADISHAR et al., 2005; IBRAHIM et al., 2005; JOHANNSEN et al., 2007).

Contudo, ainda há muito o que se pesquisar, tanto por meio de ensaios *in vitro* quanto *in vivo*, sobre novos sistemas nanoparticulados que apresentam potencial para ser empregados futuramente em humanos. Qualquer característica inédita nas amostras testadas, seja na superfície das partículas (SADEGHIANI et al., 2005), na composição do núcleo (PORTILHO-CORRÊA, 2007) ou do meio em que estão suspensas (BARBOSA et al., 2006), justificam a realização de testes biológicos que possam garantir sua biocompatibilidade, que envolve a biodegradabilidade, hemocompatibilidade e ausência de efeitos tóxicos antes que possam ser utilizadas em seres humanos.

Embora os nanomateriais exibam propriedades extraordinárias, são necessárias abordagens diversificadas de investigação para avaliar os riscos em potencial (NEL et al., 2006). Estudos em nanotoxicologia são voltados para caracterizar a segurança de

nanomateriais, com foco especial em definir seus mecanismos de ação bem como seus perfis toxicológicos, verificando desde os efeitos agudos em testes preliminares, como os procedidos *in vitro*, bem como os efeitos subcrônicos e crônicos, extremamente necessários quando são investigados novos nanomateriais (HOLSAPPLE et al., 2005).

Comumente, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) é utilizada para verificar a localização intracelular de nanopartículas em células incubadas ou transfectadas com as mesmas. Os compartimentos intracelulares nos quais as nanopartículas preferencialmente se encontram e podem ser detectadas são as estruturas endossomais ou lisossomais (SOENEN; DE CUYPER, 2009). Como visto na Figura 5, a localização provável das partículas em endossomos ou vacúolos autofágicos primariamente resulta em grânulos eletrodensos na região citoplasmática sem ocupar a área nuclear.

Neste aspecto, a quantidade de aglomeração das nanopartículas pode afetar a capacidade das mesmas em interagir com as células em sistemas *in vitro* (TEEGUARDEN et al., 2007; LISON et al., 2008; VIPPOLA et al., 2009). Lankoff e colaboradores (2012) relataram que os aglomerados de nanopartículas foram detectados no citoplasma, ao passo que as nanopartículas individuais foram detectadas no núcleo e mitocôndrias. Nossos resultados também mostraram a formação de agregados em compartimentos do citoplasma, mas não foram capazes de detectar a presença de nanopartículas no núcleo.

De um ponto de vista toxicológico, é importante a determinação da localização das nanopartículas já que esse fator pode afetar a resposta biológica. É provável que a distribuição intracelular das nanopartículas possa explicar as diferenças na interação destas com proteínas e o DNA dentro de uma célula, seguida de diferentes consequências tóxicas. Xu et al. (2007) e Asati et al. (2010) observaram que a localização subcelular de nanopartículas desempenha um papel importante no perfil toxicológico, com menor grau de toxicidade quando as nanopartículas estavam localizadas no citoplasma de células, aumentando este grau conforme as nanopartículas são acumuladas nos núcleos e lisossomos.

À primeira vista, a internalização de nanopartículas aniônicas (valor do potencial zeta negativo) através de membranas biológicas, que também estão carregadas negativamente, pode parecer inesperado. Porém, Wilhelm e colaboradores (2002) hipotetizaram que as nanopartículas que são incorporadas por membranas biológicas podem formar aglomerados, por exemplo, criando subdomínios carregados positivamente. Assim podem ativar a internalização das nanopartículas aniônicas e passar pelas membranas celulares, explicando o fenômeno observado (MAILANDER; LANDFESTER, 2009).

Além de possibilitar a visualização de nanopartículas internalizadas pelas células, a MET pode ser utilizada para averiguar as características ultraestruturais das células incubadas com o FFM, bem como suas alterações, como ruptura de membrana plasmática (SALDANHA et al., 2007). No estudo de Mahmoudi e colaboradores (2010 a), também foram observadas por MET nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro em vesículas na linhagem de fibroblastos de camundongos L929, fato que ocorreu devido às mudanças locais da função protéica bem como do equilíbrio iônico.

O microscópio de luz também permitiu, junto à coloração com HE, afirmar que não foram encontradas alterações evidentes após incubação das células com as menores concentrações de FFM no período de 24 horas. Esse fato atesta a possibilidade de utilização de concentrações semelhantes às de $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM em aplicações *in vivo*, devido ao seu caráter de reduzida toxicidade.

Outro parâmetro imprescindível que deve ser corroborado é o quanto a internalização de determinadas nanopartículas pode afetar ou se adequar ao estado celular normal, alterando ou não a viabilidade celular. Foi mostrado que as viabilidades variaram apenas ligeiramente em presença de menores ou concentrações intermediárias de FFM. Quando utilizadas concentrações mais elevadas, as viabilidades oscilaram mais notadamente com o tempo de exposição. Um aspecto comum na maioria das curvas de viabilidade celular inicial pós-incubação com nanopartículas, é o fato de decaírem levemente logo após a incubação; visualizado na concentração de $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL do FFM na Figura 7.

Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de o ensaio MTT determinar a viabilidade celular por meio da atividade metabólica (HU et al., 2006). O ensaio reflete, dessa forma, o *status* de atividade da célula e não mensura a morte celular em si. Um cenário proposto é o de que a incubação das células UM-SCC14A com este FFM induz uma fase *lag* na atividade celular, já que as células têm de lidar com estes xenobióticos.

Após a internalização, as células podem reassumir suas atividades metabólicas normais, o que explicaria o aumento da viabilidade celular. Isso resulta no chamado efeito reversível da viabilidade celular, descrito por Duddridge e colaboradores (1990). Se a internalização continuar e, portanto, exceder um certo valor limiar, efeitos tóxicos podem ser induzidos, o que resultará em viabilidades celulares reduzidas mais uma vez. Isso explicaria as variações na viabilidade celular ao longo do tempo e nos mostra a importância de um seguimento da viabilidade celular que possa determinar acuradamente os efeitos citotóxicos das nanopartículas.

As nanopartículas podem, então, afetar a proliferação celular em ambas direções, inibindo-a (KARTHIKEYAN et al., 2010; KALISHWARALAL et al., 2011) ou aumentando-a (UNFRIED et al., 2008). Em tentativa, pode-se sugerir a partir deste trabalho, que a viabilidade celular é diminuída pela incorporação do FFM pelas membranas celulares e, portanto, desregulando seus potenciais de membrana ou alterando as características de permeabilidade.

Um reduzido número de células viáveis, como o observado neste trabalho para a concentração de $1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL do FFM após 24 horas, pode ser devido tanto ao aumento da morte celular quanto a uma baixa taxa de proliferação. Apoptose, autofagia e necrose são as principais vias de morte celular já descritas detalhadamente. Elas se diferenciam no que diz respeito à causa, início e duração, grau de regulação e reguladores-chave; no entanto, são todos mecanismos considerados sobrepostos.

Portanto, para obter uma clara e confiável idéia da viabilidade celular, é recomendada a utilização de múltiplos ensaios e validação dos dados obtidos por um ensaio pela repetição em um segundo teste diferente. A grande versatilidade das nanopartículas de óxido de ferro, de diferentes tamanhos e revestimentos de superfície, bem como a falta de qualquer padronização do procedimento de incubação com as células, resulta numa maior variação de estudos envolvendo diferentes tempos de incubação, concentrações de nanopartículas adicionadas, tipos de células utilizadas e tipos de ensaios usados para averiguar a viabilidade celular. Isso tem acarretado em uma tarefa quase impossível de comparar a eficiência de transfecção e potencial tóxico das diversas nanopartículas de óxido de ferro (SOENEN et al., 2011).

Já foi visto que cultura de células incubadas com altas doses de nanopartículas de óxido de ferro podem ser maléficas às células, alterando a taxa de crescimento celular (SOENEN et al., 2009; 2010). Como demonstrado pelos resultados, marcantes mudanças morfológicas foram observadas como arredondamento celular, formação de bolhas na membrana e fragmentação do núcleo em corpos apoptóticos, características estas de células apoptóticas (GERL; VAUX, 2005; GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005), também observado por nanopartículas de prata (ASHARANI et al., 2009).

Além disso, foi visualizada, principalmente quando as células foram expostas à maior concentração de nanopartículas ($1,4 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM), uma notável mudança no citoplasma e formação de vesículas hipercromáticas (Figura 6 L-O), corroborada pela coloração HE (Figura 4 J-L). Quantitativamente, os níveis de apoptose aumentaram gradualmente de maneira dose-dependente, como no estudo de Asharani e colaboradores

(2009) no qual as células demoraram maior período de tempo para se recuperarem da exposição às nanopartículas.

Apesar de as lacunas entre os conceitos *in vitro* e suas aplicações *in vivo* serem enormes (PISON et al., 2006), não existe outra sequência experimental mais aceitável do que partir de avaliações em cultura de células para, posteriormente, serem feitas abordagens mais aprofundadas a fim de caracterizar importantes aspectos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção desses materiais (HOLSAPPLE et al., 2005). Portanto, após a verificação do caráter toxicológico *in vitro*, foi utilizada experimentação em modelo animal de carcinoma oral para corroborar os dados obtidos e demonstrar a relevante importância de se almejar novas terapias que acarretem menor toxicidade ao indivíduo, melhorando sua qualidade de vida (ROBERG et al., 2007). Nesse contexto, a magneto-hipertermia aparece como promissora perspectiva de terapia.

Os hamsters sírios utilizados neste estudo foram monitorados diariamente com relação à morbidade e mortalidade pós-tratamento. Considerando que efeitos nocivos diversos podem ser observados devido ao uso de substâncias exógenas, acompanhamentos foram feitos ao longo do período experimental, incluindo o monitoramento do peso corporal e a ocorrência de letalidade pós-tratamento. Não ocorreram casos de morbidade, nos quais a atividade motora é diminuída, há surgimento de manchas, atonia e queda ou eriçamento dos pelos. Após a administração do FFM, as observações clínicas demonstraram que o tratamento não causou alterações como diarreia, hemorragia e vômito. Além disso, o ganho de peso corporal após sete dias do término do tratamento foi semelhante à massa corpórea normal, sendo que a magnetoterapia não causou morte de nenhum animal.

No caso de um tumor superficial, como o carcinoma oral, um simples mediador capaz de gerar hipertermia é suficiente para a aplicação clínica desta terapia (ITO et al., 2005). Foi então utilizado um campo magnético de frequência alternada que induziu o aquecimento do tecido tumoral, não afetando a região saudável circundante (MOROZ; JONES; GRAY, 2001; WUST et al., 2002). Devido aos resultados promissores observados, o sistema de magneto-hipertermia utilizado durante três dias consecutivos assegurou uma regressão deste tipo tumoral.

Investigações experimentais sobre a aplicação de materiais magnéticos para hipertermia datam de 1957, quando Gilchrist e colaboradores aqueceram várias amostras teciduais com partículas de maguemita de tamanho que variavam de 20 a 100nm, expostas a um campo magnético de 1,2MHz. Desde então, numerosas publicações têm descrito uma variedade de sistemas que utilizam diversos tipos de materiais magnéticos, intensidades e

frequências de campo, bem como diferentes métodos de encapsulamento e entrega das partículas (HILGER et al., 2002; JONES; WINTER; GRAY, 2002).

Assim como nestes estudos, no presente trabalho não foram verificadas alterações histopatológicas nos diferentes órgãos analisados, que pudessem ser decorrentes de efeitos colaterais do tratamento. Ademais, a biodistribuição das nanopartículas foi averiguada por meio da coloração HE em combinação com Azul da Prússia, que evidencia o ferro do fluido magnético em azul.

Dessa forma, é pertinente tecer algumas considerações sobre o metabolismo do ferro já que as nanopartículas utilizadas neste trabalho apresentam-no em sua constituição, a fim de elucidar as razões pelas quais as nanopartículas foram encontradas em determinados locais, estando ausente em outros órgãos. O ferro é um elemento essencial para a vida humana por se tratar de um componente indispensável para as atividades de muitos processos metabólicos, uma vez que proteínas que contêm ferro catalisam reações que envolvem metabolismo de energia e síntese de DNA, por exemplo (KWOK; RICHARDSON, 2002; RICHARDSON, 2002).

A maioria do ferro encontrado *in vivo* está presente nas moléculas de hemoglobina (heme) ou armazenada na forma de ferritina (HUANG, 2003). A ferritina, então, funciona controlando a viabilidade do ferro para o uso celular bem como protegendo a célula de efeitos deletérios (LINDSAY et al., 2003), sendo que estas são sintetizadas em grande quantidade no baço (PEREIRA; PEREIRA; SOUSA, 1999). Além disso, há a transferrina que é a proteína responsável por transportar o ferro presente no plasma e fluido extracelular (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001).

Uma das preocupações em relação ao uso de nanopartículas para aplicações biomédicas é a respeito da eliminação deste material. Neste trabalho, as análises não mostraram alterações severas com a presença das nanopartículas magnéticas na concentração de $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM, o que sugere a hipótese de que o ferro liberado da maguemita foi incorporado pela ferritina, transportado pela transferrina e eliminado, não ocasionando danos ao organismo.

Vale dizer que os diferentes órgãos foram selecionados para o presente trabalho já que se demonstraram como os mais afetados pela presença de nanopartículas magnéticas em estudos anteriores (CHAVES et al., 2002; GARCIA, 2002; KÜCKELHAUS et al., 2003; LACAVA et al., 2003; SADEGHIANI, 2004). A análise morfológica revelou que o fluido magnético dirigiu-se para o baço, o que foi constatado pela presença de aglomerados de nanopartículas neste órgão. Os aglomerados de nanopartículas observados eram de tamanho e

forma variados e foram facilmente identificados em microscopia de luz, nos tecidos corados com HE e Azul da Prússia.

Em relação aos aglomerados encontrados no baço tem sido sugerido que as nanopartículas magnéticas ao serem capturadas por células do sistema fagocitário mononuclear, perdem parcial ou totalmente a cobertura e, desta maneira, sem a repulsão estérica existente entre elas, acabam perdendo a estabilidade e se aglomerando (KÜCKELHAUS et al., 2003). A quantidade de aglomerados de nanopartículas foi diferente entre os animais eutanasiados após um dia do término do tratamento, porém, foi verificado em 83% deste grupo experimental, tornando significativa sua presença neste órgão.

O baço é o maior órgão linfóide do corpo e está subdividido em polpa vermelha e polpa branca. Na polpa vermelha, este órgão desempenha uma de suas principais funções que é de fagocitar hemácias senescentes, e assim, o ferro presente nestas hemácias é liberado para ser reaproveitado posteriormente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Quando os animais controle foram submetidos à coloração Azul da Prússia, não apareceram estruturas com aspecto e coloração semelhantes aos aglomerados de partículas magnéticas. Isso nos mostrou que não se tratava de ferro endógeno neste órgão, mas sim as nanopartículas coradas devido ao Fe^{2+} presente em sua estrutura.

Como já observado em outras amostras, como nanopartículas de magnetita recobertas por dextran ou citrato, a afinidade das mesmas pelo baço pode ser grande (LACAVA, 1999 a; GARCIA, 2002), demonstrando um caráter recorrente na literatura. Entretanto, observações por períodos de tempo maiores poderiam esclarecer esta afinidade tecidual.

Não foi detectada em nenhum órgão de animais expostos ao FFM e/ou ao campo magnético alteração morfológica, assemelhando-os aos tecidos encontrados em hamsters normais. Este fato é mais um indicativo de que a amostra testada possui biocompatibilidade adequada para aplicações biomédicas.

Com relação aos dados observados nas reações imunocitoquímicas dos tecidos da cavidade oral, acredita-se que o tratamento do carcinoma realizado com FFM combinado à magneto-hipertermia tenha sido responsável pela redução da expressão do PCNA, marcador de proliferação celular, bem como pelo aumento da expressão da caspase-3 ativada, que marca células em processo apoptótico.

No estudo de Mukherjee e Byrne (2012), foi verificado que queratinócitos humanos foram lisados imediatamente após sua exposição a nanopartículas de poliamidoamino, já que houve um aumento bastante significativo da expressão das caspases-3 e -8 e estas enzimas estão diretamente relacionadas ao processo de morte celular. Esse fato indica, mais uma vez,

que a eficiência da terapia está baseada em matar apenas células tumorais, sem afetar a região normal do tecido, bem como é capaz de inibir o crescimento celular desordenado encontrado nos animais com câncer.

Em nosso trabalho foi verificado um aumento da proliferação celular, ou hiperplasia neste caso, quando os animais foram expostos ao carcinógeno DMBA e, conseqüentemente, desenvolveram carcinoma oral. Este evento está estritamente relacionado ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que é uma proteína multifuncional que age como fator de processamento das DNA polimerases necessárias para a síntese de DNA cromossomal e reparo do dano ao DNA (PAUNESKU et al., 2001). Após o tratamento com FFM combinado à hipertermia, foi verificada uma diminuição deste caráter proliferativo verificado pela quantificação deste marcador.

No entanto, não foram obtidos dados semelhantes de atenuação da imunomarcagem quando os hamsters foram tratados apenas com nanopartículas magnéticas de ferro. De acordo com nosso estudo, Zielinskaa e colaboradores (2011) mostraram que embriões de galinha, utilizados como modelo experimental de fatores que influenciam no desenvolvimento da musculatura, não sofreram alterações na proliferação celular quando expostos somente a nanopartículas de ouro (atestada pela expressão invariável de PCNA).

Outra variável de interesse do trabalho foi o perfil leucocitário dos animais e sua resposta inflamatória ao tratamento. Os exames hematológicos expressam as condições do sangue periférico em certo momento da vida de um indivíduo, sendo os mais utilizados na prática clínica por serem práticos e econômicos. O hemograma completo avalia todos os componentes celulares: glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas. Para avaliar efeitos citotóxicos da amostra de FFM, este trabalho se ateve apenas aos leucogramas, ou seja, às contagens global e diferencial de leucócitos, células que têm como principal função a defesa do organismo contra agentes infecciosos e substâncias estranhas.

Sob a denominação leucócito (célula branca) incluem-se vários tipos celulares que, morfológica e funcionalmente, diferenciam-se entre si, podendo ser divididos em dois grupos: leucócitos que contêm granulações abundantes no citoplasma – granulócitos; e leucócitos que são desprovidos de granulações citoplasmáticas – linfócitos (LORENZI, 2003). A destruição ou sequestro de um ou vários destes tipos celulares pode levar à leucopenia (diminuição global do número global de leucócitos).

A contagem de leucócitos constitui uma ferramenta importante em análises patológicas, pois, por meio dos resultados, é possível identificar processos inflamatórios, alérgicos e parasitários, por exemplo (GARCIA, 2002). Tem-se revelado também de grande

importância na avaliação de novos materiais nanobiotecnológicos, incluindo os fluidos magnéticos e magnetolipossomas (GARCIA et al., 2002; KÜCKELHAUS et al., 2003).

Neste estudo, a amostra de FFM não induziu diferença significativa na população de leucócitos quando comparados os grupos tratados ao grupo controle normal. Enquanto a população de linfócitos diminuiu significativamente nos grupos tratados com FFM e magneto-hipertermia, ao mesmo tempo houve um aumento na população de neutrófilos o que explica não ter havido alteração no número global de leucócitos. Por outro lado, ocorreu exatamente o oposto nos animais normais, sendo que houve aumento na quantidade de linfócitos e uma redução na porcentagem de neutrófilos. Este resultado sugere que a injeção de $0,7 \times 10^{15}$ partículas desta amostra de FFM tem potencial pró-inflamatório.

Diferentemente de humanos, a população mais abundante no sangue dos hamsters é a de linfócitos, podendo corresponder de 40 até 77% dos leucócitos totais. É por esta razão que a população de linfócitos foi a responsável pelas alterações significativas na população total de leucócitos, ainda que as populações de outros tipos leucocitários tenham apresentado alteração em algumas das observações realizadas após administração de FFM (LACAVA et al., 1999 b; GARCIA et al., 2002; SADEGHIANI, 2004).

Dentre os leucócitos, os neutrófilos desempenham um papel importante na defesa do organismo contra infecção microbiana. Sob exposição de produtos derivados de bactérias ou mediadores inflamatórios, os neutrófilos exercem várias funções especializadas incluindo quimiotaxia, fagocitose e morte microbiana (MORAES; DOWNEY, 2003). A frequência da população de neutrófilos após injeção da amostra de FFM, além de ter aumentado em um dia, continuou elevando-se após sete dias.

Por outro lado, os eosinófilos possuem granulações específicas muito características, menos numerosas e bem maiores do que as dos neutrófilos (LORENZI, 2003). Quando uma substância estranha entra no corpo, ela é detectada pelos linfócitos e neutrófilos, que liberam substâncias que atraem os eosinófilos para a área. Os eosinófilos então liberam grânulos citoplasmáticos cujo conteúdo é o principal mediador das reações alérgica (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

Eosinofilia é o aumento anormal de eosinófilos no sangue. Este aumento normalmente indica uma resposta a substâncias que causam reação alérgica (alergenos) ou presença de parasitas (helminths) (GARCIA, 2002; SADEGHIANI, 2004). No presente trabalho, a amostra de FFM induziu eosinofilia temporária 24 horas após tratamento, sugerindo uma resposta alérgica do organismo frente a um corpo estranho, neste caso, as nanopartículas recobertas por polifosfato presentes no material magnético investigado.

Uma outra resposta à presença de neoplasias é o recrutamento de monócitos do sangue periférico até o local do tumor, induzidos por um gradiente quimio-atrativo. Uma vez que os monócitos cruzam a membrana da barreira endotelial, diferenciam-se em macrófagos (CHOI et al., 2007). Este aumento da quantidade de monócitos circulantes pôde ser notado no presente estudo, sendo que após sete dias do final do tratamento com FFM e magneto-hipertermia, houve um retorno ao estado normal dos animais.

Em suma, um dos maiores desafios em aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas encontra-se em lidar com a questão da transferência de tecnologia para práticas clínicas. Há possibilidades neste sentido para abordagens mais interdisciplinares, por exemplo, para garantir que os experimentos realizados em laboratório possam mimetizar mais explicitamente as condições que seriam encontradas *in vivo*. Há espaço para contribuições significativas por meio da modelagem de sistemas complexos, com o objetivo de compreender mais especificamente toda a gama de fenômenos físicos e efeitos que, em última análise, determinam juntos uma aplicação específica de tratamento que será bem sucedida.

Infelizmente, o tratamento de tumores envolvendo magneto-hipertermia não está ainda largamente disponível para seres humanos, embora se tenha provado várias vezes eficaz em animais. Isso destaca a necessidade em transferir os testes realizados sob condições controladas em laboratório, largamente provados por ensaios *in vitro* ou em testes com animais, para uma tecnologia próxima do mercado, que possa lidar com a complexidade de uso em serviço da comunidade. Este é, em última instância, o objetivo de todo e qualquer estudo que busque novas formas de tratamento do câncer e das demais doenças, que sejam mais eficientes, acarretando menos efeitos adversos aos pacientes, melhorando a qualidade de vida dos mesmos.

6. CONCLUSÕES

- A incubação das nanopartículas magnéticas de ferro em linhagem celular UM-SCC14A não necessita de agentes de transfecção para ser realizada com sucesso.
- Os diferentes ensaios que averiguaram a ultraestrutura, morfologia, viabilidade celular e citotoxicidade demonstraram o caráter e as peculiaridades das aplicações das nanopartículas em diferentes concentrações e períodos de tempo, tornando evidente a relação diretamente proporcional de exposição a este FFM e aumento dos efeitos citotóxicos.

- Sugerimos a utilização de concentrações de nanopartículas magnéticas de ferro semelhantes às de $0,7 \times 10^{15}$ partículas/mL de FFM para fins terapêuticos livres de efeitos adversos, já que não acarretou citotoxicidade significativa *in vitro*, demonstrando potenciais benefícios no estudo da biologia do câncer, podendo ser utilizadas em procedimentos como magneto-hipertermia.
- Em hamsters sírios, a aplicação local de FFM combinada à exposição ao campo magnético de frequência alternada para o tratamento de carcinoma oral gerou resultados bastante encorajadores devido à sua resposta antitumoral em 100% dos animais (12/12).
- Esta possível nova terapia não acarretou efeitos adversos sistêmicos ou nos órgãos analisados que pudessem ser notados no acompanhamento dos animais até sete dias após o término do tratamento.
- Pela análise da biodistribuição destas nanopartículas, em um período de sete dias, pôde-se aferir a presença das mesmas exclusivamente no baço de 83% dos animais, sem afetar o órgão histologicamente.
- Mais estudos devem ser realizados para avaliar este tipo tumoral a longo prazo e averiguar a ocorrência de recidiva, a fim de estabelecer os mecanismos pelos quais atua e as consequências do uso deste FFM; tendo em vista que, em relação a aplicações biomédicas, a área de nanobiotecnologia é bastante promissora e inovadora.

Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. **Imunologia Celular e Molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter Editora, 2003.

ACHARYA, S.; DILNAWAZ, F.; SAHOO, S. K. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5737-5750, 2009.

ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KLEIN, R. J.; PARAK, F. G.; HULIN, P.; BERGEMANN, C.; ERHARDT, W.; WAGENPFEIL, S.; LÜBBE, A. S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. **Cancer Research**, v. 60, n. 23, p. 6641-6648, 2000.

ALEXIOU, C.; JURGONS, R.; SCHMID, R.; BERGEMANN, C.; HENKE, J.; HUENGES, E.; PARAK, F. Magnetic drug targeting biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. **Drug Target**, v. 11, n. 3, p. 139-149, 2003.

ALVARENGA, L. M.; RUIZ, M. T.; PAVARINO-BERTELLI, E. C.; RUBACK, M. J. C.; MANIGLIA, J. V.; GOLONI-BERTOLLO, E. M. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 1, p. 68-73, 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Medicamentos: pesquisa clínica. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>>. Acesso em: 20/10/2012.

ARGIRIS, A.; KARAMOUZIS, M. V.; RABEN, D.; FERRIS, R. L. Head and neck cancer. **The Lancet**, v. 371, n. 9625, p. 1695-1709, 2008.

ARSALANI, N.; FATTAHI, H.; LAURENT, S.; BURTEA, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Polyglycerol-grafted superparamagnetic iron oxide nanoparticles: highly efficient MRI contrast agent for liver and kidney imaging and potential scaffold for cellular and molecular imaging. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 7, n. 2, p. 185-194, 2012.

ASATI, A.; SANTRA, S.; KAITTANIS, C.; PEREZ, J. M. Surface charge dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. **ACS Nano**, v. 4, n. 9, p. 5321-5331, 2010.

ASHARANI, P. V.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETIL, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. **BMC Cell Biology**, v. 10, n. 65, p. 1-14, 2009.

BALIVADA, S. RACHKATLA, R. S.; WANG, H.; SAMARAKOON, T. N.; DANI, R. K.; PYLE, M.; KROH, F. O.; WALKER, B.; LEAYM, X.; KOPER, O. B.; TAMURA, M.; CHIKAN, V.; BOSSMANN, S. H.; TROYER, D. L. A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron(0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. **BMC Cancer**, v. 10, n. 119, p.1-9, 2010.

BALMAIN, A.; PRAGNELL, I. B. Mouse skin carcinomas induced *in vivo* by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. **Nature**, v. 303, n. 5912, p. 72-74, 1983.

BARABASI, A. L.; GULBAHCE, N.; LOSCALZO, J. Network medicine: a network-based approach to human disease. **Nature Reviews: Genetics**, v. 12, n. 1, p. 56-68, 2011.

BARBOSA, L. S.; SADEGHIANI, N.; GUEDES, M. H. A.; OLIVEIRA, D. M.; TEDESCO, A. C.; LIMA, E. C. O.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Effects of magnetic field and magnetoliposomes on mice: cytotoxicity and genotoxicity testes. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 42, n. 10, p. 1-3, 2006.

BASKAR, R.; LEE, K. A.; YEO, R.; YEOH, K. W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193-199, 2012.

BERNARDES, V. F.; GLEBER-NETTO, F. O.; SOUSA, S. F.; SILVA, T. A.; AGUIAR, M. C. Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: a case control study. **Experimental Clinical Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 40, 2010.

BERNARDI, R. J.; LOWERY, A. R.; THOMPSON, P. A.; BLANEY, S. M.; WEST, J. L. Immunonanoshells for targeted photothermal ablation in medulloblastoma and glioma: an *in vitro* evaluation using human cell lines. **Journal of Neurooncology**, v. 86, n. 2, p. 165-172, 2008.

BONO, J. S.; ASHWORTH, A. Translating cancer research into targeted therapeutics. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 543-549, 2010.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 631-651, 2002.

BROTHWELL, D. J.; ARMSTRONG, K. A. Smoking cessation services provided by dental professionals in a rural Ontario Health Unit. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 70, n. 2, p. 94-98, 2004.

BRUGIN, A. Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade de fluido magnético composto nanopartículas de maguemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2007.

BUNNELL, A.; PETTIT, N.; REDDOUT, N.; SHARMA, K.; O'MALLEY, S.; CHINO M; KINGSLEY, K. Analysis of primary risk factors for oral cancer from select US states with increasing rates. **Tobacco Induced Diseases**, v. 8, n. 5, p. 1-10, 2010.

BYAKODI, R.; BYAKODI, S.; HIREMATH, S.; BYAKODI, J.; ADAKI, S.; MARATHE, K.; MAHIND, P. Oral cancer in India: an epidemiologic and clinical review. **Journal of Community Health**, v. 37, p. 316-319, 2012.

CALMON, M. F.; RODRIGUES, R. V.; KANETO, C. M.; MOURA, R. P.; SILVA, S. D.; MOTA, L. D. C.; PINHEIRO, D. G.; TORRES, C.; CARVALHO, A. F.; CURY, P. M.; NUNES, F. D.; NISHIMOTO, I. N.; SOARES, F. A.; DA SILVA, A. M.; KOWALSKI, L. P.; BRENTANI, H.; ZANELLI, C. F.; SILVA, W. A.; RAHAL, P.; TAJARA, E. H.; CARRARO, D. M.; CAMARGO, A. A.; VALENTINI, S. R. Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. **Neoplasia**, v. 11, n. 12, p. 1329-1339, 2009.

CALMON, M. F.; DE SOUZA, A. T.; CANDIDO, N. M.; RAPOSO, M. I. B.; TABOGA, S.; RAHAL, P.; NERY, J. G. A systematic study of transfection efficiency and cytotoxicity in HeLa cells using iron oxide nanoparticles prepared with organic and inorganic bases. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 100, p. 177-184, 2012.

CANTO, M. T.; HOROWITZ, A. M.; CHILD, W. L. Views of oral cancer prevention and early detection: Maryland physicians. **Oral Oncology**, v. 38, n. 4, p. 373-377, 2002.

CARDIFF, R. D.; KENNEY, N. Mouse mammary tumor biology: a short history. **Advances in Cancer Research**, v. 98, p. 53-116, 2007.

CARNEIRO, M. L. B.; NUNES, E. S.; PEIXOTO, R. A.; OLIVEIRA, R. G. S.; LOURENÇO, L. H. M.; DA SILVA, I. C. R.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE SOUZA, A. R.; LACAVA, Z. G. M.; BÁO, S. N. Free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast câncer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 11, 2011.

CHAVES, S. B.; LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Light microscopy and magnetic resonance characterization of DMSA – coated magnetic fluid in mice. **IEEE Transactions Magnetism**, v. 38, p. 3231-3233, 2002.

CHAVES, S. B.; SILVA, L. P.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B.; Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lungs induced by 2, 3 meso-dimercaptosuccinic-coated magnetic nanoparticles. **Journal of Applied Physics**, v. 97, n. 1, p. 1-4, 2005.

CHEN, Y. K.; HSUE, S. S.; LIN, L. M. Survivin expression is regulated by an epigenetic mechanism for DMBA-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinomas. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 6, p. 593-598, 2005.

CHEON, D. J.; ORSULIC, S. Mouse models of cancer. **Annual Reviews of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, p. 95-119, 2011.

CHERUKURI, P.; GLAZER, E. S.; CURLEY, S. A. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 3, p. 339-345, 2010.

CHIN, D.; BOYLE, G. M.; THEILE, D. R.; PARSONS, P. G.; COMAN, W. B. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. **The British Association of Plastic Surgeons**, v. 57, n. 7, p. 595-602, 2004.

CHOI, M. R.; STANTON-MAXEY, K. J.; STANLEY, J. K.; LEVIN, C. S.; BARDHAN, R.; AKIN, D.; BADVE, S.; STURGIS, J.; ROBINSON, J. P.; BASHIR, R.; HALAS, N. J.; CLARE, S. E. A cellular trojan horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. **Nano Letters**, v. 7, n. 12, p. 3759-3765, 2007.

CHUANG, C. Y.; SUNG, W. W.; WANG, L.; LIN, W. L.; YEH, K. T.; SU, M. C.; HSIN, C. H.; LEE, S. Y.; WU, B. C.; CHENG, Y. W.; LEE, H. Differential impact of IL-10 expression on survival and relapse between HPV16-positive and -negative oral squamous cell carcinomas. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 1-9, 2012.

CHUNFU, Z.; JINQUAN, C.; DUANZHI, Y.; YONGXIAN, W.; YANLIN, F.; JIAJU, T. Preparation and radiolabelling of human serum-albumine (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 61, n. 6, p. 1255-1259, 2004.

COHEN, A. N.; VEENA, M. S.; SRIVATSAN, E. S.; WANG, M. B. Suppression of interleukin 6 and 8 production in head and neck cancer cells with curcumin via inhibition of

kappa beta kinase. **Archives of Otolaryngology: Head and Neck Surgery**, v. 135, n. 2, p. 190-197, 2009.

CREE, I. A. Principles of cancer cell culture. **Cancer Cell Culture: Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 13-26, 2011.

CROZIER, E.; SUMER, B. D. Head and neck cancer. **The Medical Clinics of North America**, v. 94, n. 5, p. 1031-1046, 2010.

CUI, J.; CUI, H.; WANG, Y.; SUN, C.; LI, K.; REN, H.; DU, W. Application of PEI-modified magnetic nanoparticles as gene transfer vector for the genetic modification of animals. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

DELANEY, G.; JACOB, S.; FEATHERSTONE, C.; BARTON, M. The role of radiotherapy in cancer treatment estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. **Cancer**, v. 10, n. 4, p. 1129-1137, 2005.

DEVADIGA, A.; PRASAD, K. V. Knowledge about oral cancer in adults attending a Dental Hospital in India. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 11, n. 6, p. 1609-1613, 2010.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedical Pharmacotherapy**, v. 55, p. 333-339, 2001.

ENNO, A.; O'ROURKE, J. L.; HOWLETT, C. R.; JACK, A.; DIXON, M. F.; LEE, A. MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with *Helicobacter felis*. A mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma. **The American Journal of Pathology**, v. 147, n. 1, p. 217-222, 1995.

ESTEVANATO, L. L. C.; LACAVA, L. M.; CARVALHO, L. C. F.; AZEVEDO, R. B.; SILVA, O. PELEGRINI, F.; BÁO, S. N.; MORAIS, P. C. LACAVA, Z. G. M. Long-term biodistribution and biocompatibility investigation of dextran-coated magnetite nanoparticle using mice as the animal model. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2011.

FALCÃO, M. M. L.; ALVES, T. D. B.; FREITAS, V. S.; COELHO, T. C. B. Conhecimento dos cirurgiões-dentistas em relação ao câncer bucal. **Revista ARGO**, v. 58, n. 1, p. 27-33, 2010.

FEKRAZAD, R.; HAKIMIHA, N.; FAROKHI, E.; RASAEI, M. J.; ARDESTANI, M. S.; KALHORI, K. A. M.; SHEIKHOLESAMI, F. Treatment of oral squamous cell carcinoma using anti-HER2 immunonanoshells. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p. 2749-2755, 2011.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. 2011. Disponível em: <<http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/informe/site/materia/detalhe/26804>>. Acesso em: 12/10/2012.

FORTINA, P.; KRICKA, L. J.; GRAVES, D. J.; PARK, J.; HYSLOP, T.; TAM, F.; HALAS, N.; SURREY, S.; WALDMAN, S. A. Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 145-152, 2007.

FREIRE, F.; PEROPADRE, A.; MARTÍN, J. M. P.; HERRERO, O.; HAZEN, M. J. An integrated cellular model to evaluate cytotoxic effects in mammalian cell lines. **Toxicology in vitro**, v. 23, n. 8, p. 1553-1558, 2009.

FREITAS, M. L. L.; SILVA, L. P.; FREITAS, J. L.; AZEVEDO R. B.; LACAVA Z. G. M.; DE BITTENCOURT, P. I. H.; CURI R.; BUSKE N.; MORAIS P. C. Investigation of lipid peroxidation and catalase activity in magnetic fluid treated mice. **Journal of Applied Physics**, v. 93, p. 6709-6711, 2003.

FRESE, K. K.; TUVESON, D. A. Maximizing mouse cancer models, **Nature Reviews: Cancer**, v. 7, n. 9, p. 645-658, 2007.

GANLY, I.; GOLDSTEIN, D.; CARLSON, D. L.; PATEL, S. G.; O'SULLIVAN, B.; LEE, N.; GULLANE, P.; SHAH, J. P. Long-term regional control and survival in patients with "low-risk" early stage oral tongue cancer managed by partial glossectomy and neck dissection without postoperative radiation. **Cancer**. [online] 2012.

GARCIA, V. A. P. Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos. Tese de doutoramento do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2002.

GARCIA, V. A. P.; LACAVA, L. M.; KUCKELHAUS, S. A. S.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C.; DE CUYPER, M.; LACAVA, Z. G. M. Magnetoliposomes: evaluation by

citometry and micronucleus test. **European Cells & Materials Journal**, v. 3, p. 154-155, 2002.

GERL, R.; VAUX, D. L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 263-270, 2005.

GHOBRAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA: Journal Cancer for Clinicians**, v. 55, n. 3, p. 178-194, 2005.

GILCHRIST, R. K.; MEDAL, R.; SHOREY, W. D.; HANSELMAN, R. C.; PARROTT, J. C.; TAYLOR, C. B. Selective inductive heating of lymph nodes. **Annals of Surgery**, v. 146, p. 596-606, 1957.

GILLISON, M. L.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W.; SUGAR, E.; XIAO, W.; BEGUM, S.; VISCIDI, R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 6, p. 407-420, 2008.

GRADISHAR, J. W.; TJULANDIND, S.; DAVIDSON, N.; SHAW, H.; DESAI, N.; BHAR, P.; HAWKINS, M.; O'SHAUGHNESSY, J. Phase III trial nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 31, p. 7794-7803, 2005.

GREENHALGH, K. R. Development of biocompatible multi-drug conjugated nanoparticles/smart polymer films for biomedical applications. [Google books]. 2007

GRIMM, M.; ALEXANDER, D.; MUNZ, A.; HOFFMANN, J.; REINERT, S. Increased LDH5 expression is associated with lymph node metastasis and outcome in oral squamous cell carcinoma. **Clinical and Experimental Analysis**. [online] 2012.

GUEDES, M. H. A.; GUEDES, M. E. A.; MORAIS, P. C.; DA SILVA, M. F.; SANTOS, T. S.; ALVES JR, J. P.; BERTELLI, C. E.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M. Proposal of a magnetohyperthermia system: preliminary biological tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272-274, p.2406-2407, 2004.

GUEDES, M. H. A.; SADEGHIANI, N.; PEIXOTO, D. L. G.; COELHO, J. P.; BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, R. B.; KÜCKELHAUS, S.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Effects of AC magnetic field and carboxymethyldextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 283-286, 2005.

GUERRA, M. R.; MOURA-GALLO, C. V.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUFFY, M. M.; ROSENBERGER, J. A.; SIMON, I.; BURNS, C. P. Effect of cellular fatty acid alteration on hyperthermic sensitivity in cultured in L1210 murine leukemia cells. **Cancer Research**, v. 42, p. 3625-3630, 1982.

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

HARDISTY, J. F. Factors influencing laboratory animal spontaneous tumor profiles. **Toxicology Pathology**, v. 13, n. 2, p. 95-104, 1985.

HEATH, J. R.; DAVIS, M. E. Nanotechnology and cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 405-419, 2008.

HENGSTELER, J.; FOTH, H.; KAHL, R.; KRAMER, P.; LILIENBLUM, W.; SCHULZ, T.; SCHEWEINFURTH, H. The REACH concept and its impact on toxicological sciences. **Toxicology**, v. 220, p. 232-239, 2006.

HENNESSEY, P. T.; WESTRA, W. H.; CALIFANO, J. A. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 4, p. 300-306, 2009.

HILGER, I.; FRUHAUF, K.; ANDRA, W.; HIERGEIST, R.; HERGT, R.; KAISER, W. A. Heating potential of iron oxides for therapeutic purposes in interventional radiology. **Academic Radiology**, v. 9, p. 198-202, 2002.

HIRSCH, L. R.; STAFFORD, R. J.; BANKSON, J. A.; SERSHEN, S. R.; RIVERA, B.; PRICE, R. E.; HAZLE, J. D.; HALAS, N. J.; WEST, J. L. Nanoshell-mediated near infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, n. 23, p. 13549-13554, 2003.

HOGENESCH, H.; NIKITIN, A. Y. Challenges in pre-clinical testing of anti-cancer drugs in cell culture and in animal models. **Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 183-186, 2012.

HOLSAPPLE, M. P.; FARLAND, W. H.; LANDRY, T. D.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; CRTER, J. M.; WALKER, N. J.; THOMAS, K. V. Research strategies for safety evaluation

of nanomaterials part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. **Toxicological Sciences**, v. 88, n. 1, p. 12-17, 2005.

HOU, C. H.; HOU, S. M.; HSUEH, Y. S.; LIN, J.; WU, H. C., LIN, F. H. The *in vivo* performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy. **Biomaterials**, v. 30, n. 23, p. 3956-3960, 2009.

HSUE, S. S.; CHEN, Y. K.; LIN, L. M. Expression of survivin and XIAP for DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis is associated with p53 accumulation. **Oral Oncology**, v. 44, n. 1, p. 43-49, 2008.

HU, F.; NEOH, K.; CEN, L.; KANG, E. Cellular response to magnetic nanoparticles 'PEGylated' via surface-initiated atom transfer radical polymerization. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 809-816, 2006.

HUANG, X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. **Mutation Research**. v. 533, p. 153-171, 2003.

HUGUES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, p. 22-30, 2005.

IBCC. Instituto Brasileiro de Controle do Câncer. 2012. Disponível em: <<http://www.ibcc.org.br/>>. Acesso em: 12/10/2012.

IBRAHIM, N. K.; SAMUELS, B.; PAGE, R.; DOVAL, D.; PATEL, K. M.; RAO, S. C.; NAIR, M. K.; BHAR, P.; DESAI, N.; HORTOBAGYI, G. N. Multicenter phase II trials of ABI-007, an albumin-bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 25, p. 6019-6026, 2005.

INCA. Estimativa 2012 do Instituto Nacional do Câncer sobre a incidência de câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>>. Acesso em: 21/11/2012 a.

INCA. Brasil - Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/>>. Acesso em: 26/10/2012 b.

ITO, A; TANAKA, K.; HONDA, H.; ABE, S.; YAMAGUCHI, H.; KOBAWASHI, T. Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 364-369, 2003.

ITO, A.; TANAKA, K.; KONDO, K.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; MATSUMOTO, K.; SAIDA, T.; KOBAYASHI, T. Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. **Cancer Science**, v. 94, n. 3, p. 308-313, 2005.

ITO, A.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 55, p. 320-328, 2006.

JAIN, K. K. Advances in the field of nanooncology. **BMC Medicine**, v. 8, p. 83, 2012.

JAIN, V.; SWARNAKAR, N. K.; MISHRA, P. R.; VERMA, A.; KAUL, A.; MISHRA, A. K.; JAIN, N. K. Paclitaxel loaded PEGylated glycerylmonooleate based nanoparticulate carriers in chemotherapy. **Biomaterials**, v. 33, n. 29, p. 7206-7220, 2012.

Jl, Z.; LIN, G.; LU, Q.; MENG, L.; SHEN, X.; DONG, L.; FU, C.; ZHANG, X. targetec therapy of SMMC-7721 liver cancer *in vitro* and *in vivo* with carbon nanotubes based drug delivery system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 365, p. 143-149, 2012.

JOHANNSEN, M.; GNEVECKOW, U.; TAYMOORIAN, K.; THIESEN, B.; WALDOFNER, N.; SCHOLZ, R.; JUNG, K.; JORDAN, A.; WUST, P.; LOENING, S. A. Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase I trial. **International Journal of Hyperthermia**, v. 23, n. 3, p. 315-323, 2007.

JONES, S. K.; WINTER, J. W.; GRAY, B. N. Treatment of experimental rabbit liver tumours by selectively targeted hyperthermia. **International Journal of Hyperthermia**, v. 18, p. 117-128, 2002.

JONKERS, J.; BERNS, A. Conditional mouse models of sporadic cancer. **Nature Reviews: Cancer**, v. 2, n. 4, p. 251-265, 2002.

JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; MAIER-HAUFF, K.; JOHANNSEN, M.; WUST, P.; NADOBNY, J.; SCHIRRA, H.; SCHMIDT, H.; DEGER, S.; LOENING, S.; LANKSCH, W.; FELIX, R. Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, n. 1, p. 118-126, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

KALISHWARALAL, K.; SHEIKPRANBABU, S.; BARATHMANIKANTH, S.; HARIBALAGANESH, R.; RAMKUMARPANDIAN, S.; GURUNATHAN, S. Gold nanoparticles inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability via Src dependent pathway in retinal endothelial cells. **Angiogenesis**, v. 14, n. 1, p. 29-45, 2011.

KANETO, C. M. Identificação de genes regulados pelo mecanismo de metilação em linhagens tumorais de cabeça e pescoço. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

KARTHIKEYAN, B.; KALISHWARALAL, K.; SHEIKPRANBADU, S.; DEEPAK, V.; HARIBALAGANESH, R.; GURUNATHAN, S. Gold nanoparticles downregulate VEGF and IL-1B-induced cell proliferation through Src kinase in retinal pigment epithelial cells. **Experimental Eye Research**, v. 91, p. 769-778, 2010.

KASTEN, F. H. Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids. **International Review of Cytology**, v. 21, p. 141-202, 1967.

KAWAI, N.; ITO, A.; NAKAHARA, Y.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T.; FUTAKUCHI, M.; SHIRAI, T.; TOZAWA, K.; KOHRI, K. Complete regression of experimental prostate cancer in nude mice by repeated hyperthermia using magnetite cationic liposomes and a newly developed solenoid containing a ferrite core. **The Prostate**, v. 66, n. 7, p. 718-727, 2006.

KERR, A. R.; CRUZ, G. D. Oral cancer: practical prevention and early detection for the dental team. **NY State Dental Journal**, v. 68, n. 7, p. 44-54, 2002.

KRISHNAKUMAR, N.; MANOHARAN, S.; PALANIAPPAN, P. R.; VENKATACHALAM, P.; ARUN MANOHAR, M. G. Chemopreventive efficacy of piperine in 7,12-dimethyl benz [a] anthracene (DMBA)-induced hamster buccal pouch carcinogenesis: An FT-IR study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 11, p. 2813-2820, 2009.

KÜCKELHAUS, S. A. S.; GARCIA, V. A. P.; LACAVA, L. M.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M.; SILVA, O.; LIMA, E. C. D.; FIGUEIREDO, F.; TEDESCO, A. C.; KÜCKELHAUS, S.; REIS, S. C.; CARNEIRO, M. F.; TEDESCO, A. C.; OLIVEIRA, D. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C. AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. M. G. *In vivo* investigation of cobalt ferrite-based magnetic fluid and magnetoliposomes using

morphological tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272, p. 2402-2403, 2004.

KUJAN, O.; DUXBURY, A. J.; GLENNY, A. M.; THAKKER, N. S.; SLOAN, P. Opinions and attitudes of the UK's GDP's and specialists in oral surgery, oral medicine and surgical dentistry on oral cancer screening. **Oral Diseases**, v. 12, n. 2, p. 194-199, 2006.

KWOK, J. C.; RICHARDSON, D. R. The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation? **Critical Reviews in Oncology/hematology**. v. 42, p. 65-78, 2002.

LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, L. M. ; MARTINS, E. V.; GARCIA, V. A. P.; RÉBULA, C. A.; LEMOS, A. P. C.; SOUSA, M. H.; TOURINHO, F. A.; DA SILVA, F. F.; MORAIS, P. C. Toxic effects of ionic magnetic fluids in mice. **Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, p. 90-95, 1999 a.

LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MARTINS, E. V.; LACAVA, L. M.; FREITAS, M. L. L.; GARCIA, V. A. P.; RÉBULA, C. A.; LEMOS, A. P. C.; SOUSA, M. H.; TOURINHO, F. A.; MORAIS, P. C. Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. **Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, p. 431-434, 1999 b.

LACAVA , L. M; GARCIA, V. A. P.; KÜCHELHAUS, S. A. S.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M.; SILVA. O.; PELEGRINI, F.; GANSAU, C.; BUSKE, N.; MORAIS, P. C. Magnetic resonance and light microscopy investigation of a dextran coated magnetic fluid. **Journal of Applied Physics**, v. 93, p. 7563-7565, 2003.

LACAVA, L. M. Estudos de biodistribuição e toxicidade de fluido magnético à base de partículas de magnetita recobertas por dextran em camundongos. Tese de doutorado do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2004.

LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C. Aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas. **Parcerias Estratégicas/CGEE**, v. 18, p. 73-85, 2004.

LACAVA, L. M.; GARCIA, V. A. P.; KÜCKELHAUS, S.; AZEVEDO, R. B.; SADEGHIANI, N.; BUSKE, N.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272-276, p. 2434-2435, 2004.

LACAVA, Z. G. M. Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia – Introdução, preparação e**

caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo, Artliber Editora, p. 175-181, 2006.

LANGDON, S. P. Characterization and authentication of cancer cell lines: an overview. **Methods in Molecular Medicine**, v. 88, p. 33-42, 2003.

LANKOFF, A.; SANDBERG, W. J.; WEGIEREKCIUK, A.; LISOWSKA, H.; REFSNES, M.; SARTOWSKA, B.; SCHWARZE, P. E.; MECZYNSKAWIELGOSZ, S.; WOJEWODZKA, M.; KRUSZEWSKI, M. The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP1 cells. **Toxicology Letters**, v. 208, n. 3, p. 197-213, 2012.

LEÃO, J. C.; GÓES, P.; SOBRINHO, C. B.; PORTER, S. Knowledge and clinical expertise regarding oral cancer among Brazilian dentists. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 34, n. 4, p. 436-439, 2005.

LEMKE, A. J.; VON PILSACH, M. I. S.; LUBBE, A.; BERGEMANN, C.; RIESS, H.; FELIX, R. MRI after magnetic drug targeting in patients with advanced solid malignant tumors. **European Radiology**, v. 14, n. 11, p. 1949-1955, 2004.

LINDSAY, S. BROSNAHAN, D.; LOWERY JR, T. J.; CRAWFORD, K.; WATT, G. D. Kinetic studies of iron deposition in horse spleen ferritin using O₂ as oxidant. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1621, n. 1, p. 57-66, 2003.

LISON, D.; THOMASSEN, L. C.; RABOLLI, V.; GONZALEZ, L.; NAPIERSKA, D.; SEO, J. W.; KIRSCHVOLDERS, M.; HOET, P.; KIRSCHHOCK, C. E.; MARTENS, J. A. Nominal and effective dosimetry of silica nanoparticles in cytotoxicity assays. **Toxicological Sciences**, v. 104, v. 1, p. 155-162, 2008.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia – propedêutica e clínica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi Editora, 2003.

LOTEMPIO, M. M.; VEENA, M. S.; STEELE, H. L.; RAMAMURTHY, B.; RAMALINGAM, T. S.; COHEN, A. N.; CHAKRABARTI, R.; SRIVATSAN, E. S.; WANG, M. B. Curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 19, p. 6994-7002, 2005.

LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHUTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization and application. **Angew Chemistry International**, ed. 46, p. 1222-1244, 2007.

MA, M.; WU, Y.; ZHOU, J.; SUN, Y.; ZHANG, Y.; GU, N. Size dependence of specific power absorption of Fe₃O₄ particles in AC magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 268, n.1-2, p. 33-39, 2004.

MACPHERSON, L. M. D.; MCCANN, M. F.; BINNIE, V. I.; STEPHEN, K. W. The role of primary health care professionals in oral cancer prevention and detection. **Brazilian Dental Journal**, v. 195, n. 5, p. 277-281. 2003.

MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; IMANI, M.; MILANI, A. S.; STROEVE, P. An *in vitro* study of bare and poly(ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a new toxicity identification procedure. **Nanotechnology**, v. 20, n. 22, p. 1-8, 2009 a.

MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; MILANI, A. S.; STROEVE, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 336, n. 2, p. 510-518, 2009 b.

MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; IMANIC, M.; SHOKRGOZAR, M. A.; MILANIE, A S.; HÄFELIF, U. O.; STROEVE, P. A new approach for the *in vitro* identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 300-309, 2010 a.

MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; IMANI, M.; STROEVE, P.; SOHRABI A. Templated growth of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by temperature programming in the presence of poly(vinyl alcohol). **Thin Solid Films**, v. 518, n. 15, p. 4281-4289, 2010 b.

MAHMOUDI, M.; AZADMANESH, K.; SHOKRGOZAR, M. A.; JOURNEAY, W. S.; LAURENT, S. Effect of nanoparticles on the cell life cycle. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 5, p. 3407-3432, 2011.

MAILANDER, V.; LANDFESTER, K. Interaction of nanoparticles with cells. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 9, p. 2379-2400, 2009.

MAITLAND, M. L.; SCHILSKY, R. L. Clinical trials in the era of personalized oncology, **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 6, p. 365-381, 2011.

MANOHARAN, S.; PANJAMURTHY, K.; BALAKRISHNAN, S.; VASUDEVAN, K.; VELLAICHAMY, L. Circadian time-dependent chemopreventive potential of withaferin-A in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis. **Pharmaceutical Reports**, v. 61, p. 719-726, 2009.

MARCU, L. G.; YEOH, E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, n. 10, p. 1303-1314, 2009.

MARTINS, M. A. T.; MARQUES, F. G. O. A.; PAVESI, V. C. S.; ROMAO, M. M. A.; LASCALA, C. A.; MARTINS, M. D. Avaliação do conhecimento sobre o câncer bucal entre universitários. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 37, n. 4, p.191-7, 2008.

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 4, p. 489-501, 2008.

MAURICIO, H. A.; MATOS, F. C. M.; GUIMARÃES, T. M. R. Conhecimentos, atitudes e práticas sobre câncer de boca da comunidade atendida pelo PSF de São Sebastião do Umbuzeiro/PB. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 38, n. 1, p. 10-4, 2009.

MILLERON, R. S.; BRATTON, S. B. 'Heated' debates in apoptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 18, p. 2329-2333, 2007.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **FASEB J**, v. 19, n. 3, p. 311-30, 2005.

MORAES, T. J.; DOWNEY, P. Neutrophil cell signaling in infection: role of phosphatidylinositide 3-kinase. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1293-1298, 2003.

MORNET, S.; VASSEUR, S.; GRASSET, F.; DUGUET, E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, p. 2161-2175, 2004.

MOROZ, P.; JONES, S. K.; GRAY, B. N. Status of hyperthermia in the treatment of advanced liver cancer **Journal of Surgical Oncology**, v. 77, p. 259-69, 2001.

MUKHERJEE, S. P.; BYRNE, H. Polyamidoamine dendrimer nanoparticle cytotoxicity, oxidative stress, caspase activation and inflammatory response: experimental observation and numerical simulation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** [in press]. 2012.

NANOCOMPOSIX. Zeta potential analysis of nanoparticles. v. 1.1, p. 1-6, 2012. Disponível em: <<http://nanocomposix.com/sites/default/files/nanoComposix%20Guidelines%20for%20Zeta%20Potential%20Analysis%20of%20Nanoparticles.pdf>>. Acesso em: 15/10/2012.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLE, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.

NIE, S.; XING, Y.; KIM, G. J.; SIMONS, J. W. Nanotechnology applications in cancer. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, p. 257-288, 2007.

OLIANI, S. M.; LIM, L. H.; CHRISTIAN, H. C.; PELL, K.; DAS, A. M.; PERRETTI, M. Morphological alteration of peritoneal mast cells and macrophages in the mouse peritoneal cavity during the early phases of an allergic inflammatory reaction. **Cell Biology International**, v. 25, n. 8, p. 795-803, 2001.

PANJAMURTHY, P.; MANOHARAN, S.; NIRMAL, M. R.; VELLAICHAMY, L. Protective role of Withaferin-A on immunoexpression of p53 and bcl-2 in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced experimental oral carcinogenesis. **Investigational New Drug**, v. 27, n. 5, p. 447-452, 2009.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p. R167-R181, 2003.

PARVEEN, S.; SAHOON, S. K. Nanomedicine: clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 45, n. 10, p. 965-988, 2006.

PAUNESKU, T.; MITTAL, S.; PROTIC, M.; ORYHON, J.; KOROLEV, S. V.; JOACHIMIAK, A.; WOLOSCHAK, G. E. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. **International Journal of Radiation Biology**, v. 77, p. 1007-1021, 2001.

PAVIA, M.; PILEGGI, C.; NOBILE, C. G.; ANGELILLO, I. F. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 5, p. 1126-1134, 2006.

PEREIRA, M. C.; PEREIRA, M. L.; SOUSA, J. P. Histological effects of iron accumulation on mice liver and spleen after administration of a metallic solution. **Biomaterials**, v. 20, p. 2193-2198, 1999.

PETERS, E. S.; LUCKETT, B. G.; APPLEBAUM, K. M.; MARSIT, C. J.; MCCLEAN, M. D.; KELSEY, K. T. Dairy products, leanness, and head and neck squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v. 30, n. 9, p. 11931-205, 2008.

PISON, U.; WELTE, T.; GIERSIG, M.; GRONEBERG, D. A. Nanomedicine for respiratory diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1-3, p. 341-350, 2006.

PORTILHO-CORRÊA, F. A. Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2007.

PORTILHO, F. A.; ESTEVANATO, L. L. C.; MIRANDA-VILELA, A. L.; ALMEIDA-SANTOS, M. F. M.; OLIVEIRA-CAVALCANTI, C. E.; LACAVA, B. M.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Investigation of a magnetohyperthermia system efficacy. **Journal of Applied Physics**, v. 109, n. 7, B307-B309, 2010.

PRADO, B. N.; PASSARELLI, D. H. C. Uma nova visão sobre prevenção do câncer bucal no consultório odontológico. **Revista de Odontologia da Universidade da Cidade São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 79-85, 2009.

PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M.; SIMIONI, A. R.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Photosensitizer-loaded magnetic nanoemulsion for use in synergic photodynamic and magnetohyperthermia therapies of neoplastic cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 11, p.5873-5877, 2008.

PURUSHOTHAM, A. D.; LEWISON, G.; SULLIVAN, R. The state of research and development in global cancer surgery. **Annals of Surgery**, v. 255, n. 3, p. 427-432, 2012.

RAJENDRAN, R.; SIVAPATHASUNDHARAM, B. Shafer's textbook of oral pathology (5th ed., p. 113-308. New Delhi: Elsevier, Reed Elsevier India Private Limited. [online Google Books] 2006.

REINA, M. 2006. Técnicas de estudio de lineas celulares. Disponível em <<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm>>. Acesso em: 20/10/2012.

REYNOLDS, A. R.; MOGHIMI, S. M.; HODIVALA-DILKE, K. Nanoparticle mediated gene delivery to tumor neovasculature. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 2-4, 2003.

REZENDE, C. P.; RAMOS, M. B.; DAGUÍLA, C. H.; DEDIVITIS, R. A.; RAPOPORT, A. Alterações da saúde bucal em portadores de câncer da boca e orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 4, p. 596-600, 2008.

RIBEIRO, J. T.; MACEDO, L. T.; CURIGLIANO, G.; FUMAGALLI, L.; LOCATELLI, M.; DALTON, M.; QUINTELA, A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; MANUNTAS, S.; MAZZARELLA, L.; BROLLO, J.; GOLDBIRSCH, A. Cytotoxic drugs for patients with breast cancer in the era of targeted treatment: back to the future? **Annals of Oncology**, v. 23, n. 3, p. 547-555, 2012.

RICHARDSON, D. R. Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 42, p. 267-281, 2002.

RIEHEMANN, K.; SCHNEIDER, S. W.; LUGER, T. A.; GODIN, B.; FERRARI, M.; FUCHS, H. Nanomedicine: challenge and perspectives. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 5, p. 872-897, 2009.

ROBERG, K.; JONSSON, A. C.; GRENMAN, R.; NORBERG-SPAACK, L. Radiotherapy responses in oral squamous carcinoma cell lines: evaluation of apoptotic proteins as prognostic factors. **Head Neck**, v. 29, n. 4, p. 325-334, 2007.

ROBERTS, C.; LIYANAGE, S. H.; HARRY, V. N.; ROCKALL, A. G. Functional imaging for assessing tumor response in cancer of the cervix. **Womens Health (London England)**, v. 7, n. 4, p. 487-497, 2011.

RUBACK, M. J.; GALBIATTI, A. L.; ARANTES, L. M.; MARUCCI, G. H.; RUSSO, A.; RUIZ-CINTRA, M. T.; RAPOSO, L. S.; MANIGLIA, J. V.; PAVARINO, E. C.; GOLONI-BERTOLLO, E. M. Clinical and epidemiological characteristics of patients in the head and neck surgery department of a university hospital. **São Paulo Medical Journal**, v. 130, n. 5, p. 307-313, 2012.

SADEGHIANI, N. Avaliação *in vivo* da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição do fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2004.

SADEGHIANI, N.; BARBOSA, L. S.; SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 466-468, 2005.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SALDANHA, C. A. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e genotoxicidade dos polímeros de albumina magnéticos. Dissertação de Mestrado da Pós Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília. 2007.

SANTOS, N. P. S.; NASCIMENTO, S. C.; WANDERLEY, M. S. O.; PONTES-FILHO, N. T.; DA SILVA, J. F.; DE CASTRO, C. M. M. B.; PERERIRA, E. C.; DA SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanoencapsulation of usnic acid: na attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 154-160, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SERVICE, R. F. Nanomaterials show signs of toxicity, **Science**, v. 300, n. 5617, p. 243, 2003.

SERWER, L. P.; NOBLE, C. O.; MICHAUD, K.; DRUMMOND, D. C.; KIRPOTIN, D. B.; OZAKA, T.; PRADOS, M. D.; PARK, J. W.; JAMES, D. Investigation of intravenous delivery of nanoliposomal topotecan for activity against orthotopic glioblastoma xenographs. **Neuro-Oncology**, v. 13, n. 12, p. 1288-1295, 2011.

SHEIKHOLESAMI, F.; RASAEI, M. J.; SHOKRGOZAR, M. A.; RAHBARIZADEH, F.; AHMADVAND, D. Isolation of a novel nanobody against HER2/neu using phage display technology. **LabMedicine**, v. 41, n. 2, p. 69-75, 2010.

SINGH, A.; DILNAWAZ, F.; SAHOO, S. K. Long circulating lectin conjugated paclitaxel loaded magnetic nanoparticles: a new theranostic avenue for leukemia therapy. **PLoS One**, v. 6, n. 11, 2011.

SLADOWSKI, D.; STEER, S. J.; CLOTHIER, R. H.; BALLS, M. An improved MIT assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 157, n. 1, p. 203-207, 1993.

SOENEN, S. J. H.; DE CUYPER, M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. **Contrast Media and Molecular Imaging**, v. 4, p. 207-219, 2009.

SOENEN, S. J.; ILLYES, E.; VERCAUTEREN, D.; BRAECKMANS, K.; MAJER, Z.; DE SMEDT, S. C.; DE CUYPER, M. The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes. **Biomaterials**, v. 30, . 6803-6813, 2009.

SOENEN, S. J.; NUYTTEN, N.; DE MEYER, S. F.; DE SMEDT, S. C.; DE CUYPER, M. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. **Small**, v. 6, p. 832-842, 2010.

SOENEN, S. J.; DE CUYPER, M.; DE SMEDT, S. C.; BRAECKMANS, K. Methods in Enzymology. Nanomedicine: infectious diseases, immunotherapy, diagnosis, antifibrotics, toxicology and gene medicine. Investigating the toxic effects of iron nanoparticles. Volume 509. [Google books]. 2011.

SONVICO, F.; MORNET, S.; VASSEUR, S.; DUBERNET, C.; JAILLARD, D.; DEGROUARD, J.; HOEBEKE, J.; DUGUET, E.; COLOMBO, P.; COUVREUR, P. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and *in vitro*. **Experiments in Bioconjugate Chemistry**, v. 16, p. 1181-1188, 2005.

SOUZA, L. R. B.; FERRAZ, K. D.; PEREIRA, N. S.; MARTINS, M. V. Conhecimento acerca do câncer bucal e atitudes frente à sua etiologia e prevenção em um grupo de horticultores de Teresina (PI). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 1, p. 31-39, 2012.

SUBRAMANYA, N. M.; PANDRUVADA, SAMBANDAM YUVARAJ, LIU, X.; SUNDARAM, K.; SHANMUGARAJAN, S.; RIES, W. L.; NORRIS, J. S.; LONDON, S. D.; TALMADGE, J. E.; SINGH, R. K.; FIDLER, I. J.; RAZ, A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.

TEDESCO, A. C. Uso de dispositivos nanoestruturados no tratamento do câncer. In: DURÁN, N; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia – Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, p. 183-193, 2006.

TEEGUARDEN, J. G.; HINDERLITER, P. M.; ORR, G.; THRALL, B. D.; POUNDS, J. G. Particokinetics *in vitro*: dosimetry considerations for *in vitro* nanoparticle toxicity assessments. **Toxicological Sciences**, v. 95, n. 2, p. 300-312, 2007.

THOMISON, J. 3rd; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human Pathology**, v. 39, n. 2, p. 154-166, 2008.

TOLEDO, A. L.; KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S.; MARCHIONI, D. M. Dietary patterns and risk of oral and pharyngeal cancer: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 1, p. 135-42, 2010.

TSENG, H. U.; LEE, C. Y.; SHIH, Y. H.; LIN, X. Z.; LEE, G. B. Hyperthermia cancer therapy utilizing superparamagnetic nanoparticles. **2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems**, 2007.

UNFRIED, K.; SYDLIK, U.; BIERHALS, K.; WEISSENBERG, A.; ABEL, J. Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 294, p. L358-L367, 2008.

VALLE, F. C. **Práticas de citologia e genética**. Rio de Janeiro: Medsi Editora, 2001.

VALOIS, C. R. A.; BRAZ, J. M.; NUNES, E. S.; VINOLO, M. A. R.; LIMA, E. C. D.; CURI, R.; KUEBLER, W. M.; AZEVEDO, R. B. The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a beta2 integrin-dependent pathway. **Biomaterials**, v. 31, n. 2, p. 366-374, 2010.

VAN DER ZEE, J. Heating the patient: a promising approach? **Annals of Oncology - Annual Review of Medicine**, v. 13, n. 8, p. 1173-1184, 2002.

VAN KRANEN, H. J.; DE GRUIJL, F. R.; DE VRIES, A.; SONTAG, Y.; WESTER, P. W.; SENDEN, H. C.; ROZEMULLER, E.; VAN KREIJL, C. F. Frequent p53 alterations but low incidence of ras mutations in UV-B-induced skin tumors of hairless mice. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 5, p. 1141-1147, 1995.

VASCONCELOS, E. M. Comportamento dos cirurgiões-dentistas das Unidades Básicas de Saúde do município de São Paulo quanto à prevenção e ao diagnóstico precoce do câncer bucal. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade de São Paulo, 2006.

VENGADESAN, N.; ARUNA, P.; GANESAN, S. Characterization of native fluorescence from DMBA-treated hamster cheek pouch buccal mucosa for measuring tissue transformation. **British Journal of Cancer**, v. 77, n. 3, p. 391-395, 1998.

VIDAL, A. K. L.; CALDAS JR., A. F.; MELLO, R. J. V.; ABREU-E-LIMA, M. C. C. Papiloma Vírus Humano (HPV) como fator de risco para o Carcinoma Escamoso Celular (CEC) Oral - Revisão de Literatura. **Odontologia Clínica-Científica**, v. 5, n. 1, p. 7-25, 2006.

VIPPOLA, M.; FALCK, G. C.; LINDBERG, H. K.; SUHONEN, S.; VANHALA, E.; NORPPA, H.; SAVOLAINEN, K.; TOSSAVAINEN, A.; TUOMI, T. Preparation of nanoparticle dispersions for *in vitro* toxicity testing. **Human and Experimental Toxicology**, v. 28, n. 6-7, p. 377-385, 2009.

WANG, W. C.; LIANG, S. L.; CHEN, Y. K.; LIN, L. M. The therapeutic effect of fractionated radiation on DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v. 44, n. 12, p. 1160-1166, 2008.

WANG, Z.; CHUI, W. K.; HO, P. C. Nanoparticle delivery system targeted to tumor neovasculature for combined anticancer and antiangiogenesis therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 3, p. 585-596, 2011.

WARD, B. B.; DUNHAM, T.; MAJOROS, I. J.; BAKER JR, J. R. Targeted dendrimer chemotherapy in an animal model for head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 69, n. 9, p. 2452-2459, 2011.

WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND, G.; SCULLY, C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. **Oral Oncology**, v. 41, n. 3, p. 244-260, 2005.

WEI, C. H.; HARARI, A. Parathyroid carcinoma: update and guidelines for management. **Current Treatments Options in Oncology**, v. 13, n. 1, p. 11-23, 2012.

WERNER, M. E.; FOOTE, M. B.; WANG, A. Z. Chemotherapy of human tumors: novel approaches from nanomedicine. **Current Pharmaceutical Design**, 2012 *in press*.

WILHELM, C.; GAZEAU, F.; ROGER, J.; PONS, J. N.; BACRI, J. C. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. **Langmuir**, v. 18, n. 21, p. 8148-8155, 2002.

WUNSCH FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncology**, v. 38, n. 8, p.737-746, 2002.

WUST, P.; HILDEBRANDT, B.; SREENIVASA, G.; RAU, B.; GELLERMANN, J.; RIESS, H.; FELIX, R.; SCHLAG, P. M. Hyperthermia in combined treatment of cancer. **Lancet Oncology**, v. 3, p. 487-97, 2002.

XU, P. S.; VAN KIRK, E. A.; ZHAN, Y. H.; MURDOCH, W. J.; RADOSZ, M.; SHEN, Y. Q. Targeted charged vesicular nanoparticles for nuclear drug delivery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 26, p. 4999-5002, 2007.

YANG, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; GU, W.; LI, Y. Galactosylated poly(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)phosphazene/DNA complex nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* evaluation for gene delivery. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 4, p. 927-933, 2010.

YANG, D.; VAN, S.; SHU, Y.; LIU, X.; GE, Y.; JIANG, X. JIN, Y.; YU, L. Synthesis, characterization and *in vivo* efficacy evaluation of PGG-docetaxel conjugate for potential cancer chemotherapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 581-589, 2012.

ZIELINSKAA, M.; SAWOSZA, E.; GRODZIKA, M.; BALCERAKA, M.; WIERZBICKIA, M.; SKOMIALB, J.; SAWOSZC, F.; CHWALIBOG, A. Effect of taurine and gold nanoparticles on the morphological and molecular characteristics of muscle development during chicken embryogenesis. **Archives of Animal Nutrition**, 2011.

ZYGOGIANNI, A. G.; KYRGIAS, G.; KARAKITSOS, P.; PSYRRI, A.; KOUVARIS, J.; KELEKIS, N.; KOULOULIAS, V. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. **Head and Neck Oncology**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2011.

ANEXO. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP), atestando a viabilidade do presente estudo, bem como seu perfil ético quanto à experimentação animal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

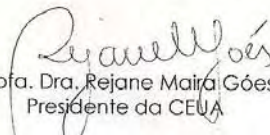
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da ação das nanopartículas magnéticas de ferro no câncer oral**" (protocolo nº. 029/2010 CEUA), sob responsabilidade do Profa. Dra. Paula Rahal, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião de 09/11/2010.

CERTIFICATE

UNESP/IBILCE Ethical Committee for Animal Research (CEUA) hereby certify that the scientific investigation entitled "**Study of the effect of the magnetic nanoparticles of iron in oral cancer**" (protocol nº. 029/2010 CEUA), on Paula Rahal responsibility, is in accordance with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and it was approved by the Committee of this Institute, on march 09th, november, 2010.

São José do Rio Preto, 09 de novembro de 2010.


Profa. Dra. Rejane Maira Góes
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – SAEPE
Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Lardim Nazareth
CEP 15054-000 São José do Rio Preto – SP - Brasil
Tel 17 221 2425 fax 17 221 2390 / 3221 2500
E-mail: bitonti@ibilce.unesp.br e ceua@ibilce.unesp.br