

**Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Avaliação da Biocompatibilidade/ Toxicidade de Fluido Magnético Composto  
de Nanopartículas de Maghemita Recobertas com Citrato em Camundongos  
Fêmeas Swiss**

**Adriana Brugin**

**Brasília  
2007**

**Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Avaliação da Biocompatibilidade/ Toxicidade de Fluido Magnético Composto  
de Nanopartículas de Maghemita Recobertas com Citrato em Camundongos  
Fêmeas Swiss**

**Adriana Brugin**

**Orientadora: Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava**

**Brasília – DF  
2007**

**ADRIANA BRUGIN**

**Avaliação da Biocompatibilidade/ Toxicidade de Fluido Magnético Composto  
de Nanopartículas de Maghemita Recobertas com Citrato em Camundongos  
Fêmeas Swiss**

**Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Patologia  
Molecular da Faculdade de  
Medicina da Universidade de  
Brasília, para obtenção do Título de  
Mestre.**

**Orientadora: Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava**

**Brasília – DF  
2007**

Aos meus pais, José Brugin e Terezinha Eunice Brugin, pelo amor a mim dedicado, ensinamentos e amizade.  
Ao meu grande amigo e esposo Júlio César Lourencini pelo apoio, dedicação e acima de tudo pela paciência nas horas difíceis. Obrigada!  
Este trabalho dedico a vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela constante presença em cada momento de minha vida e, em especial, durante a realização deste trabalho.

Em especial, agradeço à Professora Zulmira Guerrero Marques Lacava pela atenção, paciência e, principalmente, pelos ensinamentos. Obrigada Zulmira, pelos conselhos e amizade.

Agradeço à professora Emília Celma de Oliveira Lima do Instituto de Química, da Universidade Federal de Goiás, por sintetizar e gentilmente ceder a amostra MagheCi utilizada nos testes biológicos realizados neste trabalho.

Agradeço, em especial, à professora Maria de Fátima Menezes Almeida Santos pelo auxílio na análise das lâminas dos cortes histológicos. Obrigada, Maria de Fátima, pela paciência e ensinamentos.

Agradeço também, ao Sacha Braun Chaves pelo auxílio e sugestões na análise histológica.

Ao Professor César Koppe Grisólia pelos ensinamentos, amizade e paciência, principalmente no preparo das fotografias dos cortes histológicos.

Às professoras Maria de Nazaré Klatau Grisólia e Silviene Fabiana de Oliveira pelo incentivo em continuar meus estudos.

À minha grande amiga Flávia Arruda Corrêa-Portilho pelo auxílio nas coletas, limpeza do biotério, leitura de artigos, lágrimas e, principalmente, sorrisos. A amizade que nasceu durante esta etapa de nossas vidas será, por mim, sempre lembrada. Obrigada Flávia!

Agradeço à Débora de Oliveira Cintra e Silva por realizar a Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra utilizada neste trabalho e a Marcos Tiago de Amaral e Elói por confeccionar o gráfico do diâmetro das nanopartículas. O trabalho e amizade de vocês foram fundamentais na realização desta dissertação. Obrigada!

À grande amiga Elisa pelo auxílio nas coletas e limpeza do biotério, mas em especial, pela amizade. Obrigada, Elisa, do fundo do meu coração!

Agradeço às amigas do Laboratório de Genética: Luciana, Lane, Neda, Camila, Dani, Júlia. Obrigada pelo auxílio nas coletas, discussão de artigos e amizade. Obrigada por tudo!

Às minhas irmãs, Eliana e Cristiane, pela amizade e carinho. Vocês são uma parte de mim que momentaneamente está distante, mas que a cada dia está presente na minha lembrança. Amo vocês!

Aos meus queridos cunhados, Paulo e Cristiano, pela amizade e carinho. Agora vocês são parte da minha família.

Aos amigos do Laboratório de Genética pelo auxílio e amizade: Letícia, Leonora, Arthur, Ana Elizabeth, Ana Luíza, Carol, Penha e Ornil.

Em especial à Djalma pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas e todos os professores e alunos do Departamento de Morfologia: professor Ricardo Bentes, Grazi, João Paulo, Carol. Muito obrigada pelo auxílio, ensinamentos e amizade.

Enfim, agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, auxiliaram na realização deste trabalho, seja nos experimentos, ensinamentos, orações. Obrigada por tudo!

“Que nossos esforços desafiem as impossibilidades.  
Lembrai-vos de que as grandes proezas da história  
foram conquistadas do que parecia impossível”.  
(Charles Chaplin)

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 JUSTIFICATIVA.....	10
3 OBJETIVOS.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Fluido Magnético Estabilizado por Citrato.....	15
4.2 Teste de Viabilidade Celular em Macrófagos do Peritônio.....	16
4.3 Contagem de Leucócitos do Sangue.....	17
4.4 Teste de Micronúcleo e % EPC em Eritrócitos da Medula Óssea.....	18
4.5 Análise Histológica.....	19
5. RESULTADOS.....	22
5.1 Caracterização das Nanopartículas Magnéticas da Amostra MagheCi.....	23
5.2 Viabilidade Celular em Macrófagos Peritoneais.....	24
5.3 Contagem de Leucócitos do Sangue.....	26
5.4. Teste de Micronúcleo e % EPC em Eritrócitos da Medula Óssea.....	32
5.5 Análise Histológica dos Órgãos.....	34
5.5.1 Pulmão.....	35
5.5.2 Fígado.....	39
5.5.3 Baço.....	43
5.5.4 Rim.....	43
6 DISCUSSÃO.....	47
6.1 Considerações sobre as Características Físicas e Químicas da Amostra MagheCi.....	48
6.2 Considerações sobre a viabilidade dos Macrófagos do Peritônio em Presença da Amostra MagheCi.....	50
6.3 Considerações sobre a Contagem de Leucócitos do Sangue.....	51
6.4 Considerações sobre a Genotoxicidade e Citotoxicidade da Amostra MagheCi sobre a Medula Óssea.....	52
6.5 Considerações sobre a Histologia dos Órgãos.....	53
6.6 Considerações sobre a Biocompatibilidade da Amostra MagheCi.....	55
6.7 Considerações Finais.....	58
7. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS.....	71

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia das NPM de maghemita recobertas com citrato da amostra MagheCi, obtida por MET.....	23
Figura 2 - Histograma do diâmetro modal das nanopartículas magnéticas recobertas com citrato da amostra MagheCi.....	24
Figura 3 – Viabilidade celular em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com MagheCi.....	25
Figura 4 – Contagem global de leucócitos de camundongos tratados com MagheCi.....	27
Figura 5 – Contagem diferencial de leucócitos (monócitos) de camundongos tratados com MagheCi.....	29
Figura 6 – Contagem diferencial de leucócitos (linfócitos) de camundongos tratados com MagheCi.....	30
Figura 7 – Contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos e eosinófilos) de camundongos tratados com MagheCi.....	31
Figura 8 – Contagem da frequência de MN em eritrócitos policromáticos de camundongos tratados com MagheCi.....	32
Figura 9 - Contagem da frequência de MN em eritrócitos normocromáticos de camundongos tratados com MagheCi.....	33
Figura 10 – Índice de eritrócitos policromáticos na medula óssea de camundongos tratados com MagheCi.....	34
Figura 11 – Fotomicrografias de pulmão de camundongos controle e tratados com MagheCi.....	36
Figura 12 - Fotomicrografias de pulmão de camundongos tratados com MagheCi.....	37
Figura 13 - Fotomicrografias de pulmão de camundongos tratados com MagheCi.....	38
Figura 14 - Fotomicrografias de fígado de camundongos controle e tratados com MagheCi.....	40
Figura 15 - Fotomicrografias de fígado de camundongos tratados com MagheCi.....	41
Figura 16 - Fotomicrografias de fígado de camundongos tratados com MagheCi.....	42
Figura 17 - Fotomicrografias de baço de camundongos controle e tratados com MagheCi.....	44
Figura 18 - Fotomicrografias de rim de camundongos controle e tratados com MagheCi.....	45
Figura 19 - Fotomicrografias de rim de camundongos tratados com MagheCi.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN - ácido desoxirribonucléico

ARN - ácido ribonucléico

CDL:- contagem diferencial de leucócitos

CGL - contagem global de leucócitos

DMSA - ácido dimercaptosuccínico

EDTA - ácido dipotássico etilenoaminotetracético

ENC - eritrócito normocromático

EPC - eritrócito policromático

FM - fluido magnético

FNT $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

IL – interleucina

MagheCi – Fluido Magnético constituído de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

NPM - nanopartícula magnética

**RESUMO**

Materiais nanométricos são aqueles cujo tamanho variam de 1 a 100 nm. Dentre eles, os fluidos magnéticos (FM) são suspensões coloidais estáveis compostas de nanopartículas magnéticas dispersas em líquidos apropriados. FM têm sido alvo de interesse pelas mais variadas áreas, como as biomédicas. Fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita, com diâmetro médio de 10nm e recobertas com citrato (MagheCi), foi sintetizado visando utilização biomédica. A fim de avaliar sua biocompatibilidade/toxicidade em sistemas biológicos, a amostra MagheCi foi administrada endovenosa/peritonealmente em camundongos fêmeas Swiss não-isogênicos. Após 6, 12, 24 e 48 horas e 7 dias da administração de MagheCi, testes de viabilidade celular, contagem de leucócitos e análise histológica do fígado, pulmão, baço e rins foram realizados. Além destes, testes de micronúcleo (MN) nos eritrócitos da medula óssea foram feitos 24 e 48 horas e 7 dias após a administração. O teste de viabilidade das células peritoneais não apresentou qualquer alteração significativa. A contagem de leucócitos do sangue realizada para verificar o potencial pró-inflamatório de MagheCi constatou diminuição significativa de leucócitos totais devida à diminuição de linfócitos apenas no tempo de 6 horas. Também foi observada diminuição de monócitos (6 horas e 7 dias). O teste de micronúcleo mostrou, apesar do aumento no número de MN nos eritrócitos normocromáticos (48 horas), total ausência tanto de genotoxicidade nos eritrócitos policromáticos (EPC), quanto de citotoxicidade, esta demonstrada pela não alteração significativa da porcentagem de EPC. A análise histológica mostrou a presença de aglomerados de nanopartículas magnéticas no fígado, pulmão, rins e baço em quase todos os tempos de tratamento e presença de infiltrado inflamatório brando em alguns animais, observação não constatada no baço. Os resultados mostraram que a administração de MagheCi induz apenas alterações brandas e temporárias nos camundongos, sugerindo que pode ser considerada biocompatível com potencial para aplicações biomédicas, como magnetohipertermia e sistemas de entrega de drogas.

Palavras-chave: biocompatibilidade, leucócitos, citrato, fluido magnético, maghemita, micronúcleo, histologia, nanopartícula magnética, viabilidade celular.

**ABSTRACT**

Nanostructured materials are defined as materials that present dimensions in the 1 to 100 nm scale. Belonging to this class of materials, magnetic fluids (MF's) are stable colloidal suspensions composed of magnetic nanoparticles dispersed in appropriated liquids. MF's have been the focus of interest of several different areas, such as the biomedical area. A MF sample based on citrate-coated maghemite nanoparticles with average diameter of 10nm (MagheCi) was synthesized with biomedical purposes. To evaluate the biocompatibility/ toxicity in biological systems, the MagheCi sample was endovenous/intraperitoneally administrated to non-isogenic, female Swiss mice. Six, 12, 24, and 48 hours, and 7 days after MagheCi administration, cell viability tests, leukocytes counting, and histology of the liver, lungs, spleen, and kidneys were performed. Further, micronucleus (MN) tests were performed in bone marrow erythrocytes 24 and 48 hours, and 7 days after MagheCi administration. The viability test did not show any significant alteration. Leukocytes counting may reveal the pro-inflammatory potential, showed decrease of the total leukocyte population due to a decrease of lymphocyte population exclusively in the analysis made 6 hours after MagheCi administration. A decrease on the monocyte population was also observed (6 hours and 7 days). MN tests revealed increase in MN frequency on normochromatic erythrocytes (48 hours) but total absence of genotoxicity in polychromatic erythrocytes (PCE). Further, no significant changes were showed in the PCE percentage evidencing no cytotoxicity in bone marrow cells. Histological analysis showed the presence of magnetic nanoparticles in the liver, lungs, kidneys and spleen tissues during all the experimental time. A slight inflammatory infiltration was also observed in the organs of some animals, but not in the spleen. Data show that the MagheCi sample induced only slight and temporary alterations in mice tissues and organs, suggesting its biocompatibility and potential to be used in biomedical applications, such as magnetohyperthermia and drug delivery systems.

**Key words:** biocompatibility, leukocyte, citrate, magnetic fluid, maghemite, micronucleus, histology, magnetic nanoparticle, cell viability.

## **1. INTRODUÇÃO**

A nanociência é uma área crescente que compreende o estudo de diversos materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais) estruturados em escala nanométrica (Medeiros; Paterno e Mattoso, 2006) os quais têm, usualmente, entre 1nm (que equivale a um bilionésimo de um metro) até 100 nm.

A nanotecnologia tem como marco inicial a palestra proferida, em 1952, por Richard Feynman no Instituto de Tecnologia da Califórnia. Nesta palestra, Feynman propôs que, em futuro próximo, seria possível manipular o processo de construção de moléculas, átomo por átomo (Medeiros; Paterno e Mattoso, 2006). Atualmente, esta manipulação já é viável e possibilita o desenvolvimento de vários materiais nanoestruturados, com aplicações nas mais diferentes áreas.

Os materiais na escala nanométrica apresentam propriedades e fenômenos físicos, químicos e/ou biológicos significativamente novos. Uma característica, por exemplo, é a de apresentar uma relação superfície-volume alta (Thurman, 2006), o que torna esses materiais interessantes para aplicações na Física, Química e Biologia. No caso da Biologia, esta característica possibilita a ligação de grande número de moléculas, tais como anticorpos, proteínas, ligantes-alvo o que, por sua vez, favorece o direcionamento específico (Gupta e Gupta, 2005).

As nanopartículas são classificadas em metálicas, semicondutoras e poliméricas, de acordo com o material utilizado na sua síntese. As metálicas, por exemplo, podem ser produzidas a partir de diferentes materiais como ferro, níquel, cobalto e ouro. Dentre estas, são particularmente interessantes as nanopartículas magnéticas (NPM) que têm como vantagem sua capacidade de magnetização e atração por magnetos (Liu, 2006).

A capacidade de magnetização das nanopartículas tem proporcionado a utilização destes materiais em diferentes aplicações. Dentre as aplicações biomédicas apresentam grande interesse a separação, purificação e concentração de biomoléculas, sistemas entregadores de drogas a sítios específicos, diagnóstico por imagem de ressonância magnética e hipertermia para tratamento de câncer.

Para utilização na separação, purificação e concentração de biomoléculas, moléculas como anticorpos e oligonucleotídeos podem ser imobilizadas na superfície das nanopartículas magnéticas (Liu, 2006). Em particular, na separação imunomagnética, as células alvo são reconhecidas pelo anticorpo associado às NPM

e assim, marcadas magneticamente, podem ser separadas por meio de colunas magnéticas com a utilização de um magneto externo o qual promove sua retenção. Posteriormente, com a retirada do magneto externo, as células separadas são coletadas. Através desta técnica, células tumorais circulantes podem ser detectadas e isoladas de pacientes portadores de câncer de próstata (Chen et al., 2005), células CD34<sup>+</sup> podem ser separadas de células primordiais hematopoiéticas umbilicais para serem utilizadas em terapias de transplante celular (Chen et al., 2006), por exemplo.

A marcação magnética também pode facilitar a separação de células tumorais das células não neoplásicas o que decorre do fato de que linhagens tumorais são capazes de incorporar e acumular maior quantidade de nanopartículas magnéticas. Isto foi mostrado por Clement e colaboradores (2006) que incubaram diferentes linhagens celulares de carcinoma mamário e leucemia mielóide crônica com nanopartículas recobertas com carboximetildextrana marcadas com corante fluorescente e constataram que 60% das células eram retidas na fração positiva, o que indica interação das células tumorais com as nanopartículas. Algumas linhagens celulares (MCF-7 e K-562), entretanto, interagem mais fortemente do que outras linhagens.

Outra aplicação interessante das nanopartículas magnéticas é no direcionamento e entrega de drogas em sítios específicos para tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer. Desta forma, um quimioterápico pode ser atraído para o sítio tumoral quando as NPM são expostas a campo magnético externo, aumentando sua efetividade e diminuindo os efeitos colaterais aos tecidos normais (Alexiou et al., 2005). Entre outras vantagens da utilização das nanopartículas no direcionamento de drogas podemos citar o seu tamanho, o qual proporciona passagem por barreiras biológicas, além de possibilitar o encapsulamento de agentes terapêuticos (Fahmy et al., 2005). Sengupta e colaboradores (2005) mostraram que agentes quimioterápicos e antiangiogênicos quando conjugados a envelopes lipídicos contendo nanopartículas (nanocélulas) são capazes de inibir o crescimento e promover a perda da vasculatura de melanoma e carcinoma pulmonar de Lewis.

A utilização de nanopartículas como agente de contraste para imagem por ressonância magnética é outra possibilidade de aplicação desses compostos. Trabalhos têm mostrado que nanopartículas de óxido de ferro magnéticas

apresentam tropia para os nódulos linfáticos. A linfotropia ocorre devido ao extravasamento das nanopartículas do espaço vascular para o intersticial. Dentro do linfonodo, estas são fagocitadas por macrófagos resultando na detecção pela ressonância magnética (Rockall et al., 2005; Harisinghani et al., 2005). Por meio desta técnica, metástase em nódulo linfático pode ser detectada em vários tipos de tumores, como no câncer gástrico (Tatsumi et al., 2006) e câncer de testículo em estágio precoce (Harisinghani, 2005). Nestes têm sido mostrado alta especificidade e sensibilidade quando comparados ao critério convencional (tamanho do nódulo linfático). Por meio desta técnica, Rockall e colaboradores (2005) mostraram aumento da sensibilidade de 29%, no critério de tamanho, para 93%, com a utilização de nanopartículas para detecção de nódulo linfático maligno em pacientes com câncer de cérvix e de endométrio.

Além das aplicações já citadas, a hipertermia é de grande interesse no tratamento do câncer. É uma forma de terapia não ionizante que consiste na elevação da temperatura a níveis supra-fisiológicos, atingindo entre 40 °C e 45 °C (Dewhirst et al., 2003; Jones et al., 2005). No caso dos tecidos tumorais, a perfusão sanguínea é menor, quando comparada aos tecidos normais, característica esta que promove maior aquecimento dos tumores (Dewhirst et al., 2003). Além disso, os tecidos tumorais são normalmente ácidos e possuem baixo aporte de nutrientes, fato este que proporciona o aumento na sensibilidade termal dessas células (Song, 1984; Dewhirst et al., 2003).

Trabalhos recentes têm mostrado que a hipertermia pode inativar células, provocar mudanças na organização do citoesqueleto celular, causar regressão tumoral e danos teciduais, influenciar a atividade de cinases e ciclinas do ciclo celular levando à apoptose, potencializar os efeitos da radioterapia e aumentar a ação de muitas drogas antineoplásicas (Dahl et al., 1999; Jordan et al., 1999; Hildebrandt, 2002). As células cancerígenas também podem ser reconhecidas pelo sistema imunitário (células matadoras naturais) devido às alterações nos receptores celulares (Jordan et al., 1999).

Ensaios clínicos têm evidenciado que a hipertermia atua principalmente como adjuvante na radiação ionizante (Jones et al., 2005; Wust et al., 2002; Hildebrandt, 2002) e quimioterapia (Wust et al., 2002; Hildebrandt, 2002). No caso da radiação, o aquecimento moderado (< 42 °C) aumenta a perfusão tumoral e, conseqüentemente,

a oxigenação do tecido, tornando a radiação ionizante mais eficiente devido à formação dos radicais de oxigênio que atacam o ADN das células tumorais (Jones et al., 2005; Wust et al., 2002; Hildebrandt, 2002). Por outro lado, a hipertermia também atua na fase S do ciclo celular, potencializando a ação da radiação ionizante (Jones et al., 2005; Dewhirst et al., 2003)

Várias interações têm sido encontradas com quimioterápicos, por exemplo, agentes alquilantes, doxorrubicina, fluororacil, taxanos, entre outros. Neste caso, a hipertermia aumenta a perfusão tecidual, promovendo aumento da distribuição da droga (Wust et al., 2002; Hildebrandt, 2002).

A hipertermia pode ser obtida através da utilização de vários métodos, como exposição do tecido a fontes de calor ou radiação não ionizante (campo eletromagnético ou ultrassom) (Dewhirst et al., 2003; Stauffer, 2005; Jordan, 2006). Pode ainda ser classificada como invasiva (implante de antenas de microondas, eletrodos de radiofrequência, metais ferromagnéticos e transdutores de ultrassom) ou não invasiva (superficial) (Dewhirst et al., 2003).

Embora a hipertermia seja utilizada há muito tempo, vários obstáculos existem na sua realização. Por exemplo, o aquecimento gerado por técnicas não invasivas eletromagnéticas impedem o aquecimento localizado em profundidades maiores que 2 cm a 5 cm (Dewhirst et al., 2003). Outra dificuldade é a incapacidade de aquecer o tecido tumoral de maneira uniforme e sem danos aos tecidos normais adjacentes (Skinkai, 2002; Brusentsov, 2002).

A fim de superar os obstáculos na realização da hipertermia, tem sido proposta a utilização de fluidos magnéticos. Ferrofluidos, ou fluidos magnéticos (FM), são suspensões estáveis coloidais de monodomínios magnéticos dispersos em solventes orgânicos ou inorgânicos (Elói, 2004; Wang, Gu e Yang, 2005; Lacava, 2006). Os FM apresentam propriedades que permitem absorção de energia quando submetidos a gradiente de campo magnético, energia esta convertida em calor (Wang, Gu e Yang, 2005; Hilger, Hergt e Kaiser, 2005), fato que explica o seu interesse nas aplicações de hipertermia.

O processo de hipertermia gerado magneticamente é denominado magnetotermocitolise ou magnetohipertermia (Halbreich et al., 1998, Halbreich et al., 2002). O aquecimento gerado neste processo promove a lise celular, destruindo as células tumorais (Halbreich et al., 1998, 2002; Hilger, Hergt e Kaiser 2005; Phillips,

2005). O calor gerado pelas nanopartículas magnéticas, quando estas são submetidas a gradiente de campo magnético, é capaz de aumentar a sobrevivência de animais portadores de tumor, causar regressão tumoral ou, ainda, eliminá-lo (Brusentsov, 2002; Jordan, 2006).

Nanopartículas de óxido de ferro são conhecidas por serem não tóxicas e eventualmente são quebradas para formar hemoglobina do sangue (Gupta e Gupta, 2005). Na maioria dos casos, o material magnético do núcleo é composto de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou sua forma oxidada, a maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) (Chatterjee, Haik e Chen, 2003; Tartaj, 2003; Gupta e Gupta, 2005). Estes materiais apresentam características interessantes para aplicações *in vivo*, por exemplo, quando em escala nanométrica se comportam como superparamagnéticas, ou seja, não retêm magnetismo após remoção do campo magnético (Berry e Curtis, 2003; Gupta e Gupta, 2005), o que explica sua preferência em aplicações biomédicas (Tartaj et al., 2003).

A utilização de maghemita na constituição das nanopartículas já tem sido relatada e com potencial para diferentes aplicações: hipertermia para tratamento de tumores (Sonvico et al., 2005), agente de contraste para imagem por ressonância magnética (Thünemann et al., 2006), separação magnética de células (Geldwerth et al., 1999), por exemplo.

No que se refere à cobertura das nanopartículas, vários materiais tem sido utilizados: DMSA (Chaves, 2002, Garcia, 2005), dextrana (Lacava, 2002, 2003, 2004a, b), ácido cítrico (Garcia, 2002; Freitas, 2003), ácido poliaspártico (Sousa et al., 2001; Sadeghiani et al., 2005); ácido glutâmico (Sousa et al., 2001), entre outras. Na maioria dos casos, tem-se preferência por materiais encontrados naturalmente nos sistemas biológicos ou materiais com aplicações biológicas reconhecidas.

Além de proporcionar a biocompatibilidade da amostra, a cobertura também tem como função estabilizar as nanopartículas (principalmente quando em pH fisiológico), proporcionar grupamentos funcionais para ligação a receptores e evitar captação pelo sistema fagocítico mononuclear (Thünemann et al., 2006).

Antes, porém, da aplicação dos FM em humanos, testes devem ser realizados a fim de se avaliar os efeitos da administração desses materiais em sistemas biológicos. Entre os testes utilizados, encontram-se os de biocompatibilidade/toxicidade realizados em modelos animais. A aplicação de FM,

em modelos animais, tem mostrado resultados promissores devido à ausência de danos teciduais (Brusentsov, 2004), baixa toxicidade (Lacava, 2004, Sadeghiani, 2005) e possibilidades de aplicações em sítios alvo específicos (Chaves et al., 2002; Garcia, 2005).

Os testes de biocompatibilidade/toxicidade podem ser avaliados mediante a utilização de vários ensaios biológicos. Entre eles podemos citar o teste de viabilidade celular em macrófagos peritoneais de animais expostos a várias amostras de FM: FM à base de NPM de ferrita de cobalto recobertas com citrato (Kückelhaus, 2003, Kückelhaus et al., 2004), FM à base de NPM de magnetita recobertas com carboximetildextrana (Guedes, 2005; Guedes et al., 2005) e FM composto de nanopartículas recobertas com ácido dimercaptosuccínico (DMSA) ou dextrana (Sestier et al., 2002).

Parâmetros sanguíneos também são ferramentas imprescindíveis na avaliação da biocompatibilidade/toxicidade dos FM. Alterações, dose e tempo dependentes, têm sido observadas na contagem de leucócitos após administração de FM. Freitas (2000) observou que a dose mais concentrada ( $5 \times 10^{17}$  partículas/Kg) de FM à base de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido dodecanóico e álcool etoxilado provoca diminuição na população de linfócitos 14 dias após sua administração em camundongos. Diminuição na população de linfócitos e concomitante aumento na população de monócitos foram observadas após administração de NPM recobertas com ácido poliaspártico ( $0.6 \times 10^{16}$  partículas/mL) enquanto que a dose mais concentrada ( $1.6 \times 10^{16}$  partículas/mL) acarretou aumento na população de monócitos (Sadeghiani et al., 2005).

No que diz respeito às alterações do material genético, ensaios de micronúcleo em eritrócitos da medula óssea de camundongos expostos aos FM têm sido realizados visando avaliar o potencial genotóxico e citotóxico destes compostos. Garcia (2002) observou que o FM composto de nanopartículas de magnetita recobertas com citrato possui ação genotóxica branda, enquanto nanopartículas à base de ferrita de cobalto recobertas com citrato (Kückelhaus, 2003) não apresentam efeitos genotóxicos, porém são citotóxicos à medula óssea de camundongos.

Outro estudo de grande importância biológica é a análise histológica, pois permite avaliar a biocompatibilidade/toxicidade da amostra de FM nos órgãos

expostos a estes materiais. Partículas magnéticas recobertas com ácido dodecanóico e álcool etoxilado (Freitas, 2000) têm mostrado alterações dose e tempo dependentes enquanto nanopartículas de magnetita recobertas com dextrana (Lacava, 2004) não acarretam alterações histológicas nos órgãos analisados.

Visando o desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas o Centro de Nanociência e Nanotecnologia da Universidade de Brasília juntamente com as demais Instituições de Ensino e Pesquisa envolvidos propuseram a síntese de FM composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato (MagheCi). A biocompatibilidade/toxicidade da amostra MagheCi foi avaliada por meio de testes de viabilidade celular em macrófagos peritoneais, contagem de leucócitos, ensaio de micronúcleo em eritrócitos da medula óssea e análise histológica dos órgãos (fígado, pulmão, baço e rim) de camundongos fêmeas Swiss não-isogênicos submetidos à injeção de MagheCi em diferentes tempos.

Até o presente trabalho, nanopartículas à base de maghemita recobertas com citrato não haviam sido avaliadas em sistemas biológicos. Sabe-se que o ferro, elemento químico presente na magnetita e na maghemita, é essencial para os organismos vivos e participa de grande variedade de vias metabólicas (transporte de oxigênio, síntese de ADN, cadeia transportadora de elétrons, entre outras) (Ponka, 1999; Lieu et al., 2001). Porém, seu excesso leva à geração de radicais livres que atuam no dano a várias moléculas (ADN, carboidratos, lipídios) (Emerit, Beaumont e Trivin, 2001; Lieu et al., 2001; Videla et al., 2003). Assim, a escolha da maghemita, a forma oxidada da magnetita, como material componente do núcleo da nanopartícula magnética deve-se ao fato de que esta ferrita, teoricamente, não acarreta danos aos tecidos/células.

A escolha do citrato como material de cobertura das nanopartículas da amostra utilizada é decorrente da sua ampla distribuição nos seres vivos, fato que sugere a sua biocompatibilidade em sistemas biológicos.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O aumento crescente da incidência de câncer tem suscitado a busca de alternativas mais efetivas, com o mínimo de efeitos colaterais, para o seu tratamento e diagnóstico mais precoce. Materiais em escala nanométrica, em especial as nanopartículas magnéticas, têm sido desenvolvidos com estes propósitos. A necessidade de se entender os mecanismos de ação desses materiais, aliada ao fato de que tais conhecimentos contribuirão para o desenvolvimento de materiais cada vez mais biocompatíveis, justificam esta pesquisa.

### **3. OBJETIVOS**

Visto que o Centro de Nanociência e Nanotecnologia da Universidade de Brasília e demais Instituições de Ensino e Pesquisa envolvidas vêm desenvolvendo fluídos magnéticos para aplicações biomédicas, testes biológicos são necessários para validar tais procedimentos antes de se proceder a ensaios clínicos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo geral investigar a biocompatibilidade/toxicidade de amostra de fluido magnético constituído por nanopartículas magnéticas à base de maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_4$ ) recobertas com citrato (MagheCi) em camundongos fêmeas Swiss não-isogênicos. O trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

- 1) Avaliar a viabilidade dos macrófagos do peritônio após administração intraperitoneal de MagheCi, por meio de teste de exclusão de nigrosina;
- 2) Avaliar o potencial pró-inflamatório da amostra MagheCi por meio da contagem de leucócitos do sangue;
- 3) Avaliar o potencial genotóxico e citotóxico da amostra MagheCi na medula óssea de camundongos, por meio do teste de micronúcleo e % EPC, respectivamente;
- 4) Verificar a presença de NP da amostra MagheCi e seus efeitos nos órgãos (pulmão, fígado, baço e rins), por meio de análise histológica.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Para realização dos testes biológicos foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas, não-isogênicos, com peso médio de 38 g provenientes do Biotério da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, SP. Durante os experimentos, os animais foram alojados no biotério do laboratório de Genética da Universidade de Brasília onde receberam água e comida *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 horas.

As normas éticas para pesquisa científica com animais de laboratório, definidas pela Lei nº 6638 de 8 de maio de 1979 foram atendidas no desenvolvimento desta pesquisa. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

#### 4. 1 Fluido Magnético Estabilizado por Citrato

A amostra de fluido magnético utilizada nos testes biológicos foi sintetizada e autoclavada pela professora Emília Lima do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás e gentilmente cedida para os testes biológicos.

As nanopartículas de maghemita foram sintetizadas por co-precipitação de Fe (II) e Fe (III) em meio alcalino e, em seguida, estabilizadas por citrato. O pH foi ajustado para 7,0 e a salinidade para 0,9% para promover a biocompatibilidade (Morais et al., 2005), após o que foi autoclavada para proceder à sua esterilização. A concentração da amostra era  $5,2 \times 10^{16}$  partículas/cm<sup>3</sup> (concentração de ferro de 23,45 mg/mL) para todos os testes realizados, exceto para o teste de viabilidade celular em que a amostra tinha concentração de  $3,0 \times 10^{16}$  partículas/cm<sup>3</sup> (concentração de ferro 26 mg/mL).

A caracterização da amostra foi obtida por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para a realização da MET, a amostra MagheCi foi diluída 1:1000 (vol/vol) em solução salina 0,9% e em seguida foi colocada uma gota da amostra sobre uma telinha (200) previamente recoberta com Formvar. Após, aguardou-se aproximadamente 15 a 30 minutos para a secagem. No dia seguinte, a telinha contendo amostra foi visualizada em MET (JEOL 1011) e foram obtidas as fotomicrografias em aumento de 100.000×, 200.000× e 500.000×. Com o auxílio de software (Image Pro-Plus 5.1) foram mensuradas 260 nanopartículas e os dados

ajustados por distribuição log normal para obtenção do diâmetro modal da amostra MagheCi.

#### 4.2 Teste de Viabilidade Celular em Macrófagos Peritoneais

O teste de viabilidade celular consiste em verificar os efeitos da aplicação de drogas sobre o número de macrófagos vivos e mortos no peritônio de animais. Para a realização deste teste, os animais receberam injeção peritoneal com dose única contendo 50  $\mu\text{L}$  ( $1,5 \times 10^{15}$  partículas) de fluido magnético composto de nanopartículas ( $3,0 \times 10^{16}$  partículas/ $\text{cm}^3$ ) recobertas com citrato (n=5) ou solução salina 0.9% (n=5). Os tempos experimentais foram 6 , 12 , 24 e 48 horas e 7 dias após a administração de fluido magnético ou salina. Após, os animais foram colocados em recipiente contendo algodão embebido em éter etílico para proceder a sua eutanização.

Após eutanizado, foi feita uma incisão no abdômen do animal e 10 mL de solução gelada (4 °C) de cloreto de sódio tamponada com fosfato (PBS) foi injetada no peritônio com auxílio de uma seringa. Foram coletados 8 mL do lavado e este foi submetido à centrifugação (1000 rpm) por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de solução PBS gelado (4°C). Posteriormente, foi retirado 40  $\mu\text{L}$  do ressuspensado e acrescentado em 160  $\mu\text{L}$  de solução de nigrosina (0,05%), corante supravital do tipo aniônico que penetra nas células (Kückelhaus, 2003). Aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  do líquido foi colocado na câmara de Neubauer e a contagem foi feita nos 4 retículos externos com auxílio de microscópio de luz modelo Oleman (400  $\times$ ).

As células vivas foram identificadas por exclusão da nigrosina onde foram consideradas vivas as células que apresentavam coloração de amarelo brilhante e mortas aquelas cuja coloração era negra ou cinza. O número de macrófagos vivos foi calculado com auxílio da seguinte fórmula:

$$\text{Macrófagos vivos/mL} = n^{\circ} \text{ macrófagos vivos} / 4 \times 5 \times 10^4$$

Onde:

4= número de quadrantes

5 = fator de diluição

$10^4$  = profundidade da câmara.

Também foi calculada a porcentagem de macrófagos mortos presentes no lavado peritoneal em relação ao total.

Para a análise estatística, os dados foram normalizados ( $\log_{10}$ ) para utilização do teste de Scheffe (ANOVA), com  $p \leq 0,05$ .

#### 4.3 Contagem de Leucócitos do Sangue

O teste de contagem de leucócitos do sangue é utilizado para verificar possíveis alterações no número de leucócitos decorrentes da aplicação de drogas.

Os animais experimentais receberam injeção endovenosa caudal de dose única contendo 50  $\mu\text{L}$  ( $2,6 \times 10^{15}$  partículas) da amostra MagheCi ( $n=5$ ). Os animais controle receberam igual volume de salina 0,9% ( $n=5$ ) ou não receberam tratamento algum ( $n=5$ ).

Os tempos de tratamento foram os seguintes: 6, 12, 24 e 48 horas e 7 dias. Após o período da aplicação da amostra, os animais foram eutanizados com éter etílico, como descrito acima. Aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  de sangue foram coletados por punção cardíaca com auxílio de uma seringa de 1 mL, previamente lavada com ácido dipotássico etilenoaminotetracético (EDTA) na concentração de 0,2 g/mL.

Imediatamente após a coleta, foi feito esfregaço sanguíneo (duplicata) em lâmina de vidro. O restante do sangue foi colocado em Ependorff contendo 10  $\mu\text{L}$  de EDTA e homogeneizado lentamente por inversão do tubo.

Para a contagem global de leucócitos (CGL), 20  $\mu\text{L}$  de sangue foram diluídos em 400  $\mu\text{L}$  de solução de Turke (diluição 1:21), a fim de se promover a lise celular dos eritrócitos e plaquetas. O líquido foi homogeneizado lentamente por inversão durante dois minutos. Posteriormente, 10  $\mu\text{L}$  do homogeneizado foram colocados em hemocítmetro de Neubauer e aguardou-se um minuto para sedimentação. Em seguida foi realizada CGL em quatro retículos externos do hemocítmetro, ao microscópio de luz modelo Olemann (400 $\times$ ). Os resultados foram anotados e posteriormente foi calculado o número de leucócitos/ $\text{mm}^3$  com auxílio da seguinte fórmula:

Número de leucócitos/mm<sup>3</sup> = n°. leucócitos/mm<sup>3</sup>/4 × profundidade câmara × diluição

Após secas ao ar e em temperatura ambiente, as lâminas de esfregaço sanguíneo foram fixadas por cinco minutos em metanol, coradas por Wright-Giemsa e analisadas, em teste cego, ao microscópio de luz modelo Oleman (1000×). Quinhentas células foram contadas, anotando-se o número de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos encontrados. Posteriormente, foi calculada a proporção destas células (valor relativo) em relação ao número de leucócitos totais utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{CGL} \times \text{n}^\circ \text{ de linfócitos ou monócitos ou neutrófilos ou eosinófilos} / 500$$

Para a análise estatística dos dados encontrados na contagem diferencial de leucócitos foi aplicado teste de Fisher (ANOVA), com  $p \leq 0,05$ .

#### 4.4. Teste de Micronúcleo e % EPC em Eritrócitos da Medula Óssea

O teste de micronúcleo e % EPC foram utilizados para verificar a atividade genotóxica e citotóxica, respectivamente, dos eritrócitos da medula óssea dos animais submetidos ao tratamento de MagheCi.

Para a realização deste teste foram utilizados três grupos experimentais: animais tratados (n=5) com dose única contendo 50 µL da amostra MagheCi ( $2,6 \times 10^{15}$  partículas), animais controles negativos (n=5) tratados com salina 0,9% e animais controles positivos (n=5) tratados com ciclofosfamida (40 mg/kg). Os animais foram eutanizados nos seguintes tempos após a administração: 24 horas, 48 horas e 7 dias.

Posteriormente à eutanização, os fêmures dos animais foram removidos e as epífises cortadas. Em seguida, foi feita a lavagem das células da medula utilizando 1 mL de soro fetal bovino e o conteúdo foi coletado em tubo Falcon. Este foi submetido à centrifugação (1000 rpm) por 5 minutos em temperatura ambiente.

Com o auxílio de uma pipeta, foram retirados 50 µL do sobrenadante e o restante foi descartado. O centrifugado foi ressuscitado e aproximadamente 10 µL de solução foi colocada em lâmina de vidro. O esfregaço foi feito em duplicata e as lâminas colocadas para secar ao ar em temperatura ambiente. Após a secagem, estas foram fixadas em metanol por 5 minutos e, após secas ao ar, foram coradas com Giemsa.

A contagem de eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) e do número de micronúcleos (MN) em cada tipo celular foi realizada em microscópio de luz modelo Oleman (1000×), em teste cego. Neste teste foram contados 2000 eritrócitos policromáticos e 2000 normocromáticos de cada animal e anotado o número de micronúcleos encontrados em cada tipo celular.

Para a análise da citotoxicidade foi calculada a proporção de EPC com auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ EPC} = [\text{EPC} / (\text{EPC} + \text{ENC})] \times 100$$

Para a análise estatística foi utilizado teste não paramétrico Mann-Whitney, com  $p \leq 0,05$ .

#### 4.5 Análise Histológica

A análise histológica consiste na avaliação das secções histológicas obtidas dos órgãos a fim de se verificar possíveis alterações provocadas pelo tratamento, tais como presença de infiltrado inflamatório, espessamento, necrose e apoptose celular, entre outros.

Para a análise histológica, os animais foram divididos em três grupos experimentais, tendo sido coletados os órgãos nos seguintes tempos: 6, 12, 24 e 48 horas e 7 dias.

Os animais tratados (n=3) receberam dose única na veia caudal contendo 50 µL da amostra MagheCi ( $2,6 \times 10^{15}$  partículas) e os animais controle (n=3) receberam 50 µL de salina 0,9% (n=3) ou não receberam tratamento algum (n=3).

Para proceder-se a análise histológica, os animais foram eutanizados como já citado acima, a cavidade abdominal foi exposta e o fígado, pulmões, baço e rins foram coletados com auxílio de material cirúrgico. Imediatamente após a coleta, os

órgãos foram lavados em solução salina 0,9% para retirar o excesso de sangue e os fragmentos retirados com auxílio de lâmina de bisturi.

Os fragmentos foram colocados em fixador de Davidson em diluição 1:10 (vol/vol) a fim de se promover sua fixação e mantidos a 4°C por 12 horas. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para solução de álcool anidro hidratado (99,3°) 70% (vol/vol) e armazenados a 4°C até a realização dos demais procedimentos.

Para a desidratação, os fragmentos dos órgãos foram transferidos para gradiente crescente de concentração de álcool anidro hidratado (99,3°). Após 1 hora em álcool 80% (vol/vol) este foi transferido para álcool 90% (vol/vol) onde permaneceu durante 1 hora. Em seguida, este foi transferido para álcool anidro hidratado 100% no qual permaneceu durante dois banhos de 1 hora cada um. Em seguida, os fragmentos foram diafanizados em solução de álcool anidro hidratado e xileno em diluição 1:1 (vol/vol) por 1 hora. Após, foram realizados 3 banhos em xileno com intervalo de 1 hora cada um.

Posteriormente, os fragmentos dos órgãos foram transferidos para parafina purificada (Proquímica) em estufa a 56 °C e submetidos a 3 banhos em parafina com duração de 1 hora cada um. Ao término do terceiro banho, os fragmentos dos órgãos foram emblocados em parafina com auxílio de formas de metal (3cm × 3cm) nas quais permaneceu até que a parafina estivesse completamente endurecida.

Para a secção dos órgãos foi utilizado micrótomo modelo Leica RM2125RT por meio do qual foram obtidos cortes (semi-seriados) de 5 µm de espessura. Após desbaste da parafina, foram feitas secções as quais foram distendidas em banho-maria (35°C). Estas foram coletadas com auxílio de um pincel em lâminas de vidro previamente identificadas. As secções dos órgãos foram obtidas da seguinte maneira: inicialmente, foram coletadas três lâminas sendo, em seguida, descartadas 10 secções. Após, mais secções foram coletadas para produzir 3 lâminas. Posteriormente, descartou-se mais 10 secções e procedeu-se à coleta de secções em mais 3 lâminas, totalizando 9 lâminas, em três planos diferentes.

Após montagem das lâminas, estas foram submetidas à estufa (37 °C) até que a aderência da secção à lâmina estivesse completa. Em seguida, foi feita a coloração com técnica de hematoxilina e eosina (HE) em três lâminas (uma de cada plano de corte) para visualização do citoplasma e núcleo.

Para visualização do ferro (endógeno e exógeno) foi utilizado o método de coloração de Perls que consiste em uma solução composta de 50% de ácido clorídrico (1%) e 50% de ferrocianeto de potássio (2%) seguida de coloração de vermelho rápido nuclear para visualização do núcleo celular. Neste método foram coradas 3 lâminas (uma de cada plano de corte) sendo as demais lâminas armazenadas para eventuais necessidades.

A fim de se quantificar os agregados de ferro observados nas secções histológicas foi estabelecido o seguinte critério: uma cruz (+) para pequena quantidade de agregados; duas cruzes (++) para quantidade média e três cruzes (+++) para grande quantidade.

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz modelo Oleman (100×, 200× ou 400×), verificando-se as alterações teciduais e presença de aglomerados de NPM. Em seguida, os cortes foram fotografados com auxílio de uma câmera fotográfica (MC 80 DX) acoplada ao microscópio Zeiss (Axioskop 2) em aumento de 100×, 400× ou 1000×. Em seguida, as fotografias foram digitalizadas e as pranchas montadas.

## **5. RESULTADOS**

A caracterização das NPM da amostra MagheCi e os testes realizados em camundongos fêmeas Swiss, tais como viabilidade celular, contagem de leucócitos do sangue, teste de MN e % EPC e análise histológica tiveram os resultados descritos a seguir, representados nas figuras 1 a 19 e detalhados nos anexos 1 a 6.

### 5.1 Caracterização das Nanopartículas Magnéticas da Amostra MagheCi

O diâmetro médio das nanopartículas de maghemita recobertas com citrato (MagheCi) foi determinado por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), com auxílio do programa Image Pro-Plus 5.1. Uma fotomicrografia obtida pela MET está apresentada na figura (1).

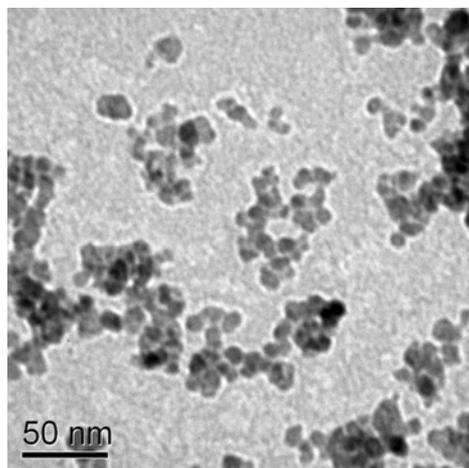


Figura 1- Fotomicrografia das NPM de maghemita recobertas com citrato da amostra MagheCi, obtida em MET com aumento de 500 000× (MET realizada por Débora de Oliveira Cintra e Silva).

A distribuição log normal dos diâmetros obtidos pela MET mostrou que as nanopartículas magnéticas da amostra MagheCi possuem um diâmetro modal de 10.0 nm e desvio padrão de 0.27nm, conforme apresentado na figura 2.

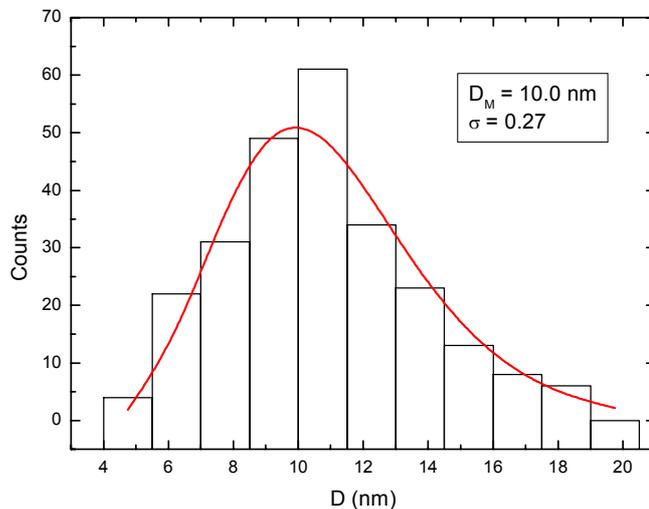


Figura 2 - Histograma do diâmetro modal das nanopartículas magnéticas recobertas com citrato da amostra MagheCi. A linha contínua representa o melhor ajuste dos dados (ajuste realizado por Marcos Tiago de Amaral e Elói)

## 5.2 Viabilidade Celular em Macrófagos Peritoneais

No teste de viabilidade celular, cuja finalidade é avaliar o índice de macrófagos peritoneais vivos quando em contato com as NPM da amostra MagheCi, observou-se uma ligeira diminuição no índice de macrófagos vivos e concomitante aumento nos macrófagos mortos. A alteração foi mais proeminente nas células coletadas 24 horas após a administração intraperitoneal do FM. Entretanto, não houve diferença estatística significativa em qualquer das observações realizadas de 6 horas até 7 dias após o tratamento, quando comparados ao grupo salina. Os resultados estão apresentados na figura 3 (ver anexos 1 e 2).

### Viabilidade de macrófagos do peritônio

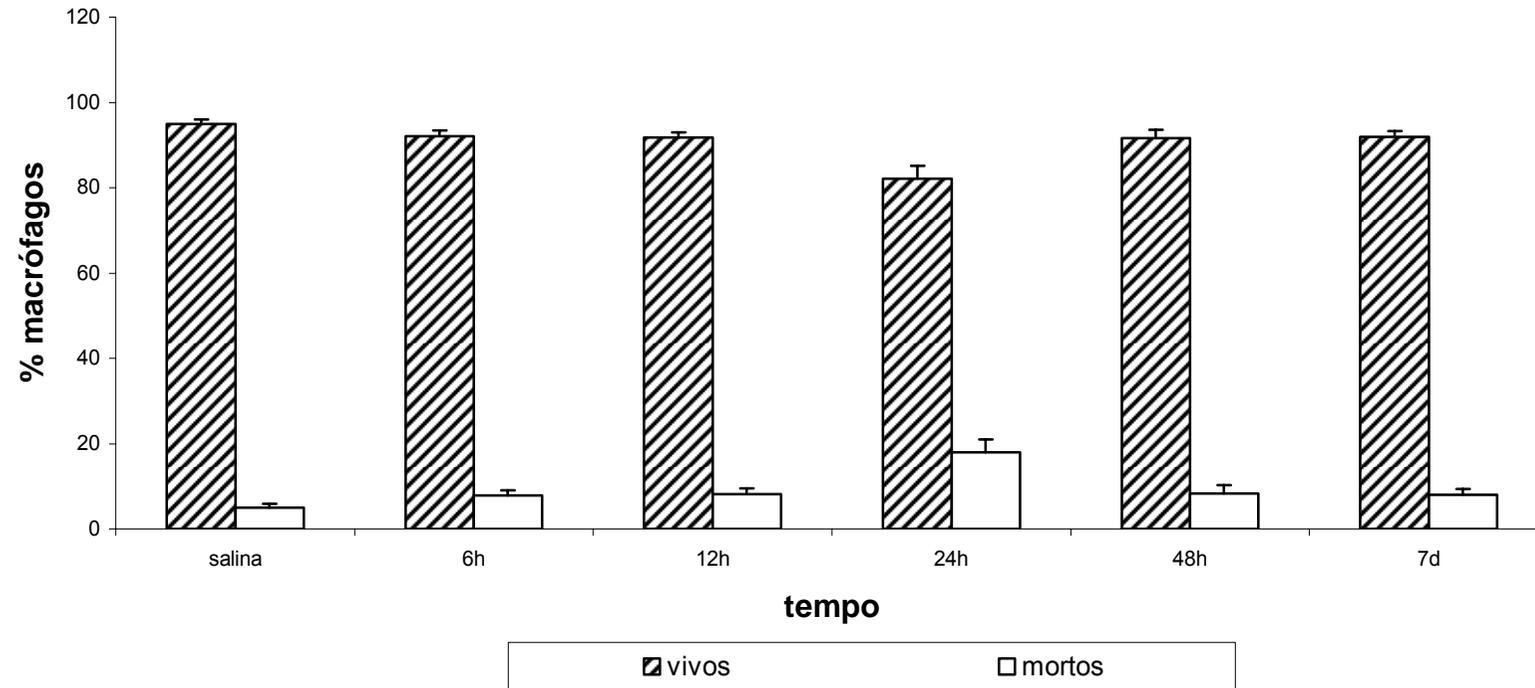


Figura 3 - Efeito da administração intraperitoneal de MagheCi ( $1,5 \times 10^{15}$  partículas) sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais em camundongos fêmeas Swiss em tempos que variavam entre 6 horas a 7 dias. A barra representa o erro padrão da média; S= grupo salina (0,9%)

### 5.3 Contagem de Leucócitos em Sangue

Na contagem de leucócitos após administração da MagheCi foi observada ligeira diminuição na contagem global em todos os tempos experimentais. Esta diminuição, entretanto, não foi estatisticamente significativa para nenhum dos grupos experimentais até 7 dias após o tratamento, exceto no grupo em que a coleta foi realizada 6 horas após a injeção da MagheCi, como mostrado na figura 4.

Para maior detalhes, ver anexos 3 e 4.

### Contagem Global de Leucócitos

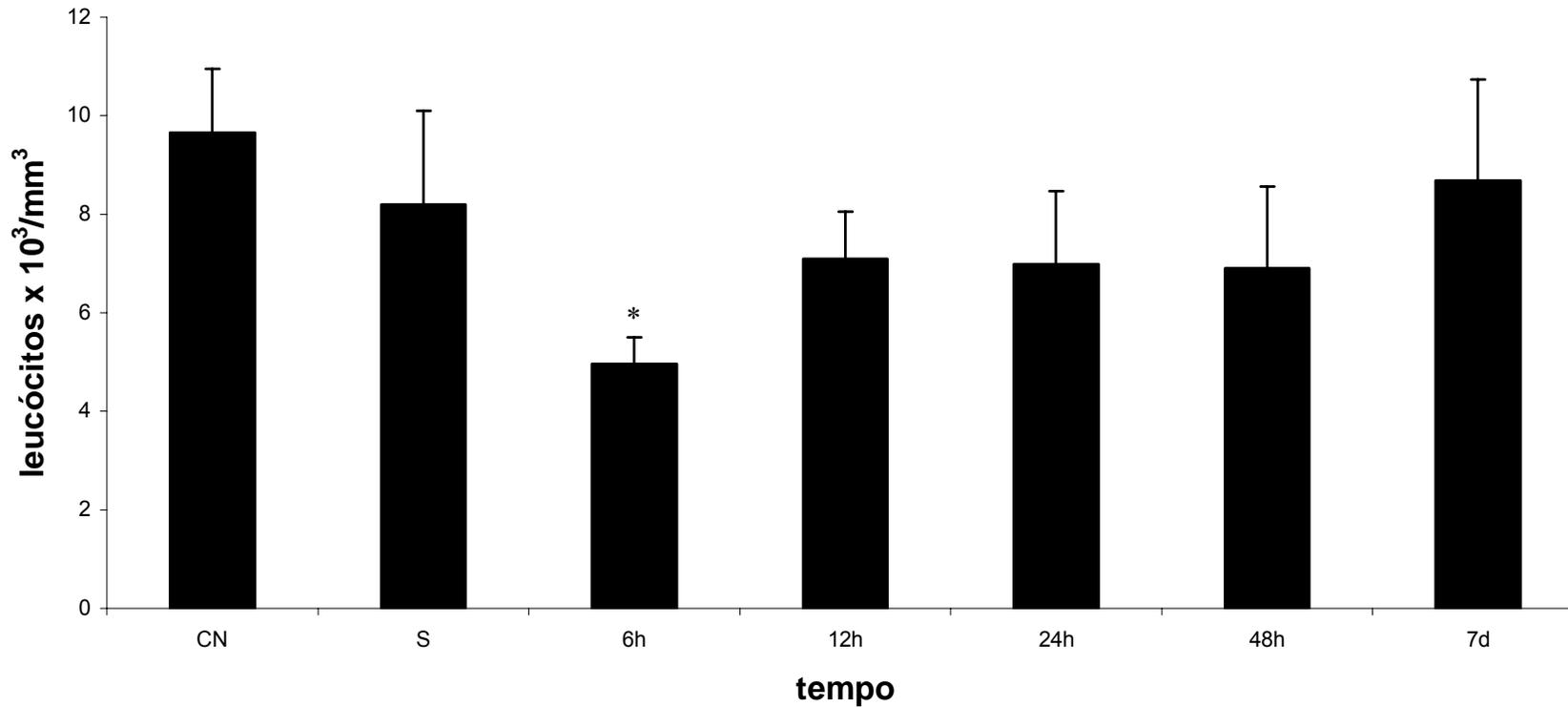


Figura 4: Efeito da administração endovenosa de MagheCi ( $2,6 \times 10^{15}$  partículas) sobre a contagem global de leucócitos em camundongos fêmeas Swiss em tempos que variavam entre 6 horas e 7 dias. A barra representa o erro padrão da média. CN= grupo controle negativo; S= grupo salina (0,9%); \*-diferença estatística significativa em relação ao grupo salina ( $p < 0,05$ )

Os resultados obtidos na contagem diferencial de leucócitos após a administração de MagheCi mostraram diminuição significativa na população de monócitos dos grupos 6 horas e 7 dias, em relação ao grupo controle negativo ( $p = 0,0402$  e  $0,0465$ , respectivamente), o mesmo ocorrendo para o grupo salina (ver anexo 4). Entretanto, este resultado não foi observado em nenhum dos grupos tratados quando comparados ao grupo salina. Os resultados estão representados na figura 5.

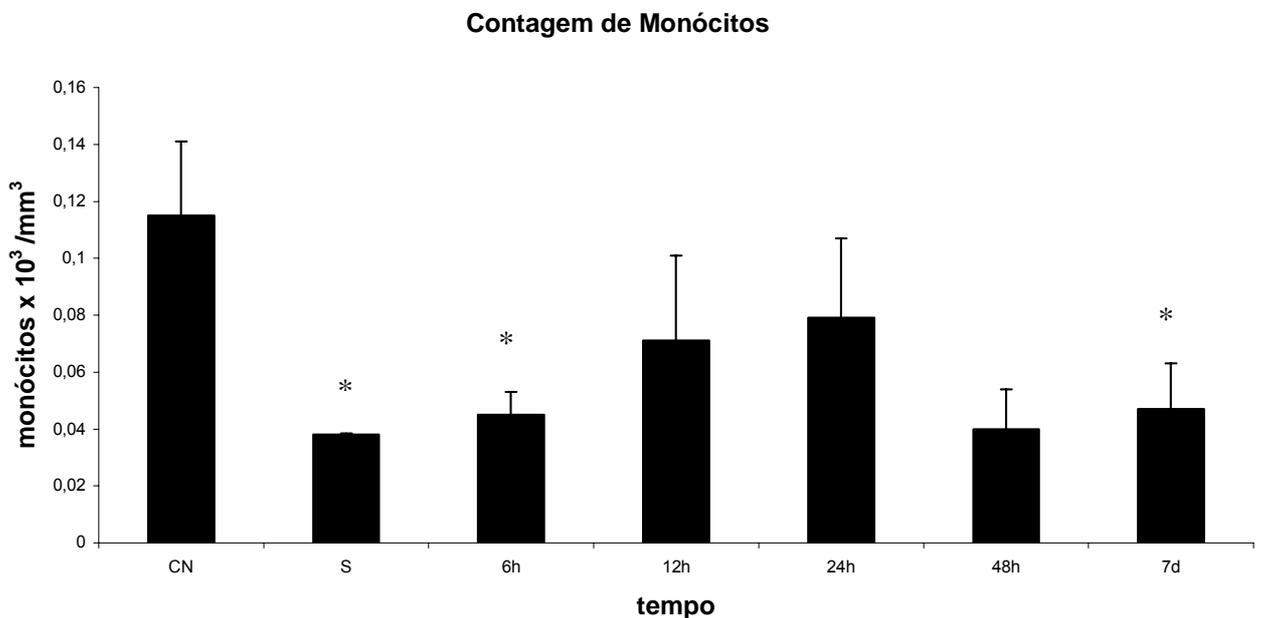


Figura 5 - Efeito da administração endovenosa de MagheCi ( $2,6 \times 10^{15}$  partículas) sobre a contagem de monócitos em camundongos fêmeas Swiss em tempos que variavam de 6 horas a 7 dias. A barra representa o erro padrão da média. CN= grupo controle negativo; S= grupo salina (0,9%); \* - estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ )

Quanto aos linfócitos, foi observada ligeira diminuição com aparente recuperação da população 7 dias após o tratamento com MagheCi em todos os grupos. Entretanto, esta diminuição não foi estatisticamente significativa, exceto para o grupo 6 horas (ver anexo 4). Os resultados estão apresentados na figura 6.

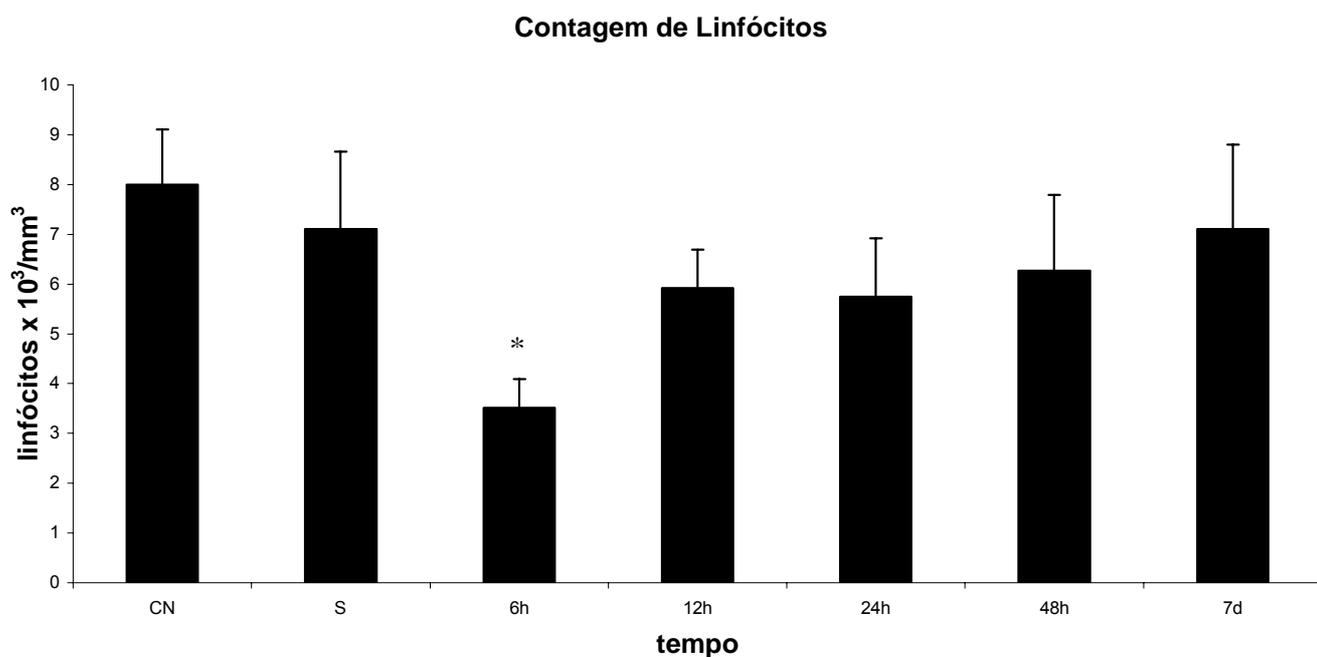


Figura 6 - Efeito da administração endovenosa de MagheCi ( $2,6 \times 10^{15}$  partículas) sobre a contagem de linfócitos em camundongos fêmeas Swiss em tempos que variavam de 6 horas a 7 dias. A barra representa o erro padrão da média. CN= grupo controle negativo; S= grupo salina (0,9%); \* - estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ )

Para os demais tipos celulares (neutrófilos e eosinófilos) não foram observadas alterações significativas. Os resultados da contagem diferencial de leucócitos, estão apresentados na figura 7 e anexos 3 e 4.

### Contagem Diferencial de Leucócitos

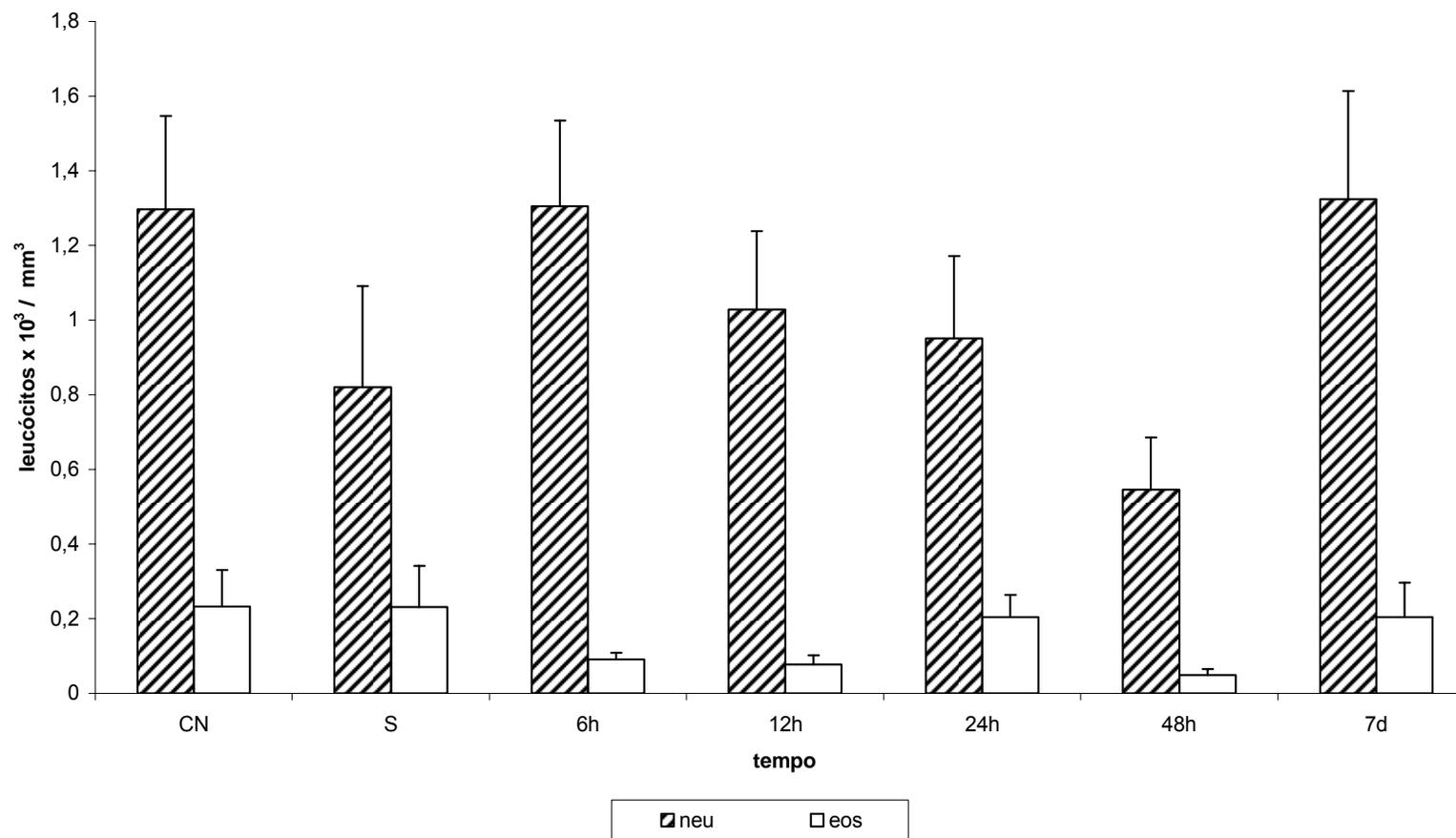


Figura 7 - Efeito da administração endovenosa de MagheCi ( $2,6 \times 10^{15}$  partículas) sobre a contagem diferencial de leucócitos em camundongos fêmeas Swiss em tempos variando de 6 horas a 7 dias. A barra representa o erro padrão da média; CN= grupo controle negativo; S= grupo salina (0,9%). neu. – neutrófilos; eos. - eosinófilos.

#### 5.4 Teste de Micronúcleo e % EPC em Eritrócitos da Medula Óssea

No que se refere aos resultados de genotoxicidade da amostra MagheCi sobre os eritrócitos da medula óssea de camundongos fêmeas Swiss, a figura 8 mostra que não houve alteração no número de micronúcleo nos eritrócitos policromáticos dos animais tratados, quando comparados aos animais do grupo salina. O número de MN observado nos animais tratados com ciclofosfamida (40mg/Kg) foi, em média, próximo a 50, mostrando a resposta ao agente clastogênico. Os resultados estão apresentados na figura 8. Para maiores detalhes, ver anexos 5 e 6.

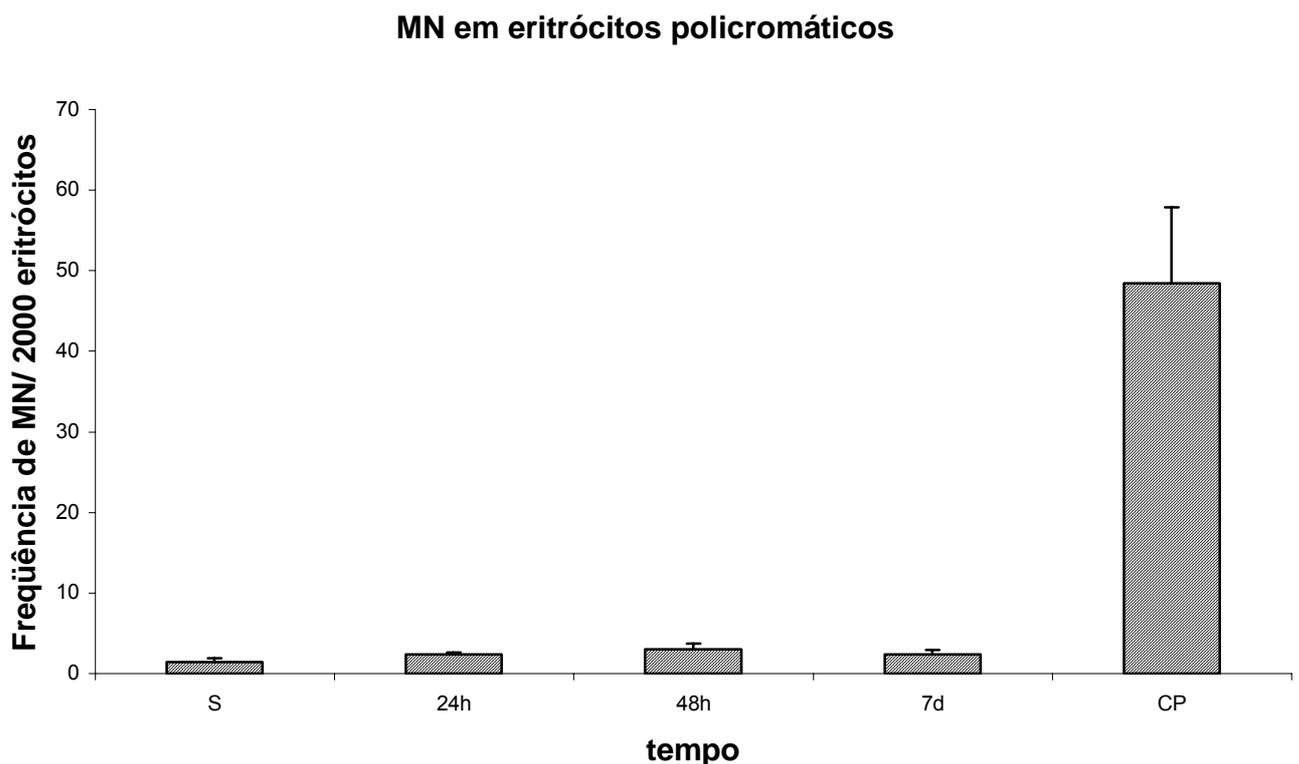


Figura 8 - Efeito da administração endovenosa de MagheCi ( $2,6 \times 10^{15}$  partículas) sobre o número de MN em eritrócitos policromáticos em camundongos fêmeas Swiss em função do tratamento. A barra representa o erro padrão da média. CP= grupo controle positivo (ciclofosfamida 40mg/kg); S= grupo salina (0,9%)

Quanto aos eritrócitos normocromáticos não houve alteração no número de MN de 24 horas até 7 dias da administração de MagheCi, exceto para os animais do grupo 48 horas (figura 9) onde foi constatado aumento estatisticamente significativo no número de micronúcleos, quando comparado aos animais do grupo salina (anexo 6). Esta diferença também foi constatada na comparação entre os grupos 48 horas e 7 dias. Com 7 dias, observa-se o retorno aos valores encontrados nos animais do grupo controle como mostrado na figura 9.

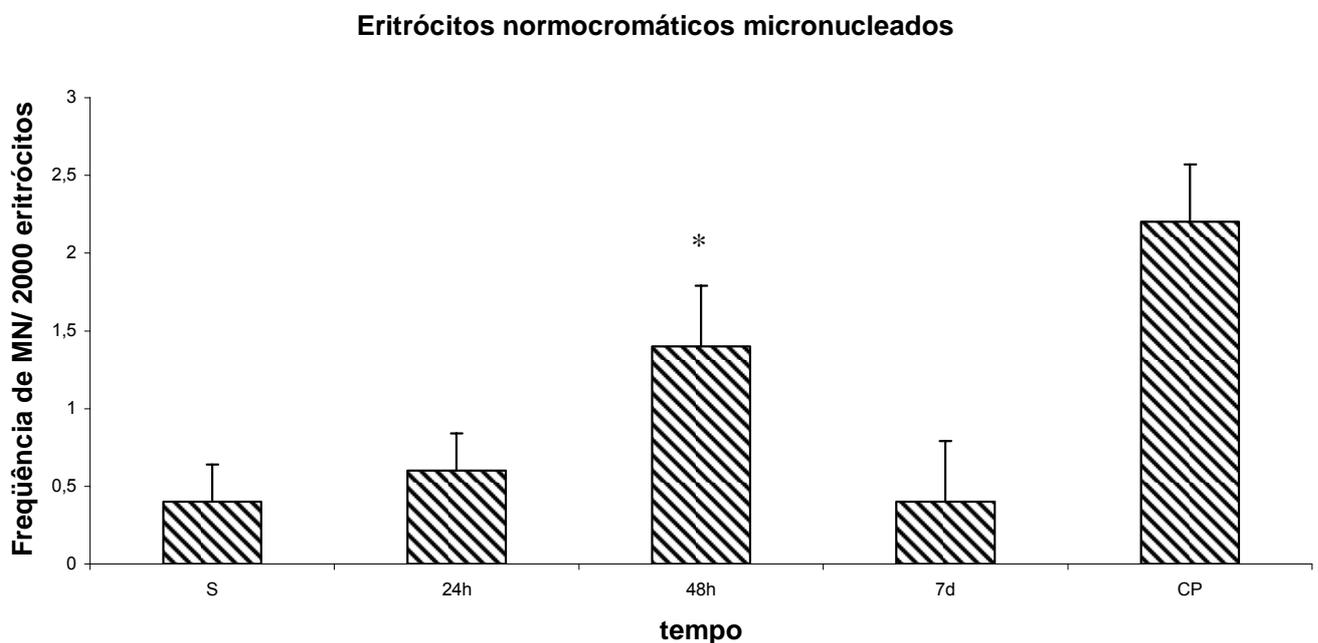


Figura 9 - Efeito da administração endovenosa de MagheCi ( $2,6 \times 10^{15}$  partículas) sobre o número de MN em eritrócitos normocromáticos em camundongos fêmeas Swiss em função do tratamento. A barra representa o erro padrão da média.

CP= grupo controle positivo (ciclofosfamida 40mg/kg); S= grupo salina (0,9%);

\* diferença significativa com relação ao grupo salina ( $p < 0,05$ ).

Nos eritrócitos normocromáticos o tratamento com ciclofosfamida aumentou ligeiramente o número de MN, se comparado ao seu efeito expressivo nos eritrócitos policromáticos (comparar figuras 8 e 9).

No que se refere aos resultados de citotoxicidade da amostra MagheCi, a figura 10 mostra que o índice de eritrócitos policromáticos (%EPC) apresenta ligeiro acréscimo 24 horas após a administração da amostra magnética, seguido de decréscimo nos tempos subseqüentes. Todas estas alterações, entretanto, não são estatisticamente diferentes dos resultados do grupo tratado com salina (anexo 6).

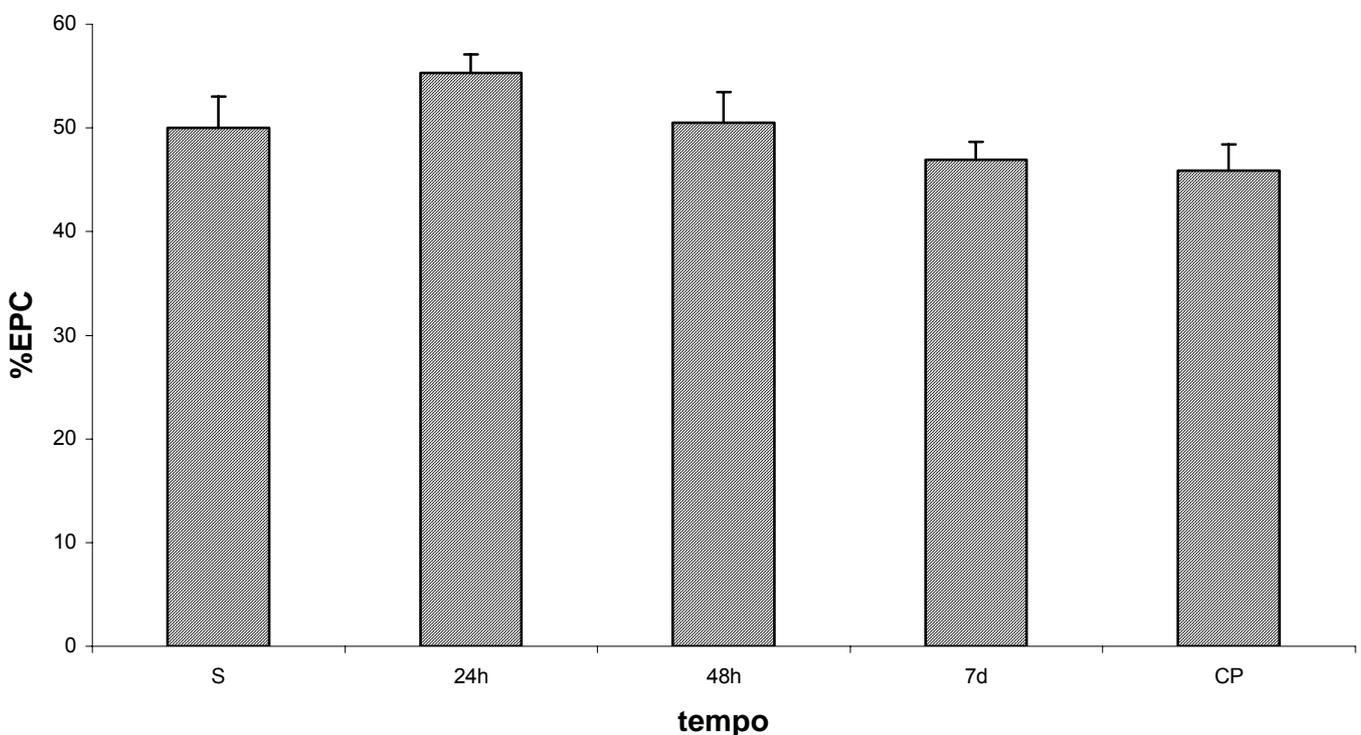


Figura 10 - Efeito da administração endovenosa de MagheCi ( $2,6 \times 10^{15}$  partículas) sobre o Índice de eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos fêmeas Swiss em função o tratamento. A barra representa o erro padrão da média.

CP= grupo controle positivo (ciclofosfamida 40mg/kg); S= grupo salina (0,9%)

### 5.5. Análise Histológica dos Órgãos

Os efeitos da amostra MagheCi foram também avaliados por análise histológica realizada nos órgãos pulmão, fígado, baço e rim, a partir de lâminas

coradas com hematoxilina e eosina (HE), para visualização do núcleo e citoplasma. Para visualizar agregados de ferro endógeno e exógeno (proveniente das NPM), foi utilizada a coloração de Perls juntamente com vermelho rápido nuclear, procedimento em que os núcleos celulares apresentam coloração vermelha forte, o citoplasma, cor rosa clara, enquanto os agregados de ferro apresentam coloração marrom dourada ou azul brilhante.

### 5.5.1 Pulmão

Os cortes de pulmão dos animais do grupo controle apresentam alvéolos com espessura regular, capilares exibindo calibre normal contendo hemácias, vasos e bronquíolos de aspecto e tamanho normais. Não foram observados agregados de coloração marrom ou azul, qualquer que tenha sido o corante utilizado, como mostrado na figura 11 a,b.

No pulmão dos animais tratados com MagheCi, a coloração por HE mostrou a presença de pequena quantidade de aglomerado de NPM em 6 horas (fig.11 c, d), 24 horas e 7 dias após a administração de MagheCi. Este era encontrado principalmente nos septos alveolares.

Em 12 horas após o tratamento foi observado infiltrado inflamatório (fig. 12 a) e presença de aglomerado de NPM (fig. 12 a,b) em quantidades maiores que nos demais grupos (+++). Os aglomerados foram visualizados principalmente em regiões próximas a vasos.

Os resultados da análise feita 24 horas após a administração de MagheCi mostrou a presença de aglomerados em pequena quantidade (não mostrado). Em um dos animais, entretanto, foi observada grande quantidade de aglomerados de NPM e presença de pequeno infiltrado ao redor de vasos sanguíneos (fig. 12 c). Neste grupo também foi observado espessamento alveolar (não mostrado) associado à presença de aglomerados de NPM.

Diferentemente dos demais grupos, em 48 horas foi observado pequena área hemorrágica (n=1). Entretanto, esta não estava associada à presença de aglomerados de NPM (não mostrado). No grupo 7 dias após a administração de MagheCi, pode-se observar a presença de NPM associada a infiltrado inflamatório em região de vaso sanguíneo (fig 13 a,b) . Da mesma forma que em

24 horas, neste grupo foi observado espessamento alveolar em uma região do pulmão dos animais tratados com MagheCi (fig 13 c).

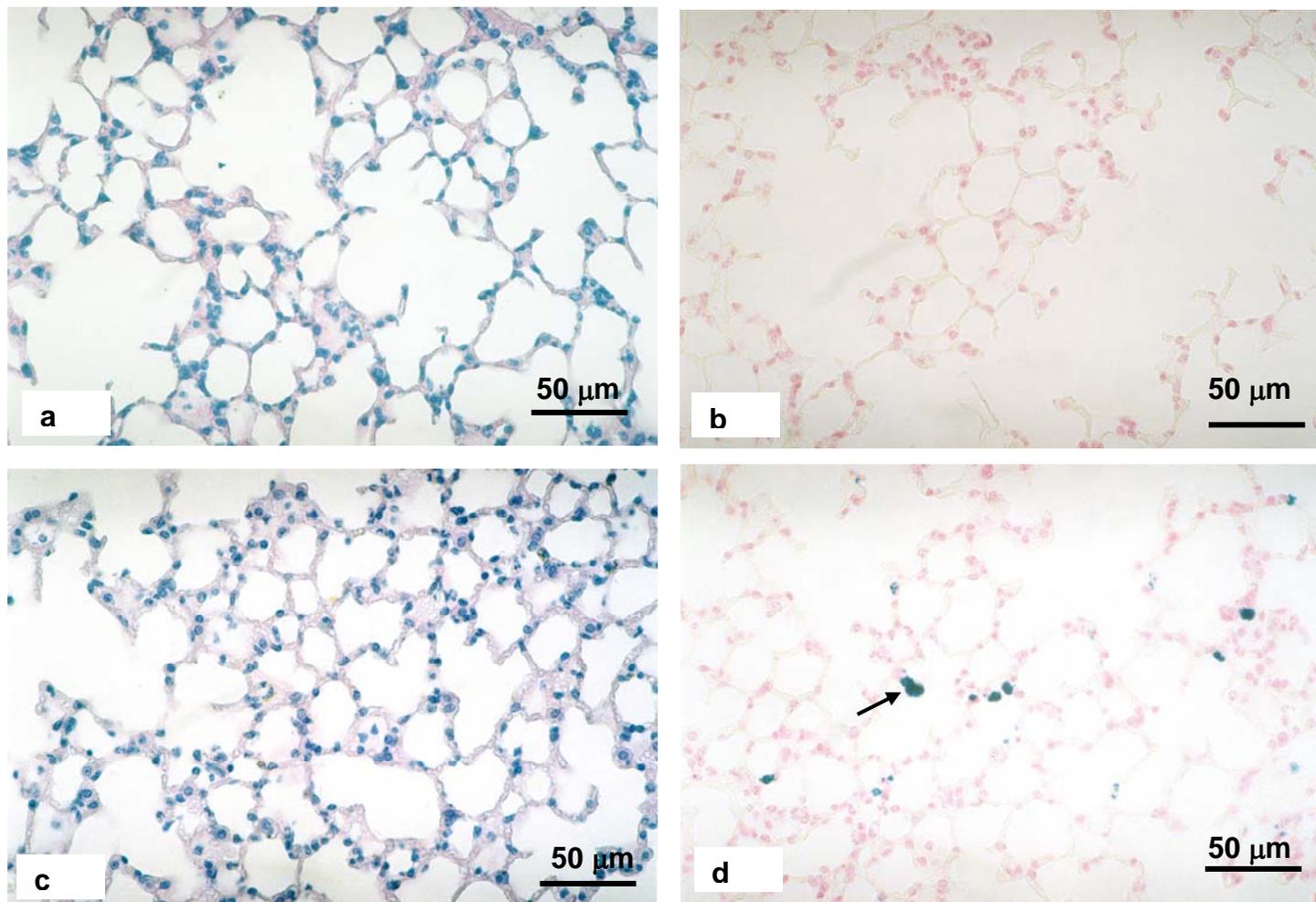


Figura 11 - Fotomicrografias de pulmão de animais controle (a e b) ou tratados com MagheCi durante 6 horas (c,d). Em a, c, método de coloração de HE; em b, d, método de coloração de Perls. A seta indica aglomerados de NPM.

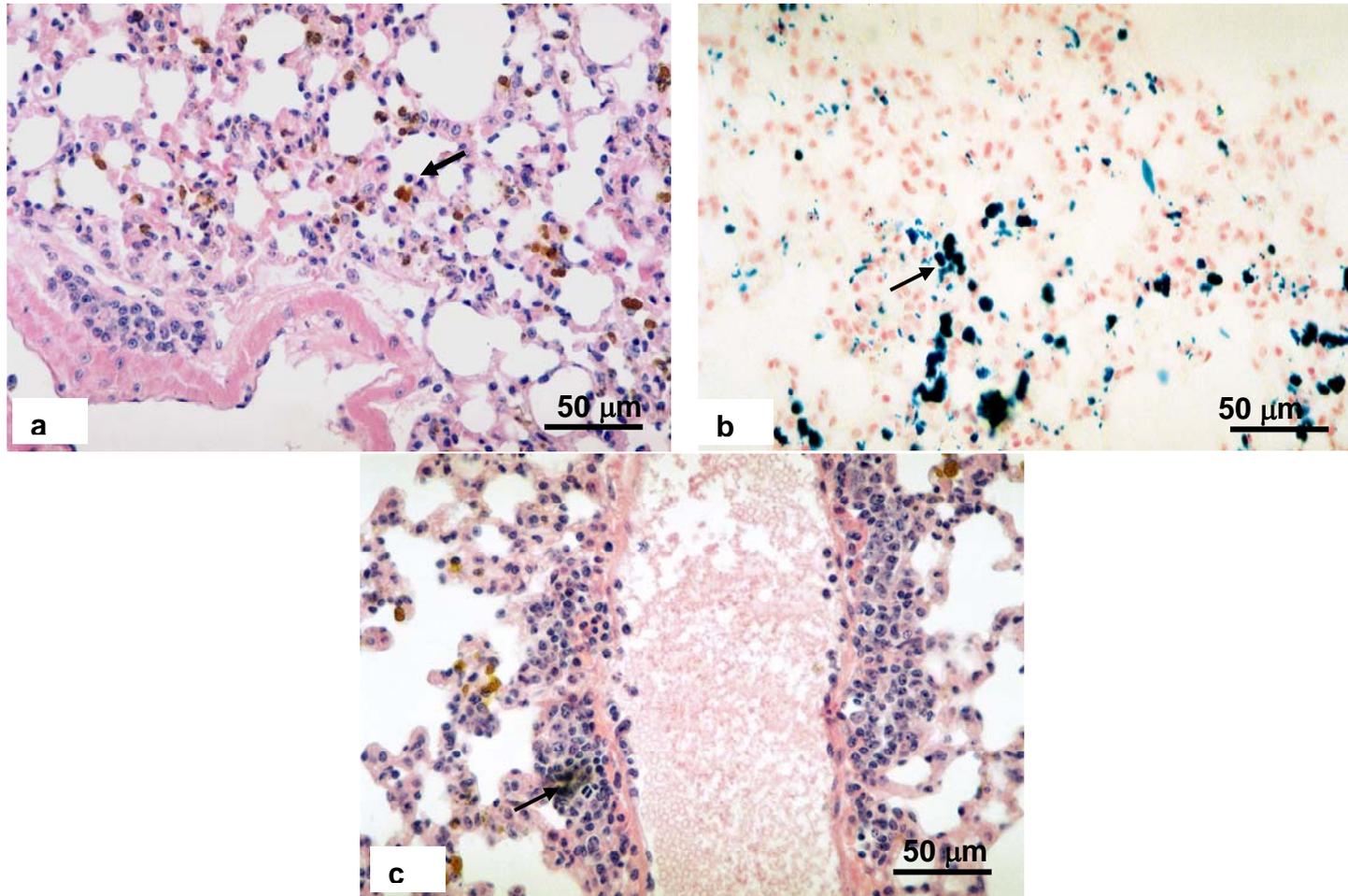


Figura 12 – Fotomicrografias de pulmão de animais tratados com MagheCi durante 12 horas (a,b) e 24 horas (c). As setas indicam presença de aglomerados de NPM. Em c, notar o infiltrado inflamatório em região próxima a vaso sanguíneo, juntamente com aglomerados de NPM. Em a,c, coloração por método HE; em b, coloração por método de Perls.

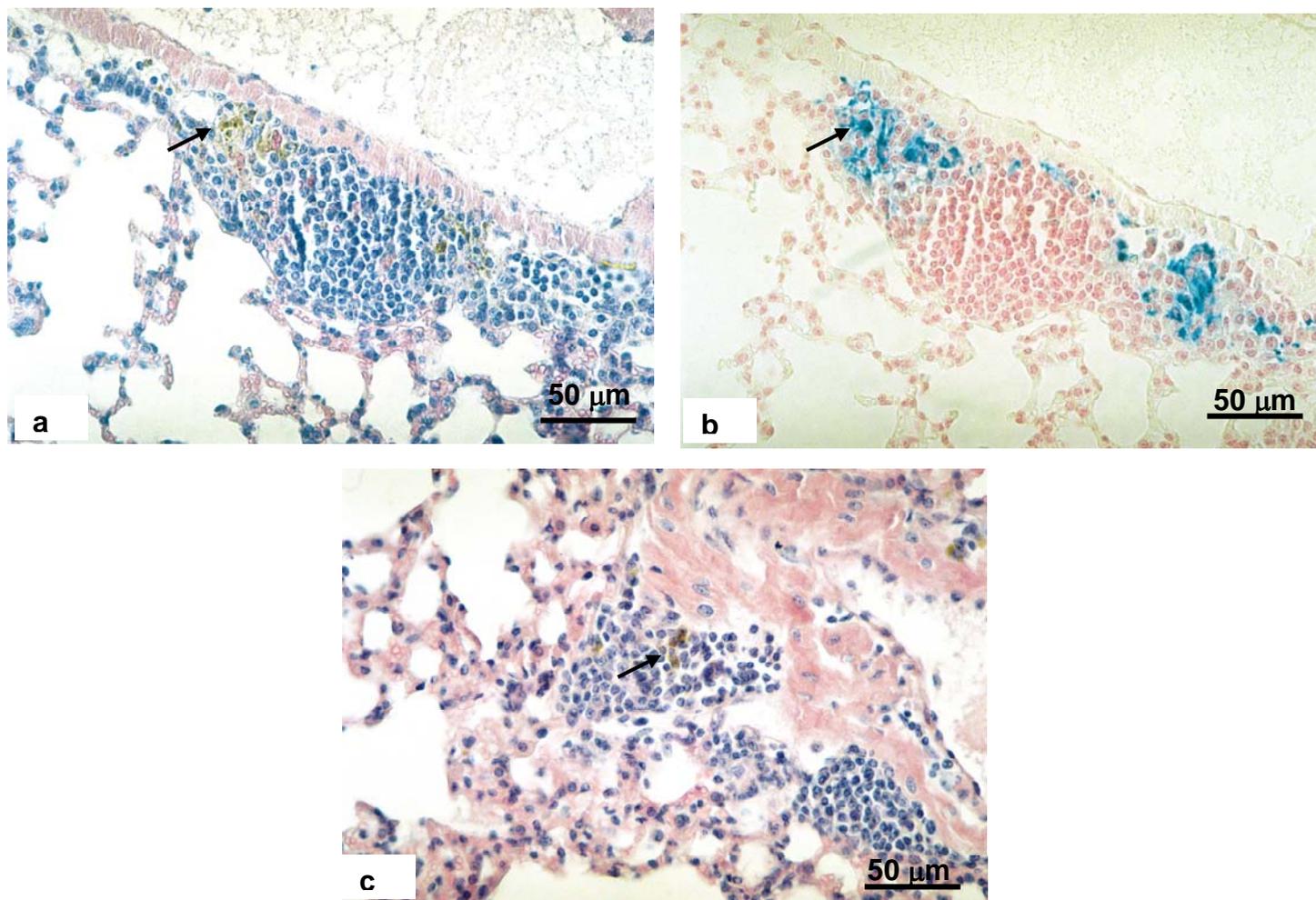


Figura 13: Fotomicrografias de pulmão de animais tratados com MagheCi durante 7 dias (a, b, c). As setas indicam presença de aglomerados de NPM. Em a, b e c, notar o infiltrado inflamatório em regiões próximas a vasos sanguíneos, juntamente com aglomerados de NPM. Observar o espessamento alveolar em c. Em a,c, coloração por método HE; em b, coloração por método de Perls.

### 5.5.2. Fígado

Os cortes histológicos de fígado dos animais do grupo controle apresentaram parênquima bem preservado com a cápsula de tecido conjuntivo íntegra, lóbulos de tamanho normal e células com núcleo e membrana bem definidos. Nestes não foram observados agregados de coloração marrom ou azul (fig.14 a,b).

Em 6 horas após a administração de MagheCi foi visualizada pequena quantidade de aglomerados de NPM (+). Neste grupo apenas um animal apresentou algumas regiões com infiltrado inflamatório ao redor de vasos (fig. 14 c, d), aparentemente não associados a aglomerados de NPM.

No grupo analisado 12 horas após a administração de MagheCi foi encontrada grande quantidade de aglomerados (+++) nos cortes do fígado que, mesmo assim, não apresentaram alterações histológicas. Os aglomerados de NPM estavam dispersos por todo o órgão (fig. 15 a, b, c).

Em 24 horas após a administração de MagheCi foi encontrada pequena quantidade (+) de aglomerados de NPM (fig. 15 d), embora um dos animais tenha apresentado grande quantidade de aglomerados de NPM (não mostrado).

Em 48 horas após a administração de MagheCi foi observada pequena quantidade de aglomerados de NPM (+), exceto em um animal que apresentou quantidade média (não mostrado). Também foi visualizado infiltrado inflamatório em um dos animais, entretanto este parecia não estar associado à presença de aglomerados de NPM (fig.16 a, b).

Da mesma forma que em 6, 24 e 48 horas, em 7 dias foi observada pequena quantidade (+) de aglomerados de NPM (fig. 16 c, d). Neste grupo, apenas um animal apresentou infiltrado inflamatório (não mostrado), sendo que os demais não mostraram qualquer alteração histológica.

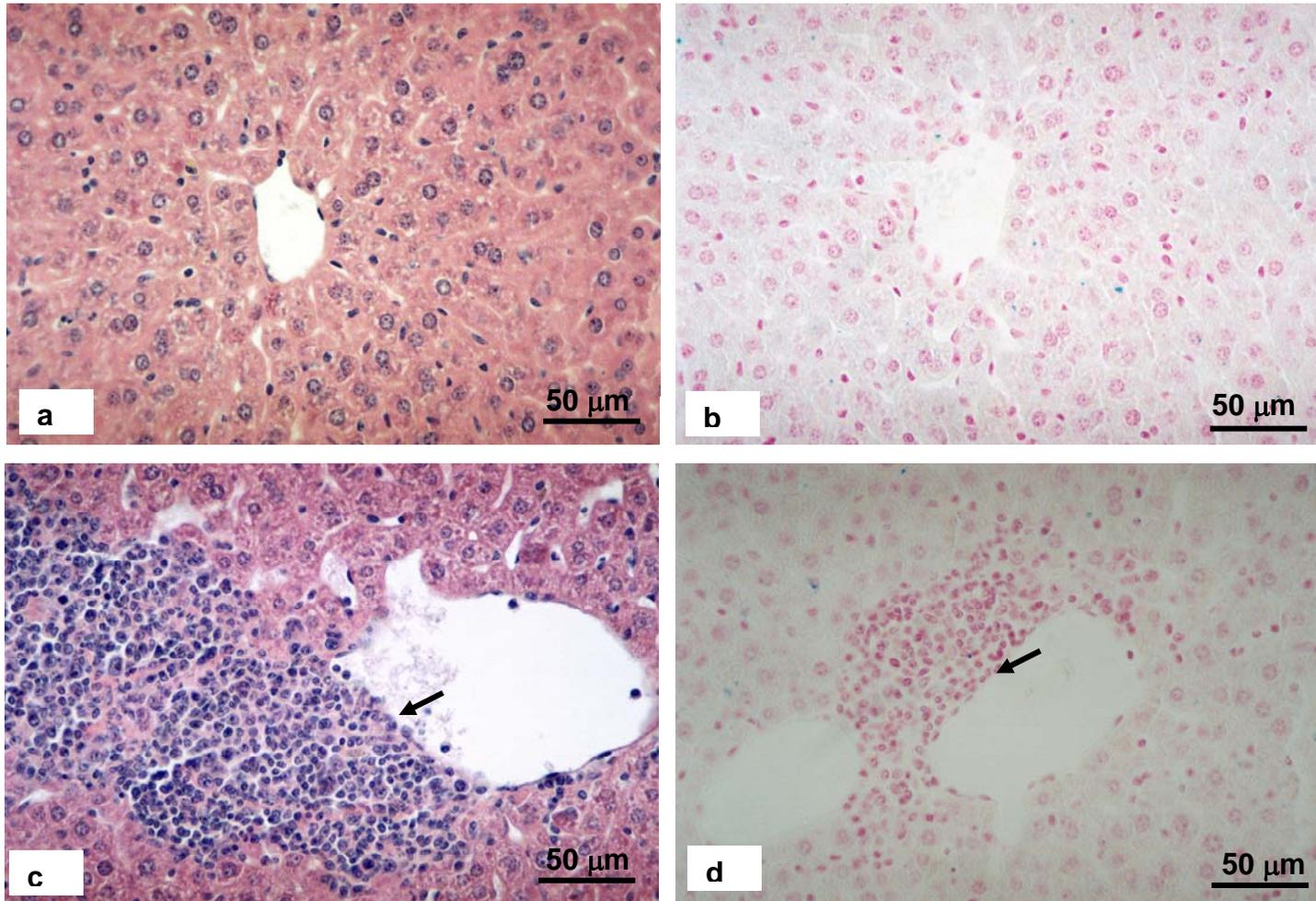


Figura 14 - Fotomicrografias de fígado de animal controle (a, b) e tratados 6 horas (c, d) com MagheCi. As setas indicam infiltrado inflamatório (c,d) . Em a, c, coloração por método HE; em b, d, coloração por método de Perls.

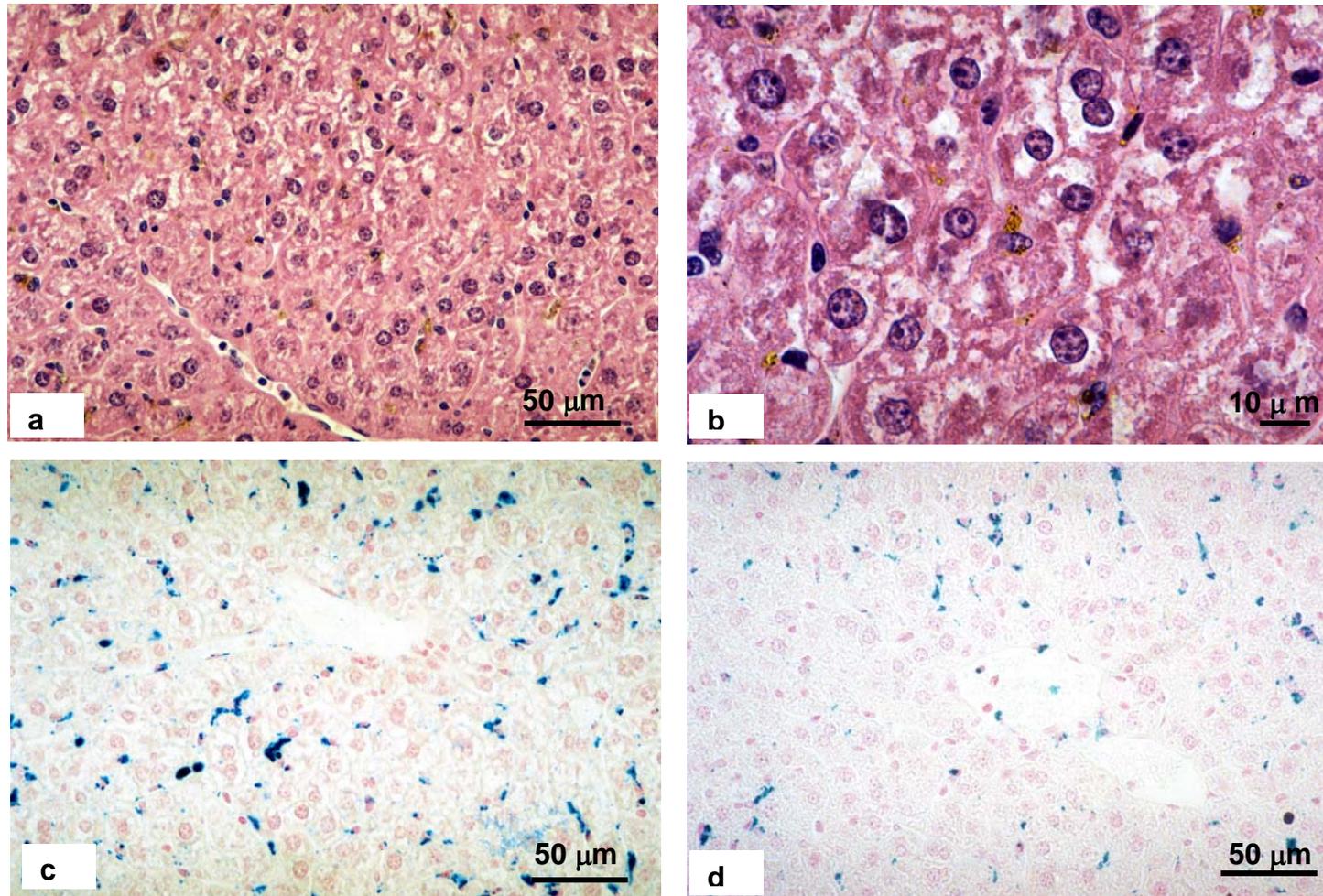


Figura 15: Fotomicrografias de animais tratados com MagheCi durante 12 horas (a, b, c) e 24 horas (d). Notar aglomerados de NPM dispersos por todo o órgão em grande (a, b, c) e pequena quantidade (d). Em a, b, coloração por método HE; em c, d, coloração por método de Perls.

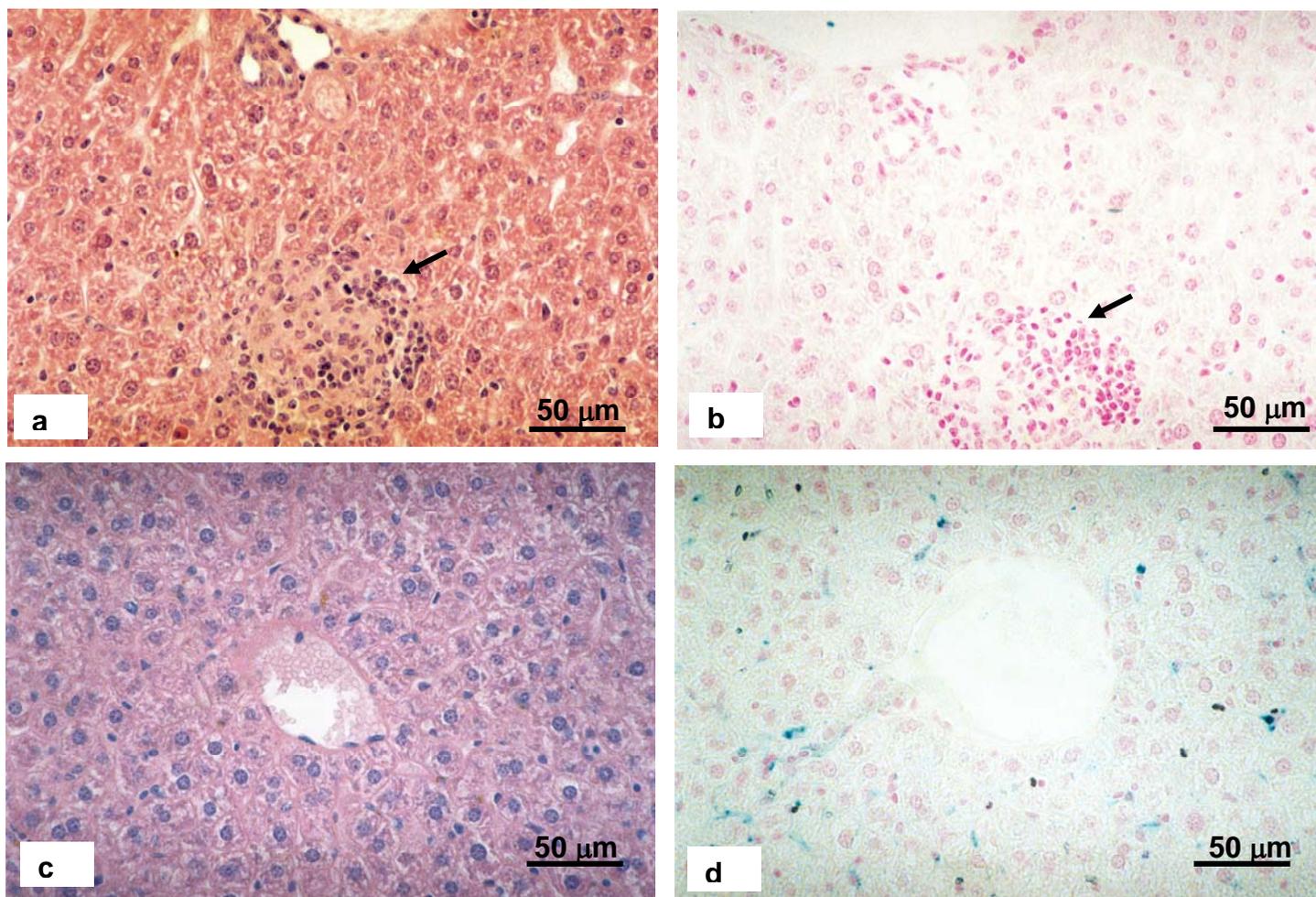


Figura 16: Fotomicrografias de fígado de animais tratados com MagheCi durante 48 horas (a,b) e 7 dias (c,d). Notar o infiltrado inflamatório (a, b) e ausência de aglomerados de NPM. Em a, c, coloração por método de HE; em b, d, coloração por método de Perls.

### 5.5.3 Baço

O baço dos animais do grupo controle não apresentou alterações histológicas. A polpa branca, constituída por nódulos linfáticos, foi claramente diferenciada da polpa vermelha, rica em glóbulos vermelhos. Diferentemente dos cortes do pulmão e fígado, na polpa vermelha foi observada quantidade variável de aglomerados de coloração marrom ou azul brilhante, conforme mostrado na figura 17 (a, b).

No baço de todos os animais tratados com MagheCi foi observada a presença de aglomerados de NPM sem quaisquer alterações histológicas. Entretanto, a quantidade de aglomerados de NPM variou entre os grupos tratados. Em 6 horas foi observada quantidade média (++) de aglomerados de NPM (fig. 17 c), o mesmo ocorrendo nos grupos analisados 24 horas após a administração de MagheCi. Diferentemente destes, em 12 horas, 48 horas e 7 dias após a administração da amostra foi observada grande quantidade (+++) de aglomerados de NPM (fig. 17 d), sendo que em alguns animais esta era visualizada tanto na polpa vermelha quanto na polpa branca do baço (não mostrado).

### 5.5.4 Rim

Os cortes histológicos do rim dos animais controle apresentaram zona cortical e medular de aspecto normal, com cápsula conjuntiva de espessura adequada. Os glomérulos, cápsula de Bowman e tubos também apresentaram aspecto normal (fig. 18 a, b). Entretanto, a pelve renal de alguns animais deste grupo apresentou infiltrado inflamatório próximo a vasos (não mostrado).

Assim como nos animais do grupo controle, a maioria dos animais dos grupos tratados apresentou infiltrado inflamatório na região da pelve renal. Na figura 18 (c, d) pode-se visualizar, entretanto, que estes normalmente não estavam associados à presença de aglomerados de NPM.

Aglomerados de NPM foram observados apenas nos grupos analisados 12 horas (fig. 19 a,d) e 24 horas (fig. 19 b,c) após a administração de MagheCi, principalmente dentro dos glomérulos. Nos animais destes grupos, porém, não

foram observadas quaisquer alterações histológicas, exceto o infiltrado inflamatório presente na pelve renal de alguns animais, como já mostrado.

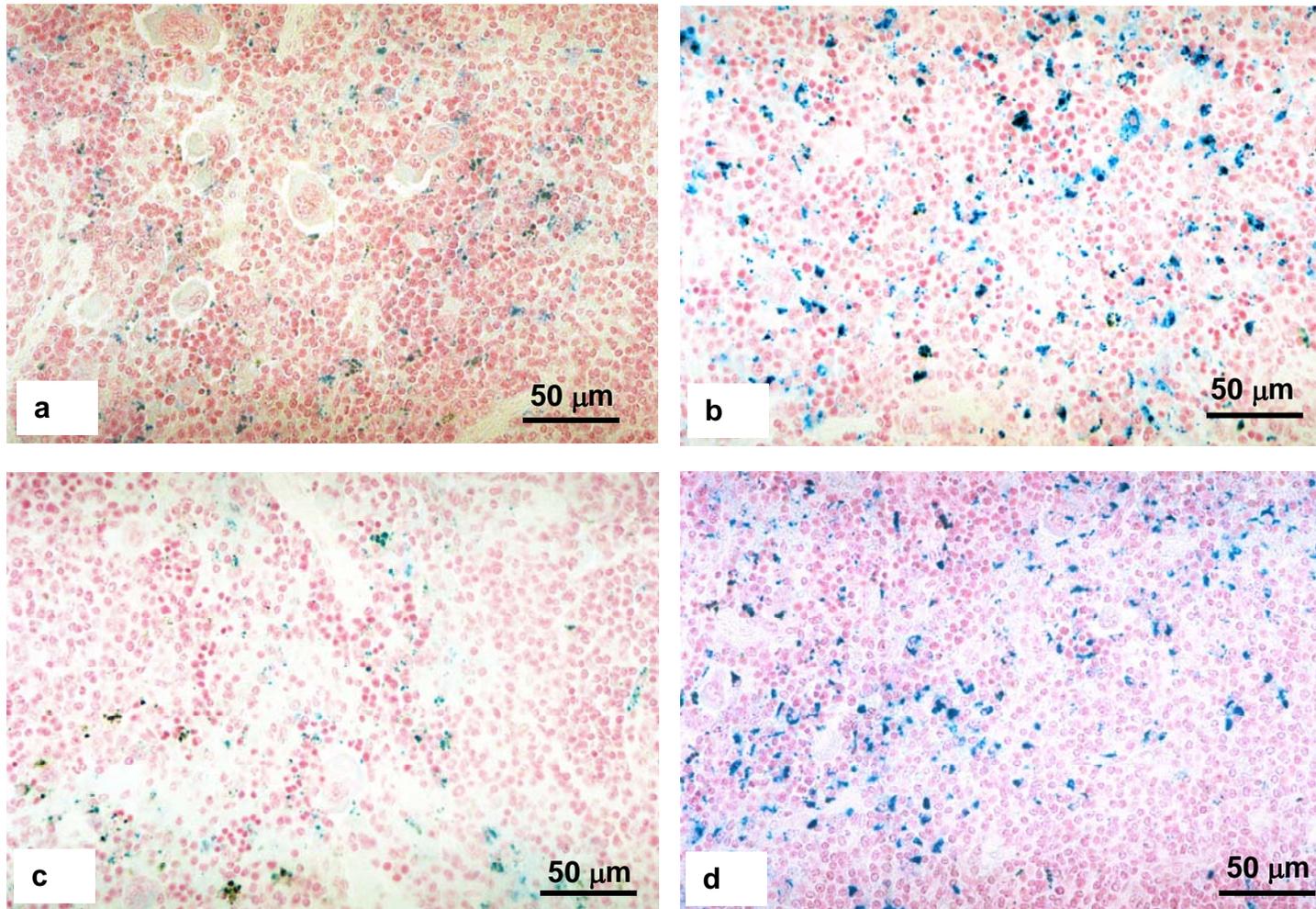


Figura 17 - Fotomicrografias de baço de animais controle (a, b) e animais tratado com MagheCi durante 6 horas (c) mostrando quantidade média de aglomerados de NPM (++) e 48 horas (d) mostrando grande quantidade de aglomerados de NPM (+++). Em a, b, c, d método de coloração de Perls.

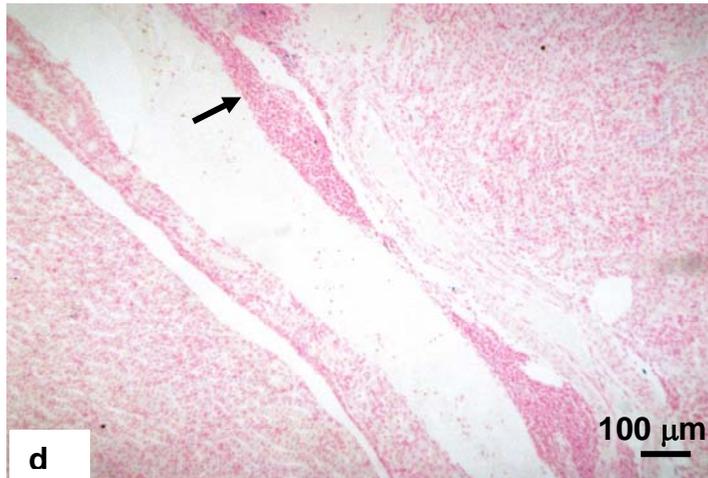
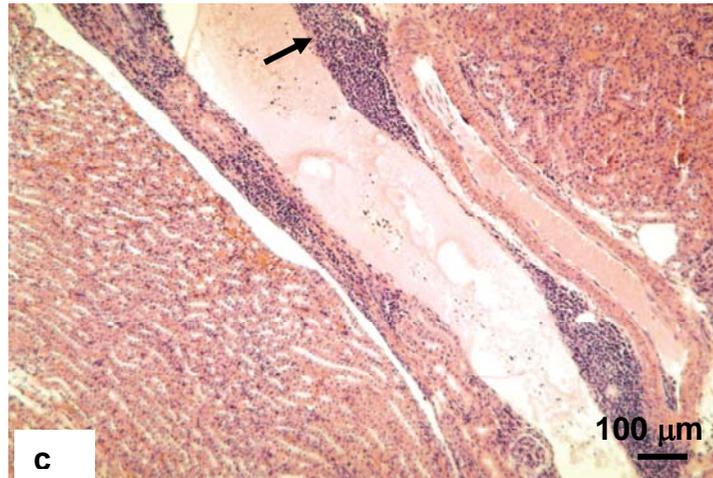
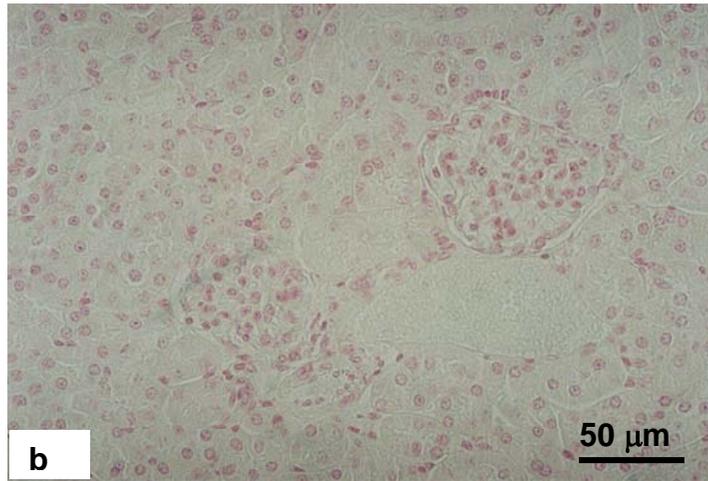
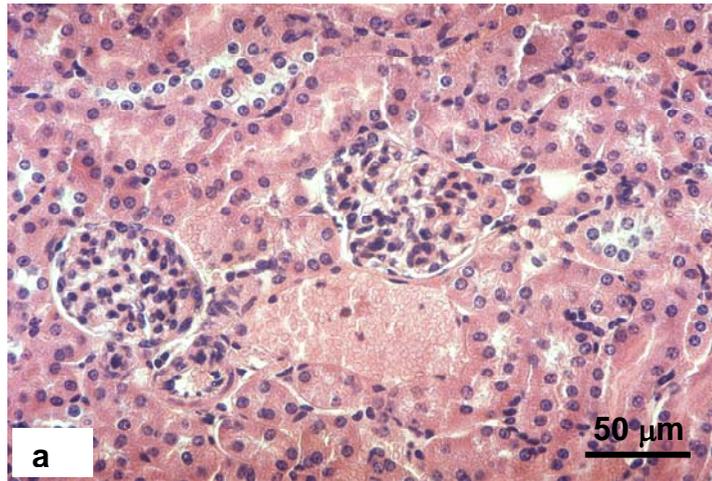


Figura 18: Fotomicrografias de rim de animais controle (a,b,) e tratados com MagheCi durante 6 horas (c,d). As setas indicam infiltrado inflamatório na pelve renal (c,d). Em a, c, coloração por método de HE; em b, d, coloração por método de Perls.

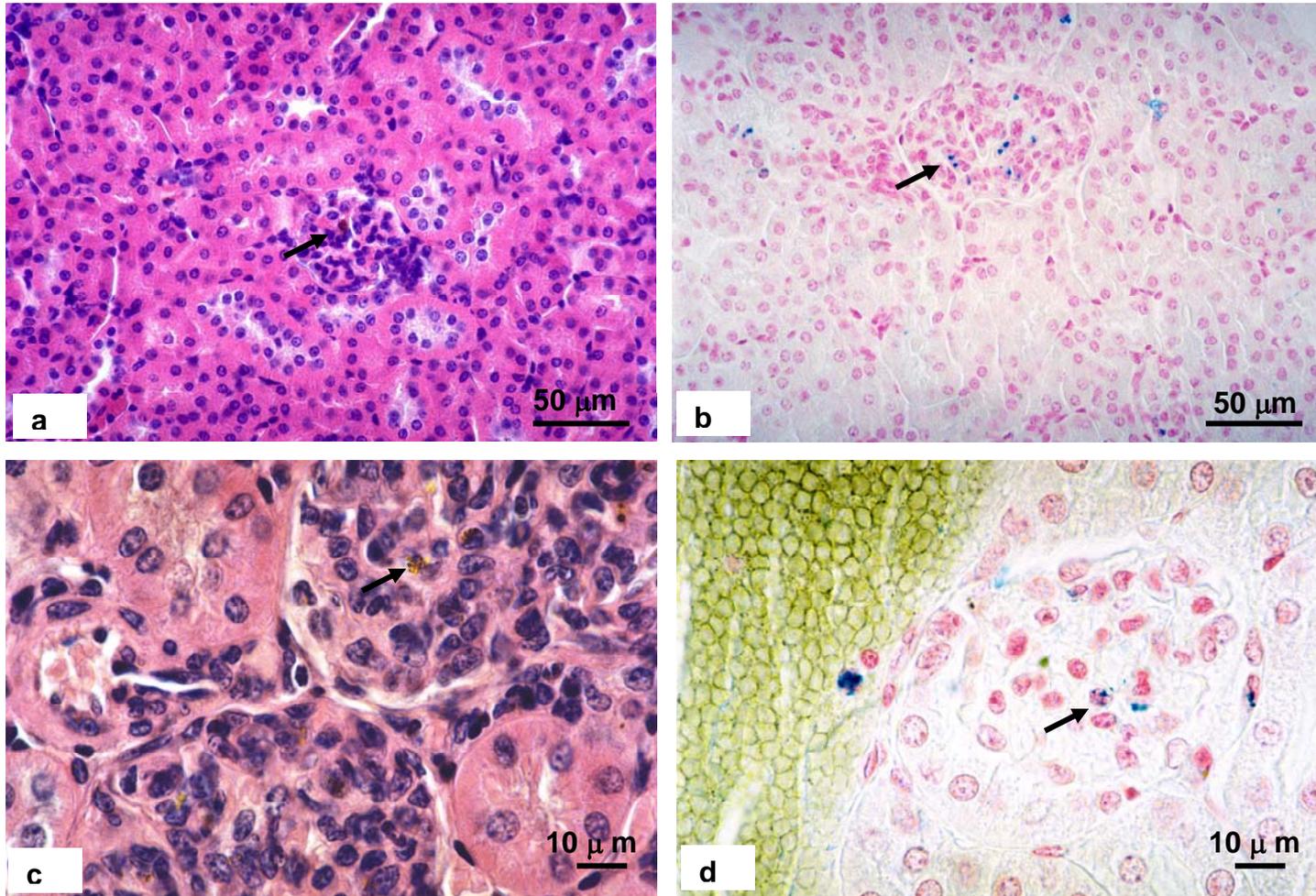


Figura 19: Fotomicrografias de rim de animais tratados com MagheCi durante 12 horas (a, d) e 24 horas (b,c). As setas indicam aglomerados de NPM no interior dos glomérulos renais (a, b, c, d). Em a, c, coloração por método de HE; em b, d, coloração por método de Perls.

## **6. DISCUSSÃO**

Neste trabalho, a amostra MagheCi foi administrada endovenosa/intraperitonealmente em camundongos fêmeas Swiss não-isogênicos a fim de se avaliar sua biocompatibilidade/toxicidade nas células sanguíneas e tecidos. Estes aspectos foram estudados por testes de viabilidade celular em macrófagos peritoneais, contagem de leucócitos do sangue, teste de micronúcleo e % EPC em eritrócitos da medula óssea e análise histológica do fígado, pulmão, rins e baço.

### 6.1 Considerações sobre as Características Físicas e Químicas da Amostra MagheCi

A composição química do núcleo e da cobertura, assim como o tamanho das nanopartículas são parâmetros fundamentais para influenciar tanto sua biodistribuição nos órgãos, eliminação e reconhecimento pelo sistema fagocítico mononuclear, quanto seu grau de biocompatibilidade.

O fluido magnético utilizado no presente trabalho tem em sua composição nanopartículas cujo núcleo é formado por átomos de Fe que constituem, juntamente com átomos de oxigênio, a maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_4$ ). A importância da natureza química constituinte das NPM na promoção dos aspectos de biocompatibilidade/toxicidade da amostra tem sido evidenciada em vários trabalhos que testaram nanopartículas desenvolvidas a partir de ferritas diversas, todas recobertas com citrato. Nanopartículas à base de ferrita de manganês induziram morte, diarreia, efeitos genotóxicos e reações inflamatórias severas (Lacava et al., 1999b). Diferentemente destas, nanopartículas à base de magnetita (Garcia, 2002) apresentaram processo inflamatório brando, mas letalidade significativa, enquanto as de ferrita de cobalto (Kückelhaus, 2003) mostraram efeitos tóxicos reduzidos e temporários. No caso do presente trabalho, nanopartículas à base de maghemita mostraram efeito inflamatório brando e temporário, sem letalidade. Diferentemente da magnetita, a maghemita se encontra na forma oxidada, sendo um material ainda mais promissor para aplicações biomédicas.

No que se refere à importância do diâmetro médio das nanopartículas na biodistribuição dos órgãos foi evidenciado, em vários trabalhos, que nanopartículas recobertas com ácido poliaspártico com diâmetro médio de 8.5 nm (Sadeghiani et al., 2005) ou recobertas com citrato (Garcia, 2002) com diâmetro médio de 7,8 nm formam aglomerados no fígado, pulmão e baço sem alterações histológicas ou processo inflamatório.

O diâmetro da NPM também influencia nos aspectos de toxicidade da amostra. Estudos revelaram que amostras de NPM à base de ferrita de cobalto com diâmetro em torno de 8 nm apresentam menor toxicidade que as de 5,8 nm ou as de 15 nm (Lacava, comunicação pessoal).

Um outro aspecto interessante relacionado ao diâmetro das NPM testadas é o de que, partículas com tamanho pequeno (4 a 10 nm) apresentam propriedades superparamagnéticas e são candidatas ideais para tratamento de câncer por meio de técnicas de hipertermia (Phillips, 2005).

O diâmetro das nanopartículas da amostra de MagheCi utilizada neste trabalho (10nm), se adequa aos aspectos de biodistribuição, toxicidade e propriedades magnéticas desejáveis.

Um dos requisitos para utilização dos fluidos magnéticos nas aplicações biomédicas é sua estabilidade, característica que faz com que suas partículas não aglomerem quando imersas em meio líquido (Lacava, 2004) evitando, assim, sua precipitação (Elói, 2004). A estabilidade das nanopartículas pode ser obtida por repulsão estérica vista nos FM surfactados ou por repulsão eletrostática encontrada nos FM iônicos (Elói, 2004). Nos fluidos magnéticos para uso biomédico, a cobertura das NPM com moléculas apropriadas é fundamental para evitar o processo de aglomeração. Com a perda de cobertura as nanopartículas funcionam como pequenos ímas havendo interação dipolar e perda da repulsão estérica, fato este que promove sua aglomeração e precipitação (Kückelhaus, 2003).

A fim de se obter a estabilidade da amostra, as nanopartículas da amostra de MagheCi foram recobertas com monocamada de citrato, molécula escolhida para cobertura porque o citrato é um componente natural das células e participa do ciclo do ácido cítrico onde é convertido em compostos intermediários tais como, oxalacetato, isocitrato,  $\alpha$  cetoglutarato,  $\text{CO}_2$ , entre outros (Nelson e Cox, 2005). Entretanto, na maioria dos órgãos analisados, os aglomerados de

nanopartículas eram visualizados nas análises de microscopia de luz o que, em tese, indica que estas partículas perderam pelo menos parte de sua cobertura e, conseqüentemente, aglomeraram.

A formação de aglomerados pode ocorrer devido à fagocitose realizada pelos macrófagos presentes nos tecidos. Com o processo de fagocitose, as nanopartículas perdem sua cobertura, aglomeram e precipitam (Kückelhaus, 2003).

Referente às características da amostra, cabe ainda ressaltar que o processo de esterilização é uma característica imprescindível para aplicação destes materiais em sistemas biológicos e, até onde é de nosso conhecimento, esta é a primeira vez que uma amostra de FM pode ser autoclavada pelo nosso grupo de pesquisa sem, entretanto, acarretar alterações na sua composição ou estabilidade.

## 6.2 Considerações sobre a Viabilidade dos Macrófagos do Peritônio em Presença da Amostra MagheCi

O teste de viabilidade celular em macrófagos peritoneais é um teste amplamente utilizado para verificar a toxicidade de compostos químicos *in vivo*.

Os macrófagos são as principais células presentes no peritônio e atuam na resposta primária gerada na cavidade abdominal em resposta a infecções, câncer (Neuhaus e Watson, 2004) e presença de partículas estranhas. Patógenos e células estranhas são fagocitados (opsonizadas ou não) por meio de receptor Fc, C3b e manose e, subseqüentemente, destruídos por intermediários reativos de oxigênio. Os macrófagos também atuam na regulação da resposta na fase aguda e liberação de interleucinas do tipo 1, tipo 6 e fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) (Neuhaus e Watson, 2004).

A fagocitose de NPM pelos macrófagos peritoneais tem sido observada em testes biológicos com vários FM, entre eles, o fluido magnético iônico à base de ferrita de manganês e tartarato (Lacava et al., 1999a), FM composto de nanopartículas de magnetita recobertas com carboximetildextrana (Guedes, 2005) e FM composto de nanopartículas de ferrita de cobalto recobertas com citrato (Kückelhaus, 2003) sendo a morte observada proporcional ao número de nanopartículas fagocitadas (Lacava et al., 1999b).

Além da atuação dos macrófagos, sabe-se que a presença de grandes quantidades de ferro catalisa a formação de radicais livres com potencial para danificar membranas e estruturas celulares, podendo levar à morte (Emerit, Beaumont, Trivin, 2001). Sestier e colaboradores (2002) mostraram que fluidos magnéticos recobertos com ácido dimercaptosuccínico ou dextrana apresentam efeitos tóxicos dose-dependentes sobre linhagens de macrófagos murinos e monócitos humanos irradiados. O efeito foi revertido com a utilização de quelantes de ferro, fato que evidencia a atuação desse elemento químico nos processos citotóxicos.

Porém, é interessante observar que estes dados diferem dos encontrados neste trabalho onde não foram encontradas alterações na viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos e sugerem que as nanopartículas de maghemita recobertas com citrato não são tóxicas para estas células.

### 6.3 Considerações sobre a Contagem de Leucócitos do Sangue

A contagem diferencial de leucócitos do sangue (eosinófilos, monócitos, linfócitos e neutrófilos) é um instrumento importante em análises patológicas, pois por meio desta é possível constatar processos inflamatórios e alérgicos decorrentes da ação de drogas, parasitas e traumas, entre outros.

Durante o processo inflamatório há migração de granulócitos e monócitos para o tecido afetado. Estes são atraídos devido à liberação de produtos teciduais como prostaglandinas, histaminas, bradicinina, serotonina, diferentes produtos da reação do sistema complemento e linfocinas liberadas pelos linfócitos ativados (Gyuton e Hall, 2002). Estes dados sugerem que a diminuição de monócitos em 6 horas e 7 dias é decorrente de processo inflamatório induzido pela amostra MagheCi.

A fagocitose de materiais estranhos presentes nos tecidos é papel realizado principalmente pelos macrófagos. Uma vez ativados, os macrófagos estimulam a inflamação aguda através da secreção de citocinas, principalmente fator de necrose tumoral (FNT) e quimiocinas que estimulam as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão que medeiam a ligação dos leucócitos, recrutando-os para o sítio de infecção (Abbas, Lichtman e Pober, 2003).

A diminuição de leucócitos totais e de linfócitos observada 6 horas após a administração da amostra MagheCi, assim como as alterações dos monócitos indicam que estas células podem ter migrado para os órgãos, como observado na análise histológica. Estes dados sugerem um processo inflamatório brando nesses animais, quadro este revertido nos tempos de administração subsequentes. Resultado semelhante foi encontrado por Garcia (2002) com a utilização de nanopartículas de magnetita recobertas com citrato.

#### 6.4 Considerações sobre a Genotoxicidade e Citotoxicidade da Amostra MagheCi sobre a Medula Óssea

O teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongo é um teste amplamente utilizado para avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos da droga teste (Schmid, 1975; Health Effects Test Guidelines, 1998; Krishna e Hayashi, 2000b) após exposição do animal à substância teste por via adequada. Além dos efeitos clastogênicos sobre o material genético, este teste também permite avaliar a ação sobre o fuso mitótico celular (aneugênicos) (Schmid, 1975; Krishna e Hayashi, 2000b).

O micronúcleo (normalmente encontrado apenas um por célula) é um pequeno núcleo adicional cujo diâmetro varia de 1/20 a 1/5 do núcleo principal do eritrócito. É produzido durante a telófase da mitose (meiose) por fragmentos cromossômicos tardios ou cromossomos inteiros (Schmid, 1975) e, após expulsão do núcleo principal, permanece no citoplasma podendo ser facilmente visualizado (Schmid, 1975; Krishna e Hayashi, 2000b).

Para avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos, 2000 eritrócitos policromáticos e 2000 normocromáticos devem ser analisados e o número de animais deve ser de no mínimo 5 por grupo de tratamento (Krishna et al., 1995; Krishna e Hayashi, 2000b).

O efeito citotóxico pode ser avaliado por meio da contagem dos eritrócitos policromáticos (imaturos) e normocromáticos (maduros) encontrados na medula óssea do animal, sendo a proporção normal de aproximadamente 1:1 (Gollapudi e McFadden, 1995). Nesta contagem, os eritrócitos policromáticos são diferenciados dos normocromáticos por meio da coloração diferencial para ácido

ribonucléico (ARN) (Health Effects Test Guidelines, 1998). O eritrócito policromático contém ARN, é basofílico e cora-se em azul claro ou acinzentado. Diferentemente deste, o eritrócito normocromático é acidófilo, menor que o policromático e cora-se em laranja claro ou laranja-rosado (Krishna e Hayashi, 2000b). Quando a proporção entre essas células é menor que 20 % do valor do controle, a substância teste é considerada citotóxica (Health Effects Test Guidelines, 1998).

Os resultados encontrados no teste de micronúcleo mostram, portanto, que a amostra MagheCi não é citotóxica aos animais, na dose e tempos utilizados. Estes resultados corroboram com trabalhos anteriores onde foram utilizadas nanopartículas de magnetita recobertas com citrato (Garcia, 2002).

O efeito genotóxico é avaliado por meio da incidência de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos e normocromáticos (Krishna e Hayashi, 2000b). A fim de garantir o controle de qualidade, padronização das condições de manutenção dos animais e assegurar que todos os passos do experimento tem sido seguidos precisamente, tem-se utilizados animais controle positivos (Krishna, Urda e Paulissen, 2000a). Neste teste, os animais são expostos a uma substância sabidamente genotóxica, como a ciclofosfamida que induz significativo aumento na frequência de micronúcleos 24 horas após sua administração (Krishna et al., 1995). Os resultados evidenciam que a ciclofosfamida, nos tempos e dose utilizados, foi efetiva em causar efeito genotóxico sobre os eritrócitos da medula óssea dos camundongos. Este feito, porém, não foi observado nos animais submetidos à administração de MagheCi, fato este que evidencia a ação não genotóxica desses materiais.

O teste de MN mostrou que a administração de MagheCi não apresenta efeito genotóxico sobre as células policromáticas da medula óssea. Ainda que a presença de micronúcleo em eritrócitos normocromáticos tenha aumentado significativamente 48 horas após o tratamento com MagheCi, os resultados encontram-se dentro dos parâmetros considerados normais para este tipo de teste (3%) e, portanto, não apresentam efeito genotóxico para estas células.

## 6. 5 Considerações sobre a Histologia dos Órgãos

Entre as várias metodologias para investigar os efeitos das NPM nos órgãos, a histologia assume grande relevância. O fígado, pulmões, baço, rins, cérebro e pâncreas são os órgãos mais comumente utilizados em análise histológica de animais submetidos à aplicação das NPM (Garcia, 2002; Kückelhaus, 2003; Lacava et al., 2004; Guedes, 2005).

Para a análise histológica em microscopia de luz, a coloração por HE tem sido amplamente utilizada. Nesta coloração, os aglomerados de NPM apresentam-se sob a forma de agregados de cor marrom e são facilmente visualizados (Lacava et al., 2006). Por outro lado, para distinguir o ferro endógeno do exógeno, é utilizada a coloração de Perls (coloração de Prussian). Nesta coloração, o ferro é visualizado na cor azul intenso. A formação de agregados azuis nos tecidos e dentro das células pressupõe a perda parcial ou total da cobertura das NPM, neste caso, o citrato. Isto se deve ao fato de que, quando colocadas em pH igual ou inferior a cinco e presença de ferrocianeto de potássio, as NPM formam precipitado de cor azul proporcional ao tempo de reação. Esta reação evidencia, portanto, que em pH ácido, como o existente no interior dos lisossomas, as nanopartículas perdem sua cobertura o que pode promover sua agregação e exposição dos íons férricos ao ferrocianeto de potássio, levando à formação do precipitado (Kückelhaus, 2003).

O fígado e baço são órgãos que possuem grande quantidade de ferro endógeno. No fígado, o excesso é estocado na forma de hemossiderina nos hepatócitos e macrófagos (Lieu et al., 2001) ou na forma de ferritina (intracelular). No caso do baço, este é encontrado principalmente armazenado na ferritina e hemossiderina (Pereira, Pereira e Sousa, 1999).

A hemossiderina é uma forma de armazenamento de ferro insolúvel e ocorre quando a quantidade de ferro no organismo é superior àquela que pode ser armazenada na ferritina. A hemossiderina forma aglomerados nas células e quando corados podem ser facilmente visualizados ao microscópio como partículas nos tecidos (Guyton e Hall, 2002). A presença de agregados de coloração azul no baço de animais do grupo controle negativo e salina evidencia a presença de hemossiderina no baço destes animais. Ainda cabe ressaltar que,

além da hemossiderina, as trabéculas da polpa vermelha são revestidas por inúmeros macrófagos cuja função é a fagocitose de células senescentes, em particular os eritrócitos, microorganismos e partículas estranhas que entram em contato com eles (Gyuton e Hall, 2002). Dentro dos macrófagos, o ferro livre é estocado na ferritina ou liberado na circulação onde se liga à transferrina plasmática (Emerit, Beaumont e Trivin, 2001).

A ausência de alterações histológicas no baço até 7 dias após da administração do fluido magnético e presença de aglomerado de nanopartículas magnéticas sugerem que o fluido magnético, na dose e tempos de tratamento utilizados, não provoca alterações histológicas significativas neste órgão.

Quanto à presença das NPM, é interessante observar que diferentes coberturas podem levar a diferentes comportamentos biológicos das NPM. Kückelhaus e colaboradores (2004) mostraram que aglomerados de nanopartículas de ferrita de cobalto recobertas com citrato são encontradas dentro dos fagócitos do fígado, enquanto nanopartículas de magnetita recobertas com citrato (Garcia, 2002) são encontradas formando aglomerados no fígado, pulmão e baço. Em ambos não foram encontrados danos teciduais ou infiltrados celulares. Estes dados corroboram com os encontrados neste trabalho onde foi encontrado aglomerado de nanopartículas em todos os órgãos analisados e ausência de alterações histológicas graves, exceto pela presença de infiltrados inflamatórios em alguns animais.

Em relação aos agregados de nanopartículas, ainda cabe ressaltar que as nanopartículas utilizadas possuem, em média, 10 nm de diâmetro, tamanho este insuficiente para serem visualizadas ao microscópio de luz. Portanto, deve-se deduzir que estas se encontram aglomeradas nos órgãos. A formação de aglomerados nos órgãos tem sido encontrada em vários trabalhos com nanopartículas à base de magnetita recobertas com diferentes substâncias: ácido poliaspártico (Sadeghiani et al., 2005), dextrana (Lacava, 2004), ácido cítrico (Garcia, 2002). O mesmo efeito foi observado com nanopartículas à base de maghemita recobertas com fosfato (Portilho, comunicação pessoal).

## 6.6 Considerações sobre a Biocompatibilidade da Amostra MagheCi

A biocompatibilidade é uma característica imprescindível para a aplicação das nanopartículas magnéticas. Esta pode ser obtida por meio da análise da integridade tecidual e celular, fagocitose, processo inflamatório detectado por infiltrado de células sanguíneas e fibrose (Lacava et al., 2006).

Nanopartículas de óxido de ferro são conhecidas por serem não tóxicas e eventualmente são quebradas para formar hemoglobina do sangue (Gupta e Gupta, 2005).

Para que um fluido magnético seja biocompatível este deve ser biodegradável, hemocompatível e não tóxico ao organismo. Além disso, as nanopartículas devem atravessar a barreira endotelial e se acumular nas células alvo. Estas características são obtidas através do recobrimento das nanopartículas com materiais biologicamente ativos (Lacava, 2006).

A biocompatibilidade tem sido encontrada em testes biológicos com nanopartículas à base de magnetita recoberta com diferentes substâncias: ácido poliaspártico (Sadeghiani, 2005), citrato (Garcia, 2002), dextrana (Lacava, 2004). O mesmo efeito, porém, não foi observado com nanopartículas recobertas com ácido dodecanóico e álcool etoxilado (Freitas, 2000) e nanopartículas de ferrita de manganês recobertas com citrato (Lacava et al., 1999a ; Lacava et al., 1999b).

Quanto às alterações nos tecidos as mais comuns são os infiltrados inflamatórios. Estes comumente encontram-se associados a aglomerados de nanopartículas e podem ser observados em diferentes órgãos após a exposição às nanopartículas à base de diferentes materiais e recoberta com variados tipos de substâncias: magnetita recoberta com DMSA (Garcia et al., 2005) no pulmão; ferrita de manganês recoberta com citrato (Lacava et al, 1999b) no baço e rim, por exemplo.

Tanto no baço quanto no fígado, NPM e/ou grânulos de ferritina são visualizados nos cortes histológicos (interior de macrófagos) durante todo o intervalo experimental. A ativação de macrófagos via fagocitose ou endocitose leva à secreção de grande número de substâncias que podem ter papel ativo na reação inflamatória que vai desde morte celular até a sua proliferação (Lacava, 2004). Em trabalho realizado com partículas de magnetita recobertas com ácido

dodecanóico e álcool etoxilado administradas intraperitonealmente em camundongos, Freitas (2003) mostrou alterações histológicas significativas, tais como, infiltrado inflamatório e fibrose, que estavam associadas com a produção de radicais livres.

Os radicais livres são espécies altamente reativas e promovem a oxidação de proteínas, peroxidação dos lipídios de membrana e modificações nos ácidos nucleicos (Lieu, 2001; Emerit, Beaumont e Trivin 2001; Videla et al., 2003; Papanikolau e Pantopoulos, 2005). O ferro participa da reação de Fenton e Haber-Weiss onde os radicais hidroxilas são gerados, produzindo um estado pró-oxidante nas células (Meneguini, 1997; Emerit, Beaumont e Trivin, 2001; Videla et al., 2003). O excesso de ferro agrava o estresse oxidativo e leva à acelerada degeneração tecidual (Papanikolau e Pantopoulos, 2005).

Patologias associadas ao excesso de ferro incluem fibrose nos órgãos, tais como no fígado e coração com aumento de colágeno (Templeton e Liu, 2003; Videla et al., 2003) e encontram-se intimamente relacionadas à geração de radicais livres pelos compostos à base de ferro (Pereira, Pereira e Sousa, 1999). Alterações na espessura da cápsula e depleção da polpa vermelha do baço, necrose, degeneração e ruptura do epitélio renal foram observadas após administração de solução de ferro. Neste ponto vale ressaltar que a cobertura presente nas nanopartículas tenta minimizar o contato direto do ferro com o tecido, fato este evidenciado pela ausência de alterações em muitas das aplicações com nanopartículas (Garcia, 2002; Kückelhaus, 2003; Guedes, 2005)

Ainda em relação ao excesso de ferro, também pode ocorrer aumento na produção de radical superóxido, fato este que acarreta dano em moléculas orgânicas em geral e estimula resposta inflamatória (Lacava, 2004; Templeton e Liu, 2003). O ferro também aumenta a expressão de fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) (Templeton e Liu, 2003; Videla et al., 2003) e no caso do fígado, a célula de Kupffer é a principal produtora e liberadora desta citocina. Cabe, ainda, ressaltar que o FNT- $\alpha$  é a principal molécula efetora na indução da produção de várias quimiocinas (IL-8, proteína-1 $\alpha$  inflamatória de macrófago, proteína quimioatrativa de macrófago e moléculas adesivas), moléculas chave na inflamação e dano hepático (Videla et al., 2003).

O infiltrado inflamatório (12, 24 horas e 7 dias) e espessamento da parede alveolar (24 horas e 7 dias) encontrado no pulmão de alguns animais tratados, sugere que, sob condições aeróbicas, o ferro atue, da mesma maneira que no fígado, no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que levam aos danos observados neste órgão.

Além do excesso de ferro no organismo, a geração de radicais livres também está associada com o aumento na relação da área existente em partículas de pequeno tamanho, como é o caso das nanopartículas. Alterações nas vias aéreas tais como, dano epitelial, citotoxicidade, recrutamento de eosinófilos, neutrófilos e monócitos e concomitante aumento de quimiocinas e citocinas (IL-5, IL-13, IL-6) têm sido encontradas quando nanopartículas ultrafinas compostas por dióxido de titânio e carbono negro (Renwick et al., 2004) ou carbono negro juntamente com ovoalbumina (Inoue et al., 2005) são utilizadas.

No caso do rim, a presença de infiltrado inflamatório na região da pelve sugere que o ferro presente no fluido magnético, por meio da geração de radicais, pode ser o responsável pelas alterações neste órgão. Lacava e colaboradores (1999b) mostraram que a aplicação de fluido magnético à base de ferrita de manganês recoberto com citrato em peritônio de camundongos altera o hilo renal de camundongos, provocando severa reação inflamatória. Estes dados corroboram com os encontrados neste trabalho e sugerem que o ferro tem papel ativo nas alterações encontradas no rim dos animais tratados com MagheCi.

Apesar de alguns trabalhos indicarem a atuação do ferro nas alterações encontradas no rim, sabe-se também que, em resposta a patógenos, as células tubulares epiteliais que revestem o néfron têm função ativa contra infecção urinária ascendente. Neste processo, essas células geram componentes do complemento, citocinas, quimiocinas, tais como IL-8, e  $\beta$ -defensinas (Thurman, 2006) fato este que explica o infiltrado linfocitário presente também no rim da maioria dos animais dos grupos controle negativo e salina.

## 6.7 Considerações Finais

Os testes empregados na realização deste trabalho tais como, viabilidade celular de macrófagos peritoneais, contagem de leucócitos do sangue, ensaio de micronúcleo e % EPC em eritrócitos da medula óssea e análise histológica de órgãos são ferramentas imprescindíveis na investigação dos fluidos magnéticos em sistemas biológicos.

A amostra MagheCi investigada neste trabalho apresenta várias características que indicam a sua biocompatibilidade, tais como, ausência tanto de alterações na viabilidade de macrófagos do peritônio, como de geno/citotoxicidade aos eritrócitos da medula óssea de camundongos. Cabe ainda ressaltar que, durante todo o intervalo experimental, não foi observada morte dos animais tratados com MagheCi.

Embora as células sanguíneas tenham mostrado processo inflamatório, este foi brando e temporário. É possível supor que este processo seja decorrente de resposta normal do organismo quando em presença de materiais estranhos, tais como as nanopartículas magnéticas. Processo similar pode ser aventado para explicar os infiltrados celulares e concomitante aglomerado de NPM encontrado nos órgãos de alguns animais tratados com MagheCi. Estudos realizados com amostras feitas com nanopartículas de maghemita recobertas com citrato têm mostrado que este é um material promissor para aplicações tanto na entrega de drogas quanto nas aplicações da magnetohipertermia.

## **7. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos por meio dos testes *in vivo* realizados cujo objetivo era avaliar a biocompatibilidade de amostra MagheCi em camundongos fêmeas Swiss não-isogênicos, permitem concluir que:

- A amostra MagheCi não é citotóxica para os macrófagos peritoneais como constatado pelo teste de viabilidade celular;
- A amostra MagheCi induz ligeiro e temporário processo inflamatório detectado pela contagem de leucócitos do sangue;
- A amostra MagheCi não induz efeito genotóxico ou citotóxico aos eritrócitos da medula óssea, como constatado pelo teste de micronúcleo e % EPC;
- A amostra MagheCi forma aglomerado nos órgãos investigados: fígado, pulmão, baço e rins;
- A administração de MagheCi não acarreta alterações histológicas significativas nos órgãos investigados, exceto pela presença de infiltrados celulares associados aos aglomerados de NPM;
- Os diferentes testes utilizados permitem-nos concluir que a amostra MagheCi apresenta biocompatibilidade, com potencial significativo para aplicações biomédicas.

**REFERÊNCIAS**

1. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. I. **Imunidade Inata**. In: \_\_\_\_\_ **Imunologia Celular e Molecular**, 4 ed. Tijuca, Rio de Janeiro: Revinter, 2003, p 270-283.
2. ALEXIOU, C.; JURGONS, R.; SCHMID, R.; HILPERT, A.; BERGEMANN, C.; PARAK, F.; IRO, H. **In vitro and in vivo investigations of targeted chemotherapy with magnetic nanoparticles**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 293, p 389-393, 2005.
3. BERRY, C.; CURTIS, A. S. G. **Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine**. *Journal Physic D: Applied Physic*, v.36, p 198-206, 2003.
4. BRUSENTOV, N. A.; NIKITIN, I. V.; BRUSENTOVA, T. N.; KUZNETSOV, A.; BAYBURTSKIY, F. S.; SHUMAKOV, L. I.; JURCHENKO, N. Y. **Magnetic fluid hyperthermia of the mouse experimental tumor**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 252, p 378-380, 2002.
5. BRUSENTOV, N. A.; KUZNETSOV, V. D.; BRUSENTOVA, T. N.; GENDLER, T. S.; NOVAKOVA, A. A.; VOLTER, E. R.; HALIULINA, E. A.; DANILKIN, M. I. **Magnetisation of ferrifluids and effects of intracellular deposition of ferrite nanoparticles**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 272-276, p 2350-2351, 2004.
6. CHATTERJEE, J.; HAIK, Y. CHEN, C. **Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 257, p 113-118, 2003.
7. CHAVES, S. B.; LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; SILVA, O.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B. **Light microscopy and magnetic resonant characterization of DMSA-coated magnetic fluid in mice**. *IEEE Transaction on Magnetics*, v. 38, n. 5, p 3231-3233, Sept. 2002.
8. CHEN, B. T.; LOBERG, R. D.; NEELEY, C. K.; O'HARA, S. M.; GROSS, S.; DOYLE, G.; DUNN, R. L.; KALIKIN, L. M.; PIANTA, K. J.. **Preliminary study of immunomagnetic quantification of circulating tumor cells in patients with advanced disease**. *Urology*, v. 65, n. 3, p 616-621, 2005.
9. CHEN, W.; SHEN, H.; LI, X.; JIA, N.; XU, J. **Synthesis of immunomagnetic nanoparticles and their applications in the separation and purification of CD34 + hematopoietic stem cells**. *Applied Surface Science*, 2006 (em impressão).
10. CLEMENT, J. H.; SCHWALBE, M.; BUSKE, N.; WAGNER, K.; SCHNABELRAUCH, M.; GÖRNERT, P.; KLICKE, K. O.; PACHMANN, K.; WEITSCHIES, W.; HÖFFKEN, K. **Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells**. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v.132, p287-292, 2006.

11. DAHL, O.; DALENE, R.; SCHEM, D. C.; MELLA, O. **Status of clinical hyperthermia**. Acta Oncologica, v. 38, n. 7, p 863-873, 1999.
12. DEWHIRST, M. W.; JONES, E.; SAMULSKI, T.; VUJASKOVIC, Z.; LI, C.; PROSNITZ, L. **Hyperthermia**. Disponível em [http:// www.Ncbi.nih.gov/books/bv](http://www.Ncbi.nih.gov/books/bv). Acesso em 25 agosto de 2005.
13. ELÓI, M.T.A. **Caracterização magnto-optica de fluidos magnéticos à base de maguemita**. Brasília, 2004, 65 f. Dissertação de Mestrado em Física, Universidade de Brasília.
14. EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. **Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury**. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 55, p 333-339, 2001.
15. FAHMY, T. M.; FONG, P. M.; GOYAL, A.; SALTZMAN, W. M. **Targeted for drug delivery**. Nanotoday, p 18-26, aug. 2005.
16. FREITAS, M. L. L.. **Toxicidade de fluido magnético à base e partículas de magnetita recobertas por ácido dodecanóico e álcool etoxilado: alterações genéticas e morfológicas**. Brasília, 2000, 93 f. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.
17. FREITAS, M. L. L.; SILVA, L. P.; FREITAS, J. L.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M.; BITTENCOUR, P. I. H.; CURI, R.; BUSKE, N.; MORAIS, P. C. **Investigation of lipid peroxidation and catalase activity in magnetic fluid treat mice**. Journal of Applied Physics, v. 93, n. 10, p 6709-6711, 2003.
18. GARCIA, M. P.; PARCA, R. M.; CHAVES, S. B.; SILVA, L. P.; SANTOS, A D.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B. **Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 293, p 277-282, 2005.
19. GARCIA, V. A. P. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos**. Brasília, 2002, 155f . Tese de Doutorado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.
20. GELDWERTH, D.; HELLEY, D.; JONG, K. De; SABOLOVIC, D.; SESTIER, C.; ROGER, J.; PONS, J.; FREYSSINET, J.; DEVAUX, P. F.; KUYPERST, F. A. **Detection of phosphatidylsrine surface exposure on human erythrocytes using annexin v- ferrofluid**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 258, p 199-203, 1999.

21. GOLLAPUDI, B. B.; McFADDEN, L. G. **Sample size for estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test.** v. 347, p 97-99, 1995.
22. GUEDES, M. H. A. **Desenvolvimento de um novo sistema de magnetohipertermia para tratamento do câncer e seus efeitos em camundongos.** Brasília, 2005, 139f. Tese de Doutorado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.
23. GUEDES, M. H. A.; SADEGHIANI, N.; PEIXOTO, D. L. G.; COELHO, J. P.; BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, R. B.; KÜCKELHAUS, S.; SILVA, M. F. Da; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M. **Effects of AC magnetic field and carboxymethyl-dextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 293, p 283-286, 2005.
24. GUPTA, A. K.; GUPTA, M. **Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.** Biomaterials, v. 26, p 3995-4021, 2005.
25. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Eritrócitos, anemia e policitemia. In: \_\_\_\_\_ **Tratado de Fisiologia Médica**, 10 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002, p 360-388.
26. HALBREICH, A.; ROGER, J.; PONS, J. N.; GELDWERTH, D.; SILVA, M. F. Da; ROUDIER, M. BACRI, J.C. **Biomedical applications of maghemite ferrofluid.** Biochimie, v. 80, p 379-390, 1998.
27. HALBREICH, A.; GROMAN, E. V.; RAISON, D.; BOUCHAUD, C.; PATURANCE, S. **Damage to protein synthesizing apparatus in mouse liver in vivo by magnetocytolysis in presence of hepatospecific magnetic nanoparticles.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 248, p276-285, 2002.
28. HARISINGHANI, M. G.; SASENA, M.; ROSS, R. W.; TABATABAEI, S.; DAHL, D.; McDOUGAL, S.; WEISSLEDER, R. **A pilot study of limphotrophic nanoparticle-enhanced magnetic resonance imaging technique in early stage testicular cancer: a new method for noninvasive lymph node evaluation.** Urology, v. 66, p 1066-1071, 2005.
29. **Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5395 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.** United States Environmental Protection Agency, aug. 1998. Disponível em <http://epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS>. Acesso em 10 set. 2006.
30. HILDEBRANDT, B. WUST, P.; AHLERS, O.; DIEING, A.; SREENIVASA, G.; KERNER, T.; FELIX, R.; RIESS, H. **The cellular and molecular basis of hyperthermia.** Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 43, p 33-56, 2002.

31. HILGER, I.; HERGT, R.; KAISER, W. **Towards breast cancer treatment by magnetic heating.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 293, p 314-319, 2005.
32. INOUE, K.; TAKANO, H.; YANAGISAWA, R.; SAKURAI, M.; ICHINOSE, T.; SADAKANE, K.; YOSHIKAWA, T. **Effects of nanoparticles on antigen-related airway inflammation in mice.** Respiratory Research, v. 6, p 106-117, 2005.
33. JONES, E. L.; OLESON, J. R.; PROSNITZ, L. R.; SAMULSKI, T. V.; VUJASKOVIC, Z.; YU, D.; SANDERS, L. L.; DEWHIRST, M. W. **Randomized Trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors.** Journal of Clinical Oncology, v 23, n. 13, p 3079-3085, may 2005.
34. JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; WUST, FÄHLING, H; FELIX, R. **Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 201, p 413-419, 1999.
35. JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; MAIER-HAUFF, K.; LANDERGHM, F. K. H. van; WALDOEFNER, N.; TEICHGRAEBER, U.; PINKERNELLE, J.; BRUHN, H.; NEUMANN, F.; THIESEN, B.; DEIMLING, A. von; Felix, R. **The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma.** Journal of Neuro-Oncology, v. 78, p 7-14, 2006.
36. KRISHNA, G; PETRERE, J.; ANDERSON, J.; THEISS, J. **Use of cyclophosphamide as a positive control in dominant lethal and micronucleus assays.** Mutation Research, v. 335, p 331-337, 1995.
37. KRISHNA, G. URDA, G.; PAULISSEN, J. **Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats.** Mutation Research, v. 453, p 45-50, 2000a.
38. KRISHNA, G.; HAYASHI, M. **In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation.** Mutation Research, v. 455, p 155-166, 2000b.
39. KÜCKELHAUS, S. A. S. **Avaliação biológica de materiais magnéticos à base de ferrita de cobalto desenvolvidos para tratamento alternativo do câncer.** Brasília, 2003, 133f. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal, Universidade de Brasília.
40. 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. G. M. **In vivo investigation of cobalt ferrite-based magnetic fluid and magnetoliposomes using morphological tests.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v.272-276, p 2402-2403, 2004.

41. 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.; MORAIS, P. C.; SILVA, M. F. **Toxic effects of ionic magnetic fluids in mice.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 194, p 90-95, 1999a.
42. 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.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 201, p 431-434, 1999b.
43. LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; CHAVES, C. B.; GARCIA, V. A. P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; SILVA, M. F. Da; MORAIS, P. C. **Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 252, p 367-369, 2002.
44. LACAVA, L. M.; GARCIA, V. A. P.; KÜCKELHAUS, S.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C. MORAIS, P. C. **Magnetic resonance and light microscopy investigation of dextran coated magnetic fluid.** Journal of Applied Physics, v. 93, n. 10, p 7563-7565, 2003.
45. 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.
46. LACAVA, L. M. **Estudos da biodistribuição e toxicidade de fluido magnético à base de partículas de magnetita recobertas por dextran em camundongos.** Brasília, 2004, 105f. Tese de Doutorado em Biologia Animal, Universidade de Brasília.
47. LACAVA, Z. G. M. Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. In: DURAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanopartículas e exemplos de aplicações.** São Paulo: Artliber, 2006, p175-181.
48. LACAVA, Z. G. M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. **The use of magnetic nanoparticles in drug delivery systems: nanoparticles interactions with cells.,** 2006.
49. LIEU, P. T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P. A.; YANG, Y. **The roles of iron in health and disease.** Molecular Aspects of Medicine. v. 22, p 1-87, 2001

50. LIU, W. **Nanoparticles and their biological and environmental applications**. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 102, n. 1, p 1-7, 2006.
51. MEDEIROS, E. S.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, H. C. Nanotecnologia. In: DURAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS; P.C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanopartículas e exemplos de aplicações**. São Paulo: Artliber, 2006, p13-29.
52. MENEGHINI, R. **Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage**. Free Radical Biology & Medicine, v. 23, n.5, p 783-792, 1997.
53. MORAIS, P. C.; SANTOS, R.L.; PIMENTA, A.C. M.; AZEVEDO, R. B.; LIMA, E. C. D. **Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles**. Thin Solid Films, v. 515, p 266-270, 2005.
54. NELSON, D. L.; COX, M. M. The citric acid cycle. In: \_\_\_\_\_. Lehninger: **Principles of Biochemistry**, 4.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005, p 601-627.
55. NEUHAUS, S. J.; WATSON, D. I. **Pneumoperitoneum and peritoneal surface changes**. Surgical Endoscopy, v.18, p 1316-1322, 2004.
56. PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. **Iron metabolism and toxicity**. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 202, p 199-211, 2005.
57. PEREIRA, M. P.; 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.
58. PHILLIPS, J. L. **A topical review of magnetic fluid hyperthermia**. Acesso em 22/10/06. Disponível em: <http://bama.ua.edu/jouhus/archive/aug.2005>.
59. PONKA, P. **Cellular iron metabolism**. Kidney International, v. 55, p 2-11, 1999, Supplement n. 99.
60. RENWICK, L. C.; BROWN, D.; CLORTER, A. DONALDSON, K. **Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particles types**. Occupational Environment Medicine, v. 61, p 442-447, 2004.
61. ROCKALL, A.G.; SOHAIB, S. A.; HARISINGHANI, M. G.; BABAR, S. A.; SINGH, N.; JEYARAJAH, A. R.; ORAM, D. H.; JACOBS, I. J.; SHEPHERD, J. H.; REZNEK, R. H. **Diagnostic performance of nanoparticles-enhanced magnetic resonance imaging in the diagnosis of lymphonodo metastases in patients with endometrial and cervical cancer**. Journal of Clinical Oncology, v. 23, n. 12, p 2813-2821, april 20 2005.

62. SADEGHIANI, N.; BARBOSA, L. S.; SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M. **Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetic nanoparticle surface with polyaspartic acid.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 289, p 466-468, 2005.
63. SCHMID, W.. **The Micronucleus Test.** Mutation Research, v. 31, p 9-15, 1975.
64. SENGUPTA, S.; EAVARONE, D.; CAPILA, I.; ZHAO, G.; WATSON, N.; KIZILTEPE, T.; SASISEKHARAN, R. **Temporal targeting of tumor cells and neovasculature with a nanoscale delivery system.** Nature Letters, v. 436, p 568-572, 2005.
65. SESTIER, C.; LACAVAL, Z. G. M.; LACAVAL, L. M.; SILVA, M. F. Da; AZEVEDO, R. B.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P. C.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; SABOLOVIC, D. **In vitro toxicity of magnetic fluid evaluated for macrophage cell lines.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 252, p 403-405, 2002.
66. SHINKAI, M. **Functional magnetic particles for medical application.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 94, n. 6, p 606-613, 2002.
67. SONG, C. W. **Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a Review.** Cancer Research (suppl.), v. 44, p 4721-4730, oct., 1984.
68. SONVICO, F.; MORNET, S.; VASSAEUR, 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.** Bioconjugate Chemistry, v.16, p 1181-1188, 2005.
69. SOUSA, M. H.; RUBIM, J. C.; SOBRINHO, P. G.; TOURINHO, F. A.. **Biocompatible magnetic fluid precursors based on aspartic and glutamic acid modified maghemite nanostructures.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 225, p 67-72, 2001.
70. STAUFFER, P. R. **Evolving technology for thermal therapy of cancer.** International Journal of Hyperthermia, v. 21, n. 8, p 731-744, 2005.
71. TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S. GONZÁLEZ-CARREÑO, T; SERNA, C. J. **The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine.** Journal Physic D: Applied Physic, v. 36, p R182-R197, 2003.
72. TATSUMI, Y.; TANIGAWA, N.; NASHIMURA, H.; NOMURA, E.; MABUCHI, H.; MATSURU, M.; NARABAYASHI, I. **Preoperative**

**diagnosis of lymph node metastases in gastric cancer by magnetic resonance imaging with ferumoxtran-10.** Gastric Cancer, v. 9, p 120-128, 2006.

73. TEMPLETON, D. M.; LIU, Y. **Genetic regulation of cell function in response to iron overload or chelation.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1619, p 113-124, 2003.
74. THÜNEMANN, A. F.; SCHÜTT, D.; KAUFNER, L.; PISON, U.; MÖHWALD, H. **Maghemite nanoparticles protectively coated with poly(ethylene imine) and poly(ethylene oxide)-block-poly(glutamic acid).** Langmuir, v. 22, p 2351-2357, 2006.
75. THURMAN, J. M. **Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion.** Clinical Immunology, 2006 (em impressão).
76. VIDELA, L.; FERNÁNDEZ, V.; TAPIA, G.; VARELA, P. **Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells.** Biometals, v.16, p 103-111, 2003.
77. WANG, X.; GU, H.; YANG, Z. **The heating of magnetic fluids in an alternating magnetic field.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 293, p 334-340, 2005.
78. 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 487-497, aug. 2002.

**ANEXOS**

Anexo 1 - Viabilidade Celular

Grupos	animal	cel vivas	cel mortas	viáveis	mortas	100%	% vivas	% mortas	vivas 10 <sup>4</sup>	mortas10 <sup>4</sup>	1	1	viáveis log	mortas log
S	1	390	28	487,5	35	522,5	93,30143541	6,698564593	4875000	350000	4875001	350001	6,68797471	5,5440693
	2	360	14	450	17,5	467,5	96,25668449	3,743315508	4500000	175000	4500001	175001	6,65321261	5,2430405
	3	215,0	8,0	268,75	10	278,75	96,41255605	3,587443946	2687500	100000	2687501	100001	6,42934863	5,0000043
	4	472	15	590	18,75	608,75	96,91991786	3,080082136	5900000	187500	5900001	187501	6,77085209	5,2730036
	5	566	48	707,5	60	767,5	92,18241042	7,817589577	7075000	600000	7075001	600001	6,84972651	5,778152
	media	400,6	22,6	500,75	28,25	529	95,01460085	4,985399152	5007500	282500	5007501	282501	6,67822291	5,3676539
	DP	131,01832	15,962456	163,7729	19,9531	180,064	2,126236223	2,126236223	1637728,99	199530,7	1637729	199530,7	0,15862902	0,2997017
EP	58,75261	7,158052	73,44076	8,94756	80,7461	0,953469158	0,953469158	734407,62	89475,65	734407,6	89475,65	0,07113409	0,1343954	
6 horas	1	332	15	415	18,75	433,75	95,67723343	4,322766571	4150000	187500	4150001	187501	6,6180482	5,2730036
	2	184,0	24	230	30	260	88,46153846	11,53846154	2300000	300000	2300001	300001	6,36172802	5,4771227
	3	234,0	21	292,5	26,25	318,75	91,76470588	8,235294118	2925000	262500	2925001	262501	6,46612602	5,419131
	4	197	20	246,25	25	271,25	90,78341014	9,216589862	2462500	250000	2462501	250001	6,39137642	5,3979417
	5	173,0	11,0	216,25	13,75	230	94,02173913	5,97826087	2162500	137500	2162501	137501	6,33495632	5,1383059
	media	224,0	18,2	280,0	22,8	302,75	92,48554913	7,514450867	2800000	227500	2800001	227501	6,44715819	5,3569833
	DP	64,602632	5,16720427	80,75329	6,45901	79,8896	2,809146161	8,084916669	807532,894	64590,053	807533,9	64591,053	5,90716076	4,8101724
EP	29,0	2,3	36,2	2,9	35,8	1,3	3,6	362122,4	28964,1	362122,8	28964,6	2,6	2,2	
12 horas	1	323	47,0	403,75	58,75	462,5	87,2972973	12,7027027	4037500	587500	4037501	587501	6,60611264	5,7690086
	2	305	30,0	381,25	37,5	418,75	91,04477612	8,955223881	3812500	375000	3812501	375001	6,58120997	5,5740324
	3	222,0	17	277,5	21,25	298,75	92,88702929	7,112970711	2775000	212500	2775001	212501	6,44326314	5,327361
	4	490,0	32	612,5	40	652,5	93,8697318	6,130268199	6125000	400000	6125001	400001	6,78710616	5,6020611
	5	529	35	661,25	43,75	705	93,79432624	6,205673759	6612500	437500	6612501	437501	6,82036575	5,6409791
	media	373,8	32,2	467,25	40,25	507,5	92,06896552	7,931034483	4672500	402500	4672501	402501	6,6695494	5,604767
	DP	130,33303	10,7563934	162,9163	13,4455	168,456	2,751598234	7,981615856	1629162,94	134454,92	1629164	134455,92	6,21196479	5,1285799
EP	58,445307	4,82349482	73,05663	6,02937	75,5407	1,233900553	3,579199935	730566,339	60293,685	730566,8	60294,134	2,78563443	2,2998116	

Grupos	animal	cel vivas	cel mortas	viáveis	mortas	100%	% vivas	% mortas	vivas 10 <sup>4</sup>	mortas10 <sup>4</sup>	1	1	viáveis log	mortas log
24 horas	1	269,0	25,0	336,25	31,25	367,5	91,49659864	8,503401361	3362500	312500	3362501	312501	6,52666242	5,4948514
	2	349	99	436,25	123,75	560	77,90178571	22,09821429	4362500	1237500	4362501	1237501	6,63973554	6,0925456
	3	337	50	421,25	62,5	483,75	87,08010336	12,91989664	4212500	625000	4212501	625001	6,62454002	5,7958807
	4	181	51	226,25	63,75	290	78,01724138	21,98275862	2262500	637500	2262501	637501	6,35458878	5,8044809
	5	317	100	396,25	125	521,25	76,01918465	23,98081535	3962500	1250000	3962501	1250001	6,59796938	6,0969104
	media	290,6	65,0	363,3	81,3	444,5	81,72103487	18,27896513	3632500	812500	3632501	812501	6,56020574	5,9098239
	DP	68,4	33,2	85,6	41,5	112,4	6,8	36,87957194	855569,985	414672,31	855571	414673,31	5,93225605	5,6177061
	EP	30,693094	14,8761367	38,36637	18,5952	50,4213	3,044440883	16,53792464	383663,671	185951,71	383664,1	185952,16	2,66020451	2,5191507
48 horas	1	370	15	462,5	18,75	481,25	96,1038961	3,896103896	4625000	187500	4625001	187501	6,66511183	5,2730036
	2	379	67	473,75	83,75	557,5	84,97757848	15,02242152	4737500	837500	4737501	837501	6,67554931	5,9229853
	3	560	42	700	52,5	752,5	93,02325581	6,976744186	7000000	525000	7000001	525001	6,8450981	5,7201601
	4	699	74	873,75	92,5	966,25	90,42690815	9,57309185	8737500	925000	8737501	925001	6,94138724	5,9661422
	5	465	30	581,25	37,5	618,75	93,93939394	6,060606061	5812500	375000	5812501	375001	6,76436304	5,5740324
	media	494,6	45,6	618,25	57	675,25	91,55868197	8,44131803	6182500	570000	6182501	570001	6,7911642	5,7558756
	DP	137,67825	24,7850762	172,0978	30,9813	190,619	4,271174846	16,25305059	1720978,1	309813,45	1720979	309814,45	6,2357756	5,4911017
	EP	61,739125	11,1143839	77,17391	13,893	85,4792	1,915325043	7,288363491	771739,059	138929,8	771739,5	138930,25	2,79631193	2,4623774
7 dias	1	355	19	443,75	23,75	467,5	94,9197861	5,080213904	4437500	237500	4437501	237501	6,64713846	5,3756654
	2	665	47	831,25	58,75	890	93,3988764	6,601123596	8312500	587500	8312501	587501	6,91973171	5,7690086
	3	74	11	92,5	13,75	106,25	87,05882353	12,94117647	925000	137500	925001	137501	5,9661422	5,1383059
	4	282	21	352,5	26,25	378,75	93,06930693	6,930693069	3525000	262500	3525001	262501	6,54715924	5,419131
	5	567	53	708,75	66,25	775	91,4516129	8,548387097	7087500	662500	7087501	662501	6,85049313	5,8211865
	media	388,6	30,2	485,75	37,75	523,5	92,78892073	7,211079274	4857500	377500	4857501	377501	6,6864129	5,5769181
	DP	234,35507	18,5795587	292,9438	23,2244	314,548	3,014104859	7,38344613	2929438,41	232244,48	2929439	232245,48	6,46678452	5,3659473
	EP	105,09196	8,33164065	131,365	10,4146	141,053	1,351616529	3,31096239	1313649,51	104145,51	1313650	104145,96	2,89990337	2,4062544

S= salina

## Anexo 2 - Análise Estatística (ANOVA) - Teste de Viabilidade Celular

**Scheffe for mac vivos**

**Effect: Column 1**

**Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
salina, 6h	,244	,451	,5826
salina, 12h	,031	,451	>,9999
salina, 24h	,130	,451	,9520
salina, 48h	-,100	,451	,9842
salina, 7d	,092	,451	,9892
6h, 12h	-,213	,451	,7101
6h, 24h	-,114	,451	,9718
6h, 48h	-,344	,451	,2191
6h, 7d	-,152	,451	,9098
12h, 24h	,099	,451	,9850
12h, 48h	-,131	,451	,9502
12h, 7d	,061	,451	,9984
24h, 48h	-,230	,451	,6425
24h, 7d	-,037	,451	,9999
48h, 7d	,192	,451	,7900

**Scheffe for mac mortos****Effect: Column 1****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
salina, 6h	,027	,560	>,9999
salina, 12h	-,215	,560	,8528
salina, 24h	-,489	,560	,1146
salina, 48h	-,324	,560	,5118
salina, 7d	-,137	,560	,9758
6h, 12h	-,242	,560	,7816
6h, 24h	-,516	,560	,0847
6h, 48h	-,350	,560	,4248
6h, 7d	-,164	,560	,9486
12h, 24h	-,274	,560	,6792
12h, 48h	-,109	,560	,9915
12h, 7d	,078	,560	,9982
24h, 48h	,166	,560	,9459
24h, 7d	,352	,560	,4181
48h, 7d	,187	,560	,9131

Anexo 3 - Contagem Global e Diferencial de Leucócitos

Grupos experimentais	animal	CGL	Total Leu	mon	VR mon	lin	VR lin	neu	VR neu	eos	VR eos
Controle negativo	1	203	10657,5	9	191,835	454	9677,01	35	746,025	2	42,63
	2	176	9240	7	129,36	428	7909,44	57	1053,36	7	129,36
	3	133	6982,5	4	55,86	391	5460,315	99	1382,535	6	83,79
	4	138	7245	4	57,96	398	5767,02	74	1072,26	24	347,76
	5	269	14122,5	5	141,225	396	11185,02	79	2231,355	20	564,9
salina	1	266	13965	2	55,86	423	11814,39	51	1424,43	24	670,32
	2	117	6142,5	0	0	447	5491,39	45	552,82	8	98,28
	3	218	11445	3	68,67	424	9705,36	68	1556,52	5	114,45
	4	95	4987,5	3	29,92	462	4608,45	28	279,30	7	69,82
	5	85	4462,5	4	35,70	440	3927,00	33	294,52	23	205,27
6 horas	1	87	4567,5	6	54,81	355	3242,92	133	1214,95	6	54,81
	2	129	6772,5	2	27,09	412	5580,54	80	1083,6	6	81,27
	3	107	5617,5	4	44,94	302	3392,97	181	2033,53	13	146,05
	4	70	3675	10	73,50	271	1991,85	212	1558,20	7	51,45
	5	79	4147,5	3	24,85	405	3359,47	77	638,715	15	124,42
12 horas	1	184	9660	3	57,96	415	8017,8	78	1506,96	4	77,28
	2	125	6562,5	13	170,625	378	4961,25	106	1391,25	3	39,375
	3	168	8820	6	105,84	414	7302,96	70	1234,8	10	176,4
	4	115	6037,5	1	12,075	455	5494,125	39	470,925	4	48,3
	5	84	4410	1	8,82	433	3819,06	61	538,02	5	44,1
24 horas	1	93	4882,5	4	39,06	433	4228,245	57	556,605	6	58,59
	2	51	2677,5	1	5,355	423	2265,165	71	380,205	5	26,775
	3	180	9450	5	94,5	414	7824,6	69	1304,1	12	226,8
	4	206	10815	8	173,04	402	8695,26	73	1578,99	17	367,71
	5	135	7087,5	6	85,05	404	5726,7	66	935,55	24	340,2
48 horas	1	125	6562,5	2	26,25	469	6155,625	23	301,875	6	78,75
	2	244	12810	3	76,86	454	11631,48	43	1101,66	0	0
	3	206	10815	62	1341,06	390	8435,7	31	670,53	15	324,45
	4	72	3780	2	15,12	430	3250,8	64	483,84	4	30,24
	5	143	7507,5	5	75,075	456	6846,84	33	495,495	6	90,09
7 dias	1	224	11760	0	0	404	9502,08	83	1952,16	13	305,76
	2	177	9292,5	0	0	423	7861,455	66	1226,61	11	204,435
	3	275	14437,5	3	86,625	420	12127,5	59	1703,625	18	519,75
	4	80	4200	2	16,8	360	3024	112	940,8	26	218,4
	5	72	3780	2	15,12	416	3144,96	81	612,36	1	7,56

## Anexo 4 – Análise Estatística (ANOVA) para Leucócitos

### Fisher's PLSD for CGL

Effect: Column 1

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
controle, salina	1449,000	4329,716	,4986	S
controle, 6h	4693,500	4329,716	,0346	
controle, 12h	2551,500	4329,716	,2375	
controle, 24h	2667,000	4329,716	,2174	
controle, 48h	2740,500	4329,716	,2054	
controle, 7d	966,000	4329,716	,6512	
salina, 6h	3244,500	4329,716	,1360	
salina, 12h	1102,500	4329,716	,6061	
salina, 24h	1218,000	4329,716	,5691	
salina, 48h	1291,500	4329,716	,5461	
salina, 7d	-483,000	4329,716	,8209	
6h, 12h	-2142,000	4329,716	,3196	
6h, 24h	-2026,500	4329,716	,3459	
6h, 48h	-1953,000	4329,716	,3634	
6h, 7d	-3727,500	4329,716	,0887	
12h, 24h	115,500	4329,716	,9568	
12h, 48h	189,000	4329,716	,9294	
12h, 7d	-1585,500	4329,716	,4594	
24h, 48h	73,500	4329,716	,9725	
24h, 7d	-1701,000	4329,716	,4277	
48h, 7d	-1774,500	4329,716	,4083	

**Fisher's PLSD for mon**

**Effect: Column 1**

**Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
controle, salina	77,217	66,841	,0251	S
controle, 6h	70,203	66,841	,0402	S
controle, 12h	44,184	66,841	,1865	
controle, 24h	35,847	66,841	,2813	
controle, 48h	35,847	66,841	,2813	
controle, 7d	67,977	66,841	,0465	S
salina, 6h	-7,014	66,841	,8314	
salina, 12h	-33,033	66,841	,3201	
salina, 24h	-41,370	66,841	,2153	
salina, 48h	-41,370	66,841	,2153	
salina, 7d	-9,240	66,841	,7791	
6h, 12h	-26,019	66,841	,4319	
6h, 24h	-34,356	66,841	,3014	
6h, 48h	-34,356	66,841	,3014	
6h, 7d	-2,226	66,841	,9461	
12h, 24h	-8,337	66,841	,8002	
12h, 48h	-8,337	66,841	,8002	
12h, 7d	23,793	66,841	,4720	
24h, 48h	0,000	66,841	•	
24h, 7d	32,130	66,841	,3332	
48h, 7d	32,130	66,841	,3332	

**Fisher's PLSD for linfocito****Effect: Column 1****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
controle, salina	890,442	3651,231	,6213	
controle, 6h	4486,209	3651,231	,0178	S
controle, 12h	2080,722	3651,231	,2529	
controle, 24h	2251,767	3651,231	,2169	
controle, 48h	1726,620	3651,231	,3410	
controle, 7d	896,007	3651,231	,6191	
salina, 6h	3595,767	3651,231	,0533	
salina, 12h	1190,280	3651,231	,5097	
salina, 24h	1361,325	3651,231	,4514	
salina, 48h	836,178	3651,231	,6426	
salina, 7d	5,565	3651,231	,9975	
6h, 12h	-2405,487	3651,231	,1880	
6h, 24h	-2234,442	3651,231	,2204	
6h, 48h	-2759,589	3651,231	,1328	
6h, 7d	-3590,202	3651,231	,0537	
12h, 24h	171,045	3651,231	,9242	
12h, 48h	-354,102	3651,231	,8440	
12h, 7d	-1184,715	3651,231	,5117	
24h, 48h	-525,147	3651,231	,7705	
24h, 7d	-1355,760	3651,231	,4533	
48h, 7d	-830,613	3651,231	,6448	

**Fisher's PLSD for neutrofilo****Effect: Column 1****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
controle, salina	475,587	719,494	,1866
controle, 6h	-8,694	719,494	,9804
controle, 12h	268,716	719,494	,4506
controle, 24h	346,017	719,494	,3330
controle, 48h	346,017	719,494	,3330
controle, 7d	-27,384	719,494	,9384
salina, 6h	-484,281	719,494	,1789
salina, 12h	-206,871	719,494	,5606
salina, 24h	-129,570	719,494	,7150
salina, 48h	-129,570	719,494	,7150
salina, 7d	-502,971	719,494	,1632
6h, 12h	277,410	719,494	,4363
6h, 24h	354,711	719,494	,3212
6h, 48h	354,711	719,494	,3212
6h, 7d	-18,690	719,494	,9579
12h, 24h	77,301	719,494	,8274
12h, 48h	77,301	719,494	,8274
12h, 7d	-296,100	719,494	,4064
24h, 48h	0,000	719,494	•
24h, 7d	-373,401	719,494	,2968
48h, 7d	-373,401	719,494	,2968

**Fisher's PLSD for eos****Effect: Column 1****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
controle, salina	2,058	210,784	,9842
controle, 6h	142,086	210,784	,1783
controle, 12h	156,597	210,784	,1393
controle, 24h	29,673	210,784	,7752
controle, 48h	184,548	210,784	,0837
controle, 7d	29,316	210,784	,7778
salina, 6h	140,028	210,784	,1844
salina, 12h	154,539	210,784	,1443
salina, 24h	27,615	210,784	,7904
salina, 48h	182,490	210,784	,0870
salina, 7d	27,258	210,784	,7930
6h, 12h	14,511	210,784	,8889
6h, 24h	-112,413	210,784	,2840
6h, 48h	42,462	210,784	,6830
6h, 7d	-112,770	210,784	,2825
12h, 24h	-126,924	210,784	,2277
12h, 48h	27,951	210,784	,7879
12h, 7d	-127,281	210,784	,2264
24h, 48h	154,875	210,784	,1435
24h, 7d	-,357	210,784	,9973
48h, 7d	-155,232	210,784	,1426

## Anexo 5 - Ensaio de Micronúcleo em Eritrócitos de Medula Óssea de Camundongos

tratamento	Animal	ENC	MNENC	EPC	MNEPC	%EPC
Salina	1	2000	0	1323	2	39,81
	2	1876	1	1997	1	51,56
	3	1423	0	2000	3	58,42
	4	2000	0	1887	1	48,54
	5	1868	1	2000	0	51,7
24 horas	1	1873	1	2000	3	51,63
	2	1300	0	2000	2	60,6
	3	1713	1	2000	2	53,86
	4	1844	1	2000	2	52,02
	5	1418	0	2000	3	58,51
48 horas	1	2000	1	1423	3	41,57
	2	2000	1	1843	1	47,95
	3	1998	1	1946	2	49,34
	4	1672	1	2000	4	54,46
	5	1386	3	2000	5	59,06
7 dias	1	2000	0	1392	2	41,03
	2	1401	0	2000	3	58,8
	3	2000	0	1719	1	46,22
	4	1918	0	2000	2	51,04
	5	2000	2	1210	4	37,69
CP	1	1954	3	1995	28	50,51
	2	2000	2	1283	30	39,08
	3	2000	1	1355	80	40,38
	4	1942	3	1860	50	48,92
	5	1964	2	2000	54	50,45

CP – controle positivo (ciclofosfamida 40mg/Kg)

ENC – eritrócito normocromático

PCE – eritrócito policromático

NM - Micronúcleo

Anexo 6 - - Análise estatística do Ensaio Micronúcleo – Mann- Whitney (p<0,05)

Mann-Whitney U Test (new.sta)										
By variable										
GRUPOS		CP x S								
Group 1: 1 Group 2: 2										
	Rank Sum	Rank Sum				Z		Valid N	Valid N	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group 1	Group 2	exact p
MNENC	39	16	1	2,402272	0,016299	2,478553	0,013197	5	5	0,015873
MNEPC	40	15	0	2,611165	0,009028	2,619114	0,00882	5	5	0,007937
%EPC	22	33	7	-1,14891	0,250601	-1,14891	0,250601	5	5	0,309524
Mann-Whitney U Test (new.sta)										
By variable		CP x 24 h								
GRUPOS										
Group 1: 1 Group 2: 3										
	Rank Sum	Rank Sum				Z		Valid N	Valid N	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group 1	Group 2	exact p
MNENC	38,5	16,5	1,5	2,297825	0,021578	2,394072	0,016668	5	5	0,015873
MNEPC	40	15	0	2,611165	0,009028	2,65165	0,008014	5	5	0,007937
%EPC	15	40	0	-2,61116	0,009028	-2,61116	0,009028	5	5	0,007937
Mann-Whitney U Test (new.sta)										
By variable		CP x 48 h								
GRUPOS										
Group 1: 1 Group 2: 4										
	Rank Sum	Rank Sum				Z		Valid N	Valid N	2*1sided

	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group 1	Group 2	exact p
MNENC	34	21	6	1,357806	0,174535	1,474061	0,140475	5	5	0,222222
MNEPC	40	15	0	2,611165	0,009028	2,611165	0,009028	5	5	0,007937
%EPC	23	32	8	-0,94002	0,347215	-0,94002	0,347215	5	5	0,420635
Mann-Whitney U Test (new.sta)			CP x 7 d							
By variable GRUPOS										
Group 1: 1 Group 2: 5										
	Rank Sum	Rank Sum				Z		Valid N	Valid N	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group 1	Group 2	exact p
MNENC	35	10	0	2,44949	0,014311	2,581989	0,009828	5	4	0,015873
MNEPC	35	10	0	2,44949	0,014311	2,45976	0,013908	5	4	0,015873
%EPC	21	24	6	-0,9798	0,327194	-0,9798	0,327194	5	4	0,412698
Mann-Whitney U Test (new.sta)			S x 24 h							
By variable GRUPOS										
Group 1: 2 Group 2: 3										
	Rank Sum	Rank Sum				Z		Valid N	Valid N	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group 1	Group 2	exact p
MNENC	25	30	10	-0,52223	0,601512	-0,6	0,54851	5	5	0,690476
MNEPC	20,5	34,5	5,5	-1,46225	0,143682	-1,53362	0,125132	5	5	0,150794
%EPC	19	36	4	-1,77559	0,07581	-1,77559	0,07581	5	5	0,095238
Mann-Whitney U Test (new.sta)			S x 48 h							
By variable GRUPOS										
Group 1: 2 Group 2: 4										
	Rank	Rank				Z		Valid N	Valid N	2*1sided

	Sum	Sum								
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group 1	Group 2	exact p
MNENC	19	36	4	-1,77559	0,07581	-2,03189	0,042173	5	5	0,095238
MNEPC	20	35	5	-1,5667	0,117195	-1,59599	0,110502	5	5	0,150794
%EPC	27	28	12	-0,10445	0,916816	-0,10445	0,916816	5	5	1
Mann-Whitney U Test (new.sta)			S x 7 d							
By variable GRUPOS										
Group 1: 2 Group 2: 5										
	Rank Sum	Rank Sum				Z		Valid N	Valid N	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group 1	Group 2	exact p
MNENC	29	16	6	0,979796	0,327194	1,352247	0,176306	5	4	0,412698
MNEPC	21,5	23,5	6,5	-0,85732	0,391274	-0,8914	0,372721	5	4	0,412698
%EPC	26	19	9	0,244949	0,806498	0,244949	0,806498	5	4	0,904762
Mann-Whitney U Test (new.sta)			24 h x 48 h							
By variable GRUPOS										
Group 1: 3 Group 2: 4										
	Rank Sum	Rank Sum				Z		Valid N	Valid N	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group 1	Group 2	exact p
MNENC	21	34	6	-1,35781	0,174535	-1,67829	0,0933	5	5	0,222222
MNEPC	24,5	30,5	9,5	-0,62668	0,530874	-0,65509	0,512416	5	5	0,547619
%EPC	33	22	7	1,148913	0,250601	1,148913	0,250601	5	5	0,309524
Mann-Whitney U Test (new.sta)			24 h x 7 d							
By variable GRUPOS										
Group 1: 3 Group 2: 5										

