

LUCIANA LANDIM CARNEIRO ESTEVANATO

**INVESTIGAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE
POLÍMEROS DE ALBUMINA MAGNÉTICOS
EM CAMUNDONGOS**

**Brasília-DF
2008**

LUCIANA LANDIM CARNEIRO ESTEVANATO

**INVESTIGAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE
POLÍMEROS DE ALBUMINA MAGNÉTICOS
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Brasília-DF

2008

Dedico este trabalho aos meus pais, Lázaro e Lúcia, que batalharam muito para eu ter conquistado mais esta vitória. O que sou hoje devo aos ensinamentos e apoio de vocês.

Ao meu querido esposo e companheiro, Bruno, que me apoiou durante todo o mestrado e me incentiva sempre a crescer. Obrigada pela dedicação, pela paciência e, acima de tudo, pelo seu amor. Obrigada por tudo! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Santo Inácio de Loyola, por sempre iluminarem o meu caminho e, especialmente, por todas as graças recebidas.

À professora Zulmira Guerrero Marques Lacava, por ter me dado esta oportunidade. Muito obrigada pela atenção, paciência, conselhos e, principalmente, pelos ensinamentos. Espero que continuemos trabalhando juntas por mais alguns anos.

Ao meu orientador de monografia e iniciação científica durante a graduação, José Marcus Sócrates Teixeira, pelas oportunidades, por ter acreditado no meu potencial e por me incentivar a continuar na área de pesquisa.

Ao professor Antônio Cláudio Tedesco, à Andreza Simioni e ao colega Bruno Lacava, por terem preparado e cedido a amostra utilizada neste trabalho.

Às professoras Silene Lozzi, Sônia Bão e Maria de Fátima Verdeaux, por terem aceitado participar da banca de defesa desta dissertação e pelas importantes sugestões dadas para melhora deste trabalho.

À professora Izabel Cristina Silva, pela preciosa ajuda e orientação durante as análises estatísticas.

À professora Mônica Garcia, pelo importante auxílio na análise das lâminas histológicas.

Ao doutorando Leandro Carlos Figueiredo por realizar a caracterização da amostra utilizada neste trabalho.

À mestrande Débora de Oliveira Cintra e Silva por igualmente ajudar na caracterização da amostra. Muito obrigada, também, pelas trocas de idéias, dicas e, principalmente, pela companhia e por agüentar o meu repertório musical durante as coletas. Espero que continuemos trabalhando juntas por mais um tempo.

Às grandes pesquisadoras Adriana Brugin, Camila Arruda, Danielle Peixoto, Débora Silva, Flávia Portilho, Júlia Poubel, Lane Barbosa, Neda Sadeghiani, Marcela Carneiro e Mírian Cândida, minhas queridas companheiras de laboratório, com as quais aprendi muito durante esses anos de convivência. Muito obrigada por toda ajuda durante os experimentos, dicas e, principalmente, pela amizade. Adoro vocês!

À querida Eliza, por toda ajuda, companhia e, especialmente, pela amizade. Espero um dia poder retribuí-la.

Às alunas de iniciação científica Mary-Ann Xavier e Nayara Baldini, pela ajuda e apoio. Acredito que o futuro profissional de vocês será muito promissor.

Aos colegas do Laboratório de Genética: Arthur, Penha, Letícia, Leonora, Maria Emília (Mila), Ana Luíza, Ana Elizabeth, Carol e Ornil.

Ao Djalma Santos, pelas dicas e grande auxílio no preparo das lâminas histológicas.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Mariana, por simplesmente fazerem parte da minha vida. À minha cunhada, Renata, e ao meu sobrinho, que está a caminho e que trará grandes alegrias à nossa família. Amo vocês!

Aos meus sogros, Leíse e Vicente, e às minhas cunhadas, Luciana e Lílian, por me incentivarem a continuar buscando o meu crescimento profissional. Muito obrigada por terem me recebido tão bem na família de vocês!

Às minhas queridas amigas e companheiras de graduação Carol, Elaine, Perla e Priscila. Acredito muito no potencial de vocês e tenho certeza que seremos muito bem sucedidas profissionalmente. Vocês sempre serão especiais pra mim!

À CAPES, CNPq, FINATEC, FAP-DF, CNANO e à Rede de Nanobiomagnetismo (CNPq-MCT), pelo auxílio financeiro para realização desta pesquisa.

E, finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram no desenvolvimento deste estudo e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

“As pessoas sempre conseguem alcançar algum tipo de resultado. Os super sucessos de nossa cultura não são pessoas que não falham, mas simplesmente pessoas que sabem que se tentarem alguma coisa e não obtiverem o resultado desejado, pelo menos terão tido uma experiência de aprendizado”.

(Anthony Robbins)

RESUMO

A nanotecnologia é uma área envolvida na pesquisa e desenvolvimento de materiais que apresentam pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica. Dentre os materiais nanoestruturados, as nanopartículas magnéticas (NPMs) são de grande interesse em aplicações biomédicas, seja no diagnóstico ou no tratamento de diversas doenças. Este trabalho teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade de polímeros de albumina magnéticos (PAMs), compostos por nanopartículas de maghemita contidas em um fluido magnético iônico, subseqüentemente encapsuladas em polímeros de albumina e injetados intraperitonealmente em camundongos fêmeas Swiss. Foram realizadas análises citométricas, teste de viabilidade dos leucócitos peritoneais e análise histológica dos órgãos fígado, pulmões e baço, após 30 minutos; 6, 12, 24 e 48 horas; e 7, 15 e 30 dias da administração de PAMs liofilizados ressuspensos em soro fetal bovino (SFB). Avaliação da genotoxicidade e da citotoxicidade dos PAMs, nos eritrócitos da medula óssea, também foi realizada a partir de 24 horas da aplicação da amostra. Foi verificado que a amostra causa alterações em algumas populações leucocitárias e afeta a viabilidade das células peritoneais, porém essas mudanças foram leves e temporárias. Além disso, a amostra estudada não causa qualquer efeito genotóxico e citotóxico aos eritrócitos da medula óssea. Não foi possível visualizar, por microscopia de luz, a presença de aglomerados de nanopartículas nos órgãos estudados, exceto nos pulmões de um animal analisado após 24 horas da aplicação da amostra. Não foi verificada qualquer alteração histológica no fígado e no baço, porém os pulmões de todos os animais analisados apresentaram septos alveolares espessados e infiltrados inflamatórios, embora tais efeitos também tenham sido encontrados nos grupos tratados com SFB utilizado como diluente da amostra liofilizada. Os resultados observados indicam que os PAMs podem ser considerados biocompatíveis nas condições estudadas, com potencial significativo para aplicações biomédicas.

Palavras-chave: biocompatibilidade, nanopartículas magnéticas, albumina.

ABSTRACT

Nanotechnology is an area related to the research and development of materials that present at least one of its dimensions in nanometric scale. Among the nanostructured materials, the magnetic nanoparticles represent an interesting use in biomedical applications, in both diagnosis and treatment of several diseases. The aim of the present research was to study the biocompatibility of magnetic albumin polymers (PAMs) intraperitoneally injected in Swiss female mice. PAM was developed from maghemite nanoparticles contained in an ionic magnetic fluid sample encapsulated in albumin polymers. Cytometry analysis, viability test of peritoneal leukocytes, and histological analysis of liver, lungs, and spleen were done 30 minutes; 6, 12, 24 and 48 hours; and 7, 15 and 30 days after the administration of lyophilized PAMs diluted in bovine serum albumin (BSA). Evaluation of PAMs genotoxicity and cytotoxicity in bone marrow erythrocytes, was done 24 hours after the sample application. It was verified that PAMs cause alterations in some leukocyte populations and affect the viability of peritoneal cells; however these changes are light and temporary. More over, the studied sample does not present any genotoxicity or cytotoxicity effects in bone marrow erythrocytes. It was not possible to visualize by light microscopy analysis the presence of nanoparticle clusters in the investigated organs, except in the lungs of one animal analysed 24 hours after the sample application. It was not verified any histological alteration in the liver and spleen, but all animals lungs presented alveolar septa thickening and inflammatory infiltration, although these effects have been also found in control animals treated with the dilution solution BSA. The data suggest that in the used experimental conditions, the sample PAM can be considered as a biocompatible one, with significant potential for biomedical applications.

Key-words: biocompatibility, magnetic nanoparticles, albumin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Número de artigos publicados sobre nanopartículas magnéticas	14
Figura 2: Estrutura esquemática dos PAMs	25
Figura 3: Camundongos fêmeas da linhagem Swiss	26
Figura 4: Representação da câmara de Neubauer	28
Figura 5: Eritrócitos policromáticos e normocromáticos	31
Figura 6: Fotomicrografias dos PAMs e das nanopartículas de maghemita	36
Figura 7: Histograma do diâmetro médio dos PAMs	37
Figura 8: Histograma do diâmetro médios das nanopartículas de maghemita	37
Figura 9: Contagem global de leucócitos do sangue de camundongos	39
Figura 10: Contagem de linfócitos do sangue de camundongos	40
Figura 11: Contagem de neutrófilos do sangue de camundongos	41
Figura 12: Contagem de eosinófilos do sangue de camundongos	42
Figura 13: Contagem de monócitos do sangue de camundongos	43
Figura 14: Contagem de macrófagos peritoneais de camundongos	44
Figura 15: Contagem de linfócitos peritoneais de camundongos	45
Figura 16: Contagem de neutrófilos peritoneais de camundongos	46
Figura 17: Contagem de eosinófilos peritoneais de camundongos	47
Figura 18: Contagem de mastócitos peritoneais de camundongos	48
Figura 19: Porcentagem de células peritoneais viáveis	49
Figura 20: Freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos	50
Figura 21: Freqüência de micronúcleos em eritrócitos normocromáticos	51
Figura 22: Percentual de eritrócitos policromáticos	52
Figura 23: Fotomicrografias de fígado de camundongos	55
Figura 24: Fotomicrografias de fígado de camundongos	56
Figura 25: Fotomicrografias de pulmão de camundongos	59
Figura 26: Fotomicrografias de pulmão de camundongos	60
Figura 27: Fotomicrografias de pulmão de camundongos	61
Figura 28: Fotomicrografias de baço de camundongos	64
Figura 29: Fotomicrografias de baço de camundongos	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- CGL:** Contagem global de leucócitos
- DMSA:** Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico
- DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- ENC:** Eritrócito normocromático
- EPC:** Eritrócito policromático
- MET:** Microscopia eletrônica de transmissão
- MN:** Micronúcleo
- NP:** Nanopartícula
- NPM:** Nanopartícula magnética
- PAMs:** Polímeros de albumina magnéticos
- RNA:** Ácido ribonucléico
- RPME:** Ressonância paramagnética eletrônica
- SFB:** Soro fetal bovino
- SPARC:** Proteína ácida rica em cisteína

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Amostra	25
4.1.1. Caracterização dos PAMs e das NPs de maghemita por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	26
4.2. Animais	26
4.3. Análise Citométrica	27
4.3.1. Contagem global de leucócitos (CGL)	27
4.3.2. Contagem diferencial de leucócitos do sangue	28
4.3.3. Contagem diferencial dos leucócitos peritoneais	29
4.4. Avaliação da Viabilidade das Células Peritoneais	29
4.5. Análise Genotóxica e Citotóxica	30
4.6. Análise Estatística	32
4.7. Análise Histológica	32
5. RESULTADOS	35
5.1. Caracterização dos PAMs e das nanopartículas de maghemita	36
5.2. Análise Citométrica	38
5.2.1. Contagem global de leucócitos (CGL)	39
5.2.2. Contagem diferencial de leucócitos do sangue	40
5.2.3. Contagem diferencial dos leucócitos peritoneais	44
5.3. Avaliação da Viabilidade das Células Peritoneais	49
5.4. Análise Genotóxica e Citotóxica	50
5.4.1. Avaliação da genotoxicidade dos PAMs	50
5.4.2. Avaliação da citotoxicidade dos PAMs	52

5.5. Análise Histológica	53
5.5.1. Fígado	53
5.5.2. Pulmões	57
5.5.3. Baço	62
6. DISCUSSÃO	66
6.1. Considerações Sobre a Amostra PAM	67
6.2. Considerações sobre as NPs de maghemita	70
6.3. Considerações sobre os efeitos dos PAMs na análise citométrica do sangue periférico	77
6.4. Considerações sobre os efeitos dos PAMs na contagem diferencial de leucócitos peritoneais	75
6.5. Considerações sobre a ação dos PAMs sobre a viabilidade das células peritoneais	78
6.6. Considerações sobre os efeitos dos PAMs nas análises genotóxica e citotóxica na medula óssea	79
6.7. Considerações sobre a análise histológica	82
6.8. Considerações finais e perspectivas	87
7. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

Nanotecnologia é um ramo da ciência envolvida na pesquisa e desenvolvimento de materiais que apresentam pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica e que, devido à pequena escala, possuem propriedades e comportamentos diferentes (Hussain et al., 2005; McNeil, 2005). Nano é o prefixo usado para designar uma parte em um bilhão, assim, um nanômetro equivale a um bilionésimo de um metro (Silva, 2004; Sahoo et al., 2007).

O conceito de nanotecnologia surgiu em 1959, com uma palestra ministrada pelo físico Richard Feynman, que explorou a possibilidade de manipular átomos e moléculas, o que permitiria construir novos materiais que não surgem naturalmente na natureza e que apresentariam propriedades diferentes. Entretanto, o termo “nanotecnologia” foi usado pela primeira vez somente em 1974 quando Norio Taniguchi, um pesquisador da Universidade de Tóquio, usou essa palavra para se referir à capacidade de desenvolver materiais na escala nanométrica (Sahoo et al., 2007). A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que inclui conhecimentos da biologia, química, física, matemática, engenharia, computação e de outros ramos da ciência (Melo e Pimenta, 2004; Medeiros et al., 2006).

Uma das áreas de interesse da nanobiotecnologia é a utilização de nanocompostos em aplicações terapêuticas e de diagnóstico. Entre essas nanoestruturas estão incluídas as nanopartículas magnéticas, lipossomas, nanocápsulas, nanoesferas, nanotubos de carbono, fulerenos e dendrímeros. Tais nanocompostos são de grande interesse na biotecnologia uma vez que apresentam dimensões comparáveis à de vírus (20 a 450 nm), proteínas (5 a 50 nm) e até mesmo do gene (2 nm) (Pankhurst et al., 2003). As nanopartículas magnéticas serão melhor abordadas por serem os objetos deste trabalho.

As nanopartículas magnéticas (NPMs) são geralmente compostas por um núcleo de ferro, mais comumente de magnetita (Fe_3O_4) ou de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Gupta e Gupta, 2005a). Para aplicação biomédica, as NPMs devem atravessar a barreira endotelial e se acumular especificamente nas células-alvo, sem danificar as células normais. Essa característica é alcançada recobrando-se as nanopartículas (NPs) com um composto biocompatível ao qual podem ser associadas diferentes moléculas biológicas, como anticorpos, que vão possibilitar maior direcionamento das partículas.

As NPMs podem ser utilizadas para aumentar o contraste nos exames de imagem por ressonância magnética, para a indução de hipertermia como forma de

tratamento do câncer, para permitir melhor direcionamento de drogas, terapia gênica, separação magnética, entre outras utilizações biomédicas (Berry e Curtis, 2003; Parkhurst et al., 2003; Lacava e Morais, 2004; Gupta e Gupta, 2005a; Moghimi et al., 2005; Pison et al., 2006; Nie et al., 2007). Devido às várias aplicações das NPMs, cada vez mais pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre suas características e aplicações, como pode ser observado na Figura 1, que apresenta o número de artigos publicados nos anos de 1998 a 2007, utilizando a palavra-chave “*magnetic nanoparticles*” (nanopartículas magnéticas), conforme pesquisa no *ISI Web of Knowledge*.

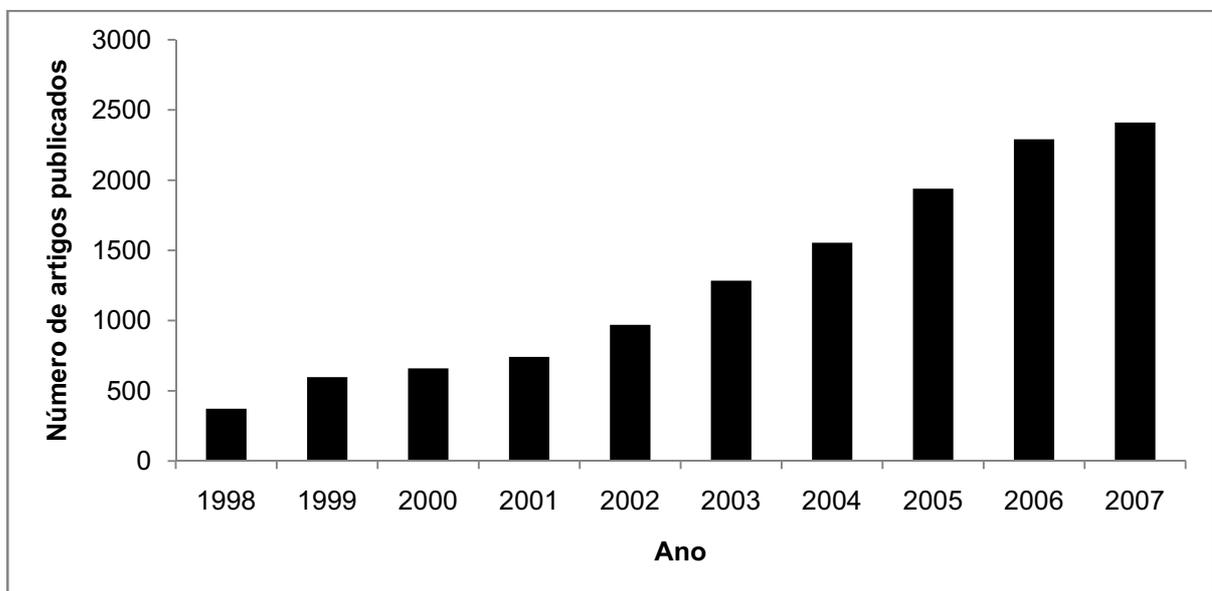


Figura 1: Número de artigos publicados utilizando a palavra-chave “*magnetic nanoparticles*”. Pesquisa realizada no dia 10/01/2008. Fonte: *ISI Web of Knowledge*

Tem sido crescente o interesse no uso de NPMs para o tratamento e diagnóstico de diversas doenças, especialmente o câncer. Câncer é o nome conferido ao conjunto de doenças caracterizadas pela divisão celular descontrolada, em que os mecanismos normais que regulam o crescimento e a divisão celular foram interrompidos, e pela capacidade dessas células de invadirem outros tecidos. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2007), 7 milhões de pessoas morrem anualmente devido ao câncer e estima-se que em 2020 o número de casos novos seja em torno de 15 milhões ao ano. Em 2004, no Brasil, 141 mil óbitos devido a tumores malignos foram registrados (INCA, 2006) e estima-se a ocorrência de 466 mil novos casos em 2008 (INCA, 2007).

Dentre os tradicionais tratamentos contra o câncer, encontram-se a quimioterapia e a radioterapia, mas também pode-se fazer a retirada total ou parcial do tumor. A quimioterapia é o tratamento mais utilizado, porém a maioria dos agentes quimioterápicos são muito tóxicos e inespecíficos, causando danos também às células sadias (Feng e Chien, 2003; Chunfu et al., 2004). Já a remoção cirúrgica do câncer e dos tecidos ao redor muitas vezes é efetiva, porém a sua realização depende da localização do tumor, e também podem ocorrer complicações pós-operatórias com seqüelas físicas e emocionais. Dessa forma, a utilização de NPMs surge como uma alternativa não só no tratamento, como também no diagnóstico do câncer, na tentativa de diminuir as quantidades de doses necessárias por promover maior direcionamento para o tumor, minimizando assim os efeitos colaterais, para aumentar a eficácia dos tratamentos tradicionais e permitir o diagnóstico precoce da doença (Chunfu et al., 2004; Heath e Davis, 2008).

As NPs podem se acumular naturalmente no tumor devido à maior permeabilidade e retenção características do tecido tumoral (Brigger et al., 2002). Isso ocorre porque o rápido crescimento do câncer requer grande quantidade de nutrientes que não é suportado pelos vasos sanguíneos adjacentes, fazendo com que a formação de novos vasos seja induzida. Além disso, devido à ausência de vasos linfáticos, a saída de moléculas do tumor é diminuída, fazendo com que as NPs fiquem mais tempo no local. A combinação de baixa drenagem com o aumento da permeabilidade vascular resulta em maior acúmulo de drogas e partículas no tumor (Parveen e Sahoo, 2006; Sahoo et al., 2007).

Muitas drogas existentes no mercado, especialmente as utilizadas no tratamento do câncer, causam severos efeitos colaterais. A associação desses medicamentos com sistemas de entrega de drogas representa uma importante alternativa para diminuir tais efeitos (Brigger et al., 2002; Jain et al., 2005). O desenvolvimento de sistemas baseados em NPs para entrega de drogas tem demonstrado, dependendo da formulação, estabilidade, maior taxa de absorção pelos tecidos biológicos, menos efeitos colaterais e maior especificidade, além de permitir uma liberação controlada (Chan, 2006; Nie et al., 2007; Torchilin, 2007). Nesse caso, os carreadores podem ser elaborados de forma a liberar a droga no local de interesse, sendo que essa liberação pode ser desencadeada por alterações no pH do meio ou por estímulos químicos. No caso das NPMs, pode-se ainda aplicar um campo magnético de frequência alternada que vai gerar um aumento local da

temperatura promovendo a liberação do medicamento. (Pankhurst et al., 2003; Moghimi et al., 2005; Torchilin, 2007). Além disso, um campo magnético externo pode ser utilizado para concentrar as NPMs no local de interesse. O direcionamento do fármaco para um local específico permite a diminuição da dose a ser administrada e, conseqüentemente, os efeitos colaterais (Pankhurst et al., 2003; Chunfu et al., 2004; Gupta e Gupta, 2005b).

Dentre os sistemas carreadores de fármacos, as NPs preparadas a partir de polímeros biodegradáveis são de grande interesse (Guterres et al., 2006), principalmente por não precisarem ser removidas, já que são degradadas pelo organismo, e por proporcionarem a liberação direta da droga na circulação sanguínea (Tedesco, 2006). Os polímeros sintético PLGA – poli(lático-co-glicólico) – e os poliacrilatos são os mais utilizados no preparo de sistemas de liberação controlada de drogas. Entretanto, estão sendo cada vez mais estudados biopolímeros como a albumina, hemoglobina e quitosana (Mu e Feng, 2003; Panyam e Labhassetwar, 2003).

Outro grande interesse na utilização de NPMs é na aplicação da magnetohipertermia (Guedes et al., 2004; Lacava, 2006). Após a associação das nanopartículas magnéticas às células cancerígenas, esses nanocompostos podem ser submetidos a um campo magnético de freqüência alternada, que faz com que as NPMs vibrem, provocando um aumento localizado da temperatura de até 8 °C, que causa a destruição preferencial das células tumorais, com menos efeitos nas células normais (Torchilin, 2007). A hipertermia destrói preferencialmente as células tumorais porque a dissipação do calor, para controle da temperatura corporal, ocorre principalmente por meio da circulação sanguínea. Como a circulação tumoral é irregular, as células tumorais são mais vulneráveis ao aumento da temperatura do que as células do tecido normal circunvizinho, que tem um eficiente fluxo sanguíneo (Mornet et al., 2004; Gupta e Gupta, 2005a). Além disso, as células cancerosas apresentam alta acidez causada pela incapacidade de expelir apropriadamente os produtos derivados do metabolismo anaeróbico. O aumento da temperatura ataca principalmente as células ácidas, uma vez que essas apresentam membrana celular mais frágil do que as células normais, além de apresentarem alterações de permeabilidade (Guffy et al., 1982). Dessa forma, o aumento da temperatura leva à desestabilização de proteínas celulares induzindo, assim, a morte celular (Kawashita et al, 2005).

A hipertermia também pode auxiliar no tratamento do câncer quando realizada juntamente com a radioterapia e a quimioterapia. A elevação da temperatura do tumor induz o aumento localizado da circulação sanguínea e, conseqüentemente, a quantidade de oxigênio na região tumoral. A presença de oxigênio é um fator essencial para a ação da radiação ionizante, uma vez que esta auxilia na destruição das células tumorais por meio da formação de radicais livres de oxigênio que atacam o DNA das mesmas. Células com baixo suprimento de oxigênio, como as células centrais do tumor, são mais resistentes à radiação ionizante do que as células normais, o que faz com que a radioterapia sozinha não seja tão efetiva (Mornet et al., 2004). Além disso, o aumento do fluxo sanguíneo para o tecido tumoral, induzido pela hipertermia, pode fazer com que maior quantidade de quimioterápico chegue ao local. O aumento da temperatura promove alterações no citoesqueleto celular, o que aumenta os poros tumorais facilitando a penetração de drogas. Dessa forma, a hipertermia pode ser uma forma auxiliar no tratamento do câncer, aumentando a eficácia de outros métodos convencionais.

Outra utilização das NPMs é na potencialização do contraste de imagens por ressonância magnética. Devido à alta densidade, as NPMs aumentam o contraste das imagens e quando associadas a anticorpos monoclonais, permitem a identificação de micrometástases mais precocemente e de forma mais eficiente (Brigger et al., 2002; Moghimi et al., 2005).

Para que estes novos nanocompostos possam ser usados em aplicações biomédicas, eles devem ser hemocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos ao organismo. Vários estudos têm sido desenvolvidos nos Laboratórios de Genética e Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, objetivando conhecer as características de biodistribuição, toxicidade e genotoxicidade de diferentes amostras de NPMs. Nanopartículas magnéticas iônicas de ferrita de manganês recobertas com citrato (Lacava et al., 1999a) ou com tartarato (Lacava et al., 1999b) foram injetadas intraperitonealmente em camundongos e provocaram alta toxicidade e mutagenicidade, não sendo consideradas biocompatíveis. Resultados semelhantes foram encontrados quando NPs de magnetita recobertas com dupla camada, composta por ácido dodecanóico e álcool etoxilado (Freitas et al., 2002), ou recobertas com ácido glucônico (Barbosa, 2004) foram utilizadas e os resultados foram dose e tempo dependentes. Entretanto, NPs de ferrita de cobalto recobertas com citrato (Kückelhaus, 2003), NPs de

magnetita recobertas com dextrana (Lacava, 2004) ou ácido poliaspártico (Sadeghiani, 2004) e NPs de maghemita recobertas com polifosfato (Portilho-Corrêa, 2007) ou citrato (Brugin, 2007) mostraram resultados promissores em relação ao seu potencial biomédico.

Um dos problemas encontrados pelo uso de partículas *in vivo* é a adsorção de elementos biológicos que vão afetar a sua distribuição. A biodistribuição depende do tamanho, carga e da cobertura das NPs. Partículas que têm a superfície muito hidrofóbica são rapidamente recobertas por componentes do plasma, principalmente fatores do complemento e anticorpos, que funcionam como opsoninas. As opsoninas agem facilitando a ligação de células fagocitárias, que retiram as partículas mais rapidamente da circulação evitando que elas atinjam o local de interesse (Illum e Davis, 1984; Berry et al., 2003; Garnett e Kallinteri, 2006). Já as partículas com superfície hidrofílica, podem permanecer mais tempo na circulação por não serem captadas tão rapidamente pelas células mononucleares fagocitárias (Lin et al., 1999). Em relação ao tamanho, as NPs com diâmetro de mais de 30 nm são mais rapidamente reconhecidas pelas células do sistema mononuclear fagocitário do que as nanopartículas em torno de 10 nm de diâmetro (Pankhurst et al., 2003). Alguns estudos mostram que NPs recobertas com albumina podem evitar temporariamente o reconhecimento pelas células fagocíticas (Leroux et al., 1995).

Neste trabalho foi avaliada a biocompatibilidade de polímeros de albumina magnéticos (PAMs). A albumina é usada como material para preparação de NPs uma vez que é a principal proteína do soro e é considerada não antigênica e biodegradável. Já existe uma droga aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*), para tratamento do câncer de mama, baseada em NPs de albumina (não-magnéticas) associadas com paclitaxel, um agente quimioterápico. O uso da albumina, um carreador natural, para a entrega dessa droga mostrou melhores resultados em comparação com a administração da droga livre, resultando em maior atividade antitumoral e menos efeitos colaterais em pacientes com câncer de mama metastático (Gradishar et al., 2005; Ibrahim et al., 2005).

As NPs associadas com albumina podem ser um importante instrumento no combate ao câncer, já que as células cancerosas superexpressam vários receptores para proteínas do soro e lipoproteínas. As células tumorais utilizam albumina e outras proteínas do plasma para sua nutrição, uma vez que elas servem como fonte de nitrogênio. Assim, NPs associadas com albumina são então captadas pelo tecido

neoplásico em uma taxa maior do que o tecido normal (Simioni et al., 2006). A associação de NPMs a drogas antineoplásicas ou a utilização de um campo magnético de frequência alternada para aumento da temperatura pode levar ao tratamento localizado do tumor, diminuindo a destruição de células sadias e, conseqüentemente, os efeitos colaterais.

Simioni et al. (2006, 2007) analisaram a citotoxicidade *in vitro* de diferentes concentrações de PAMs em macrófagos e verificaram baixa toxicidade das nanoestruturas contra essas células. No estudo publicado em 2007, foi ainda comparada a viabilidade entre macrófagos submetidos ou não ao campo magnético. Para a maior concentração de amostra utilizada ($2,28 \times 10^{14}$ partículas/cm³) foi observada branda toxicidade às células não submetidas ao campo, em torno de 18% de morte celular, enquanto que o efeito do campo magnético induziu a morte de aproximadamente 70% das células, possivelmente devido à magnetohipertermia promovida pelas NPMs. Esses resultados mostraram que os PAMs são bons candidatos para análises *in vivo*.

O câncer é um conjunto de doenças de incidência crescente que demanda novas formas de tratamento, uma vez que as terapias convencionais têm efeitos adversos severos. Dentre essas novas formas foi proposto o uso de nanopartículas magnéticas (NPMs) para fazer o diagnóstico precoce de micrometástases e mediar a magnetohipertermia. Por se tratar de novos biomateriais, nanocompósitos constituídos de nanopartículas de magnetita, maghemita ou de ferrita de cobalto, além de serem caracterizados por métodos químicos, físicos e biológicos, tiveram seus efeitos biológicos investigados. Em alguns estudos, algumas NPMs, mesmo que presentes nos tecidos, não foram detectadas por ressonância paramagnética eletrônica devido à baixa susceptibilidade ao campo magnético. Diferentemente dessas, polímeros de albumina magnéticos (PAMs) preparados a partir de um fluido magnético iônico apresentaram alta susceptibilidade magnética. Em tese, esse novo material não só possibilita a magnetohipertermia, como também favorece a entrega de drogas sítio-específicas. Além disso, os PAMs podem representar um importante instrumento de combate ao câncer, uma vez que as células cancerosas superexpressam vários receptores para albumina, fazendo com que essas partículas sejam preferencialmente captadas pelas células tumorais. A importância de se conhecer os efeitos biológicos de novos materiais, potencialmente úteis nas aplicações biomédicas, constitui uma etapa imprescindível em seu desenvolvimento. Sendo assim, a necessidade de se investigar aspectos relacionados à biocompatibilidade dos PAMs justifica esta pesquisa.

3. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de se proceder à análise da biocompatibilidade de novos materiais magnéticos desenvolvidos para posterior uso no tratamento e diagnóstico de diversas doenças, especialmente o câncer, este trabalho teve como objetivo geral estudar os efeitos biológicos de polímeros de albumina magnéticos (PAMs) em camundongos fêmeas Swiss. Os objetivos específicos compreendem:

1. Avaliar a indução e a duração de possíveis processos inflamatórios causados por PAMs, por meio da análise citométrica;
2. Avaliar a viabilidade das células peritoneais após aplicação de PAMs, por meio do teste de exclusão de azul de tripan;
3. Avaliar a possível genotoxicidade induzida pelos PAMs em eritrócitos da medula óssea, por meio do teste de micronúcleo;
4. Verificar a citotoxicidade dos PAMs em eritrócitos da medula óssea, por meio da avaliação do percentual de eritrócitos policromáticos;
5. Verificar a distribuição de PAMs e seus efeitos nos órgãos fígado, pulmões e baço, por meio de análise histológica em microscopia de luz.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRA

Nanopartículas (NPs) de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) de uma amostra de fluido magnético iônico, estabilizado em pH ácido, foram dispersas em solução aquosa de albumina bovina e posteriormente liofilizadas. O fluido magnético iônico, com concentração de $2,28 \times 10^{16}$ partículas/cm³, foi sintetizado no Laboratório de Manipulação de Amostras, do Núcleo de Física Aplicada, do Instituto de Física - Universidade de Brasília (UnB). A encapsulação das NPs de maghemita em polímeros de albumina foi realizada pelo Dr. Antônio Cláudio Tedesco do Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina, Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP) - segundo a metodologia descrita por Simioni et al. (2006). A Figura 2 mostra a representação esquemática da estrutura dos polímeros de albumina magnéticos (PAMs) estudados.

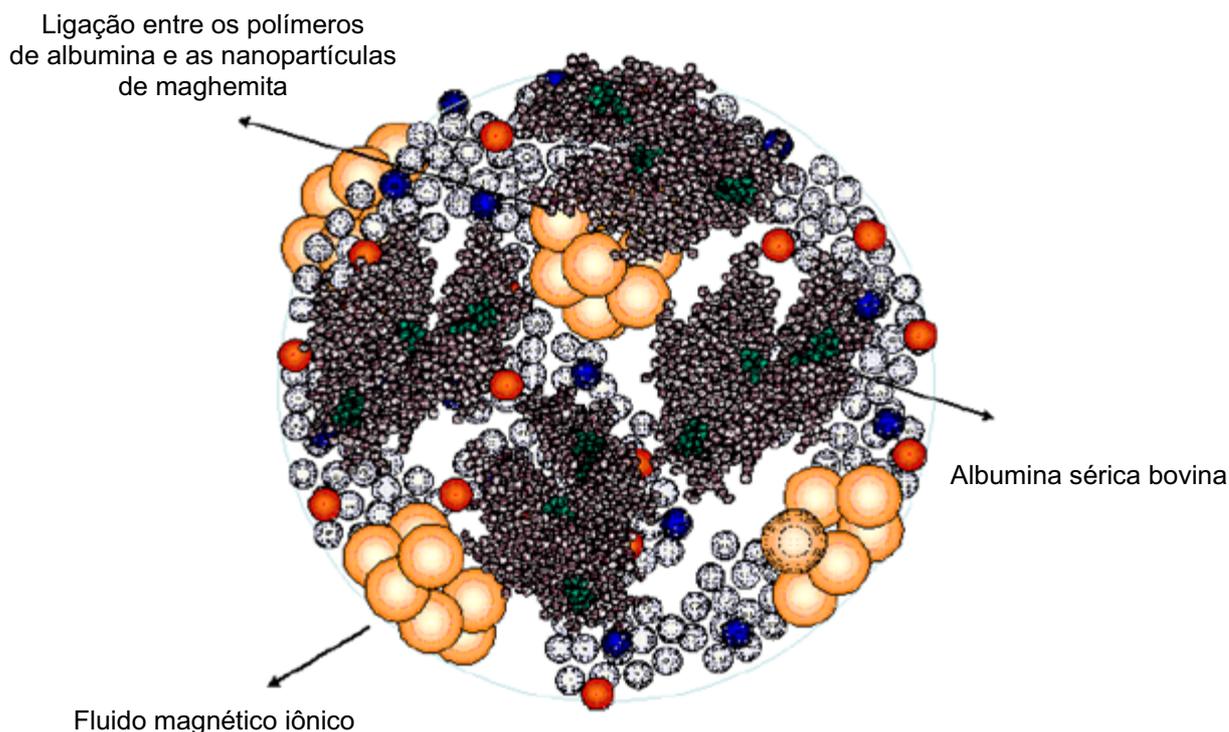


Figura 2: Estrutura esquemática dos PAMs.
Fonte: Simioni et al., 2006.

Para aplicação intraperitoneal, PAMs liofilizados foram diluídos em soro fetal bovino (SFB) para obtenção de uma suspensão com concentração de 5 mg/cm^3 ($1,23 \times 10^{14}$ partículas/cm³).

4.1.1. Caracterização dos PAMs e das NPs de maghemita por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A amostra liofilizada de PAMs foi diluída em água destilada e, posteriormente, colocada sobre telas para MET de 300 *meshs* recobertas com Formvar. O mesmo procedimento foi seguido para análise das NPs de maghemita presentes nos PAMs, porém diluindo-se a amostra liofilizada em água destilada, com pH 2.6, para retirada da cobertura de albumina. Após secarem, as telas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio eletrônico JEOL 1011 no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

O diâmetro médio dos PAMs e das NPs de maghemita foi obtido por análise em computador, utilizando-se o programa ImagePro 5.1. A distribuição das partículas foi conseguida utilizando-se o melhor ajuste log normal.

4.2. ANIMAIS

Para realização dos testes biológicos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, da linhagem Swiss (Figura 3), não isogênicos, com dois meses de vida, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília em ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração balanceada e água potável.



Figura 3: Camundongos fêmeas da linhagem Swiss.

Todos os procedimentos experimentais realizados durante este estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília – CEUA/63 – IB – UnB.

4.3. ANÁLISE CITOMÉTRICA

A análise citométrica consiste na quantificação de leucócitos totais e diferenciais com o intuito de se verificar a indução e a severidade de eventuais processos inflamatórios, dados importantes para determinar a biocompatibilidade da amostra.

Os animais experimentais (n=6) foram tratados com dose única de 100 µL da suspensão de PAMs em SFB, intraperitonealmente. Os animais controle receberam injeção intraperitoneal de 100 µL de SFB (n=3) ou não receberam nenhum tratamento (n=6). As análises foram realizadas 30 minutos; 6, 12, 24 e 48 horas; e 7, 15 e 30 dias após a administração de PAMs ou SFB.

Para coleta do sangue do coração, os animais foram anestesiados por éter etílico. O sangue foi coletado com uma seringa de 1 mL, previamente lavada com ácido dipotássico etilenoaminotetracético (EDTA), na concentração de 0,2 g/cm³.

4.3.1. Contagem global de leucócitos (CGL)

Foram pipetados 20 µL de sangue em tubos Ependorff contendo 380 µL de solução de Turk, que promove a lise das hemácias e plaquetas, permitindo a contagem dos leucócitos. A solução de Turk é composta por 2 mL de ácido acético glacial, 1 mL da solução de azul de metileno 1% e 97 mL de água destilada. O material foi homogeneizado lentamente por dois minutos e, posteriormente, 10 µL do homogeneizado foram colocados na câmara de Neubauer (Figura 4).

Procedeu-se à contagem dos leucócitos contidos nos quatro retículos externos da câmara (destacados na Figura 4), ao microscópio de luz (400x), modelo Oleman. A concentração de leucócitos por mm³ foi calculada dividindo-se o número total de leucócitos contados por 4 (referente ao número de quadrantes contados),

multiplicando-se por 20 (referente à diluição utilizada) e, por fim, multiplicando-se por 10 (referente à profundidade da câmara).

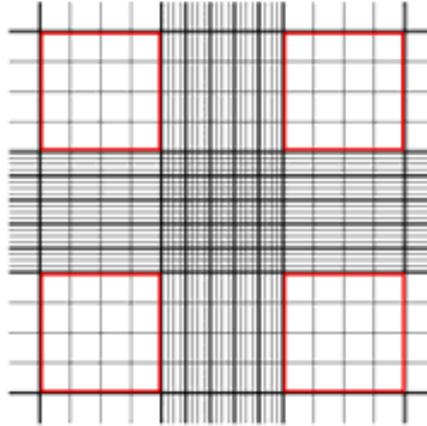


Figura 4: Representação da câmara de Neubauer, apresentando os quatro retículos externos destacados em vermelho.

4.3.2. Contagem diferencial de leucócitos do sangue

Foram preparados esfregaços de sangue periférico em lâminas de vidro. As lâminas secas foram fixadas por 5 minutos em metanol e, após a secagem natural, foram recobertas pelo corante Wright-Giemsa por aproximadamente 3 minutos. Em seguida, foi adicionado tampão fosfato pH 6,8, na proporção 1:1 de soluções A e B, permanecendo por mais 3 minutos. Ao final do processo de coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente. O corante é composto por 1,5 g de Wright, 0,17 g de Giemsa, 500 mL de metanol e 15 mL de glicerina. As soluções A e B são preparadas diluindo-se, respectivamente, 16,8 g de Na_2HPO_4 e 8,16 g de KH_2PO_4 , em 1 L de água destilada.

A contagem foi realizada em microscópio de luz (1000x), modelo Oleman, por meio de teste cego. Foram contadas 500 células, anotando-se o número de monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. A proporção dessas células, em relação ao número total de leucócitos, foi obtida pela multiplicação do número de cada população celular pela contagem global de leucócitos (CGL) e o resultado dividido por 500.

4.3.3. Contagem diferencial dos leucócitos peritoneais

Após o sacrifício do animal por deslocamento cervical, foi feita uma incisão na região abdominal para expor a cavidade peritoneal. Uma lâmina de vidro foi delicadamente passada sobre as vísceras para se obter uma fina camada do material. As lâminas secas foram fixadas por 5 minutos em metanol e coradas seguindo a mesma metodologia para coloração diferencial de leucócitos do sangue.

A contagem foi realizada em microscópio de luz (1000x), modelo Oleman, por meio de teste cego. Foram contadas 500 células por lâmina para determinar a frequência das populações de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos.

4.4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS PERITONEAIS

Para avaliar os efeitos da aplicação de PAMs sobre a viabilidade das células do peritônio foi utilizado o corante azul de tripan, o qual permite diferenciar as células vivas das mortas.

Os animais experimentais (n=5) foram tratados, via intraperitoneal, com dose única de 100 µL de suspensão de PAMs em SFB. Os animais do grupo controle não receberam nenhum tratamento (n=5) ou foram tratados, intraperitonealmente, com 100 µL de SFB (n=3). As coletas foram realizadas 30 minutos; 6, 12, 24 e 48 horas; e 7, 15 e 30 dias após a administração dos PAMs ou SFB.

Para realização do teste de viabilidade celular, os animais foram previamente anestesiados por éter etílico e, posteriormente, sacrificados por deslocamento cervical. Após a morte, foi feita uma incisão no abdômen e 10 mL de solução gelada (4 °C) de cloreto de sódio tamponada com fosfato (PBS), pH 7.2, foram injetados no peritônio com auxílio de uma seringa. Após massagem da cavidade peritoneal, 8 mL do lavado do peritônio foram coletados em tubos Falcon e centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de PBS gelado. A solução foi homogeneizada e 20 µL do ressuspendido foram retirados e misturados a 80 µL de solução de azul de tripan (0,4%). Aproximadamente 10 µL da mistura foram colocados na câmara de

Neubauer e a contagem foi realizada em microscópio de luz (400x), modelo Olemann, utilizando-se 2 dos 4 retículos externos.

As células viáveis foram identificadas por exclusão do azul de tripan. Esse corante apresenta carga negativa e reage com células que apresentam defeitos na membrana, penetrando, portanto, somente nas células mortas (Sigma-Aldrich, 2007). As células consideradas viáveis apresentavam coloração amarelo brilhante e as mortas, coloração azul.

A concentração de células vivas (ou mortas) por cm^3 foi calculada dividindo-se o número de células vivas (ou mortas) contadas em câmara de Neubauer por 2 (referente ao número de quadrantes contados), multiplicando-se por 5 (referente à diluição utilizada) e, por fim, multiplicando-se por 10000 (referente à profundidade da câmara).

A viabilidade celular foi calculada pelo percentual de células viáveis em relação ao total de células da amostra, de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = [\text{células vivas} / (\text{células vivas} + \text{mortas})] \times 100$$

4.5. ANÁLISE GENOTÓXICA E CITOTÓXICA

O teste de micronúcleo e o percentual de eritrócitos policromáticos (%EPC) foram utilizados para avaliar, respectivamente, a ação genotóxica e citotóxica da amostra de PAMs em eritrócitos da medula óssea.

Os animais experimentais (n=6) foram tratados, via intraperitoneal, com dose única de 100 μL da suspensão de PAMs em SFB. Os animais do grupo controle não receberam nenhum tratamento (n=6) ou foram tratados intraperitonealmente com 100 μL de SFB (n=3). As amostras da medula óssea foram coletadas 1, 2, 7, 15 e 30 dias após tratamento com PAMs ou SFB.

Para a análise genotóxica foi adicionado um grupo controle positivo (n=6), para assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos pela técnica. Os animais pertencentes a esse grupo foram tratados, por via intraperitoneal, com 0,2 mL de ciclofosfamida, na concentração de 4 mg/cm^3 , 24 horas antes da coleta.

Os animais foram previamente anestesiados por éter etílico e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical. Os fêmures foram extraídos e as epífises cortadas para expor o canal medular. A medula óssea foi retirada pela introdução de

uma agulha acoplada à seringa contendo 1 mL de SFB. O material foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 50 µL de SFB e, posteriormente, 10 µL do homogeneizado foi distendido em lâmina de vidro. Após a secagem das lâminas, à temperatura ambiente, o material foi fixado em metanol por 5 minutos. Depois da secagem, o material foi corado com solução composta por 1 mL de Giemsa e 14 mL de tampão fosfato e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente. O corante Giemsa é composto por 1 g de Giemsa, 54 mL de glicerol e 4 mL de metanol. O tampão fosfato é o mesmo utilizado para coloração diferencial de leucócitos.

A contagem de células foi realizada em microscópio de luz (1000x), modelo Oleman, por meio de teste cego. Foram contados 4000 eritrócitos, sendo 2000 eritrócitos policromáticos (EPCs), que se coram em roxo pelo corante Giemsa, e 2000 eritrócitos normocromáticos (ENCs), que se coram em rosa pelo mesmo corante, e o número de micronúcleos (MNs) encontrados em cada tipo celular foi registrado. Na figura 5A a seta aponta um MN em um ENC e na 5B, indica um MN em um EPC. Na figura 5A pode-se também observar EPCs e ENCs sem MNs.

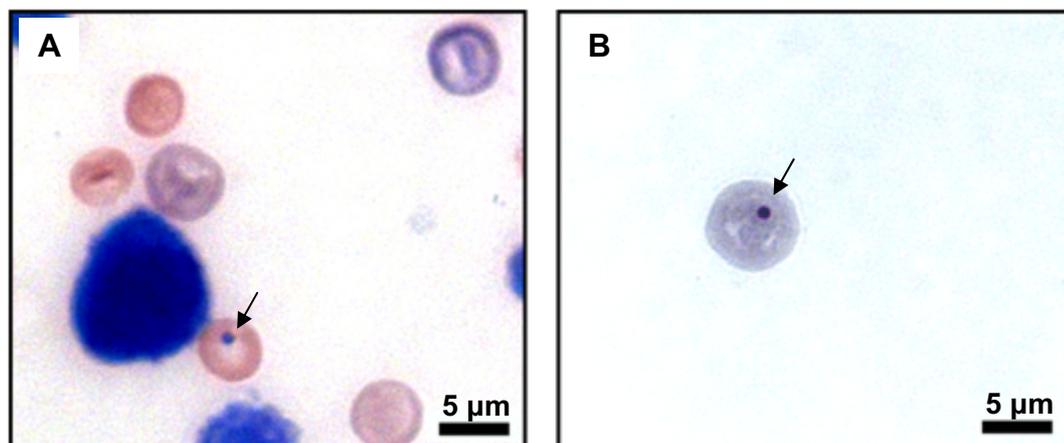


Figura 5: EPCs e ENCs da medula óssea. As setas apontam um MN em um ENC e em um EPC, em A e B, respectivamente.

Para avaliação da ação citotóxica da amostra, por meio do percentual de eritrócitos policromáticos (%EPC), foi registrado também o número de EPCs e ENCs quando qualquer uma dessas duas populações atingiu a contagem de 2000 células. O %EPC foi calculado pela fórmula:

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

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados obtidos nos estudos citométricos, na avaliação da viabilidade das células peritoneais e na verificação da citotoxicidade e genotoxicidade sob os eritrócitos da medula óssea dos camundongos, foram realizadas usando o *software* Minitab, versão 15.

Para que o teste ANOVA para análise de variância possa ser utilizado, os dados têm que apresentar distribuição normal e variâncias homogêneas. Assim, os resultados encontrados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar se os dados apresentavam distribuição normal, e ao teste de Levene, para verificar a homogeneidade das variâncias dos dados encontrados, ao nível de significância de 5%. Os dados que não se enquadravam nesses requisitos, isto é, apresentavam $p < 0,05$, foram transformados para \log_{10} para satisfazer as pré-suposições da ANOVA.

O teste de análise de variância simples (*One-way ANOVA*) foi utilizado para verificar a ocorrência de grupos diferentes estatisticamente e o teste *post-hoc* de Tukey foi aplicado para identificar quais grupos eram estatisticamente diferentes. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

4.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para análise histológica foram avaliados cortes de tecidos, com cerca de 5 μm de espessura, com o objetivo de verificar possíveis alterações provocadas pelo tratamento com PAMs, tais como presença de infiltrado inflamatório, espessamento e necrose tecidual.

Os animais experimentais ($n=3$) receberam dose única, via intraperitoneal, contendo 100 μL da suspensão de PAMs em SFB. Os animais do grupo controle não receberam nenhum tratamento ($n=3$) ou foram tratados intraperitonealmente com 100 μL de SFB ($n=2$). As coletas foram realizadas 30 minutos; 6, 12, 24 e 48 horas; e 7, 15 e 30 dias após a administração de PAMs ou SFB.

Para coleta dos órgãos, os animais foram anestesiados por éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. As cavidades abdominal e torácica foram expostas e o fígado, baço e pulmões foram coletados com auxílio de material

cirúrgico. Imediatamente após a coleta, fragmentos dos órgãos foram imersos em fixador de Davidson, para preservação da estrutura tecidual, e mantidos a 4°C por 10 horas. A solução estoque do fixador Davidson é composta por 40 mL de glicerina, 80 mL de formol 40%, 120 mL de etanol 95% e 120 mL de água destilada. Antes da utilização, 1 mL de ácido acético é acrescentado a 9 mL da solução estoque.

Após a fixação, os fragmentos dos órgãos foram desidratados por imersões seqüenciais, cada uma com duração de 1 hora, em soluções com percentual alcoólico crescente de 70%, 80%, 90% e 100%, sendo o último banho repetido por mais 1 hora. O procedimento de desidratação é essencial para que as amostras possam ser incluídas em parafina, uma vez que esta não é miscível em água.

Em seguida, as amostras foram diafanizadas em solução composta por álcool 100% e xileno, na proporção de 1:1, por 1 hora. Posteriormente, foram realizados 3 banhos em xileno com duração de 1 hora cada. O xileno é utilizado por ser uma substância miscível tanto em álcool quanto na parafina. Essa etapa de diafanização é importante para tornar os tecidos mais translúcidos, permitindo melhor visualização das estruturas.

Posteriormente, os fragmentos dos órgãos foram submetidos a 3 banhos seqüenciais em parafina, mantidas em estufa a 58 °C, com duração de 1 hora cada. O calor causa a evaporação do xileno e os espaços existentes são gradualmente preenchidos pela parafina. Após o último banho, os fragmentos dos órgãos foram emblocados em parafina para que, após o endurecimento desta, o tecido ficasse rígido o suficiente permitindo que fosse seccionado.

Foram feitos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura utilizando-se micrótomo e, após a distensão em banho-maria (35 °C), as secções foram montadas em lâminas de vidro previamente identificadas. De cada bloco foram confeccionadas 6 lâminas, sendo que a cada 2 lâminas montadas, 10 secções eram descartadas antes da coleta dos próximos cortes. Após a montagem das lâminas, estas foram mantidas em estufa a 37 °C para aderência dos cortes histológicos.

De cada bloco, uma das duas lâminas de cada série foi corada pelo método de hematoxilina-eosina (HE), para visualização do citoplasma e do núcleo, e a outra foi corada pelo método de Perls, para visualização do ferro (endógeno e exógeno).

As lâminas foram primeiramente submetidas ao processo de desparafinização, por meio de 3 banhos em xileno, com duração de 1 minuto cada. Posteriormente as lâminas foram submetidas à hidratação gradual, realizada por 3

banhos em álcool 100% e banhos posteriores em soluções de percentual alcoólico decrescente de 90%, 80% e 70%, sendo que cada banho teve duração de 1 minuto. Para coloração com HE, as lâminas foram imersas em hematoxilina por 45 segundos, lavadas por aproximadamente 3 minutos em água corrente e, em seguida, coradas em eosina por 45 segundos e lavadas rapidamente em água corrente. Para a coloração pelo método de Perls, as lâminas foram inicialmente imersas em água destilada por 1 minuto e, posteriormente, coradas pela solução de Perls composta por solução de ferrocianeto de potássio 2% e solução de ácido clorídrico a 1%, na proporção de 1:1, por 15 minutos; as lâminas foram lavadas em água destilada por 1 minuto e contra-coradas com solução de vermelho rápido nuclear por 2 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada por 1 minuto. Após a coloração por qualquer um dos métodos descritos, os materiais foram desidratados em soluções com percentual alcoólico crescente de 70%, 80%, 90% e 100%, sendo o último banho realizado três vezes, e cada imersão teve duração de 1 minuto no caso da coloração por HE e de 30 segundos para coloração pelo método de Perls. Em seguida, as lâminas foram submetidas a 3 banhos em xileno, com duração de 1 minuto cada. Após os procedimentos descritos, as lâminas foram cobertas com lamínulas, utilizando verniz incolor da marca Acrilex para fixação das mesmas, e colocadas para secar em estufa a 37°C por 2 horas.

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz, modelo Oleman, para verificação de alterações teciduais, inflamações e aglomerados de nanopartículas e, também, para comparação da quantidade de ferro por meio da coloração de Perls. Os cortes histológicos foram fotografados utilizando-se câmara fotográfica digital modelo AxioCam MRc, acoplada ao microscópio Axiophot, ambos da marca Zeiss, em aumento final de 100x, 200x, 400x e 1000x. As imagens foram capturadas e ajustadas utilizando o programa AxioVision, versão 4.6.

Os resultados da caracterização dos polímeros de albumina magnéticos (PAMs) e as diferentes análises realizadas em camundongos fêmeas Swiss, com o objetivo de verificar os efeitos biológicos da amostra, estão descritos a seguir e representados nas Figuras 6 a 29.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PAMs E DAS NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA

O diâmetro médio dos PAMs e das nanopartículas (NPs) de maghemita utilizadas para preparo dos PAMs foi determinado por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), com auxílio do programa ImagePro 5.1. Fotomicrografias dos PAMs e das NPs de maghemita estão apresentadas na Figura 6, A e B, respectivamente.

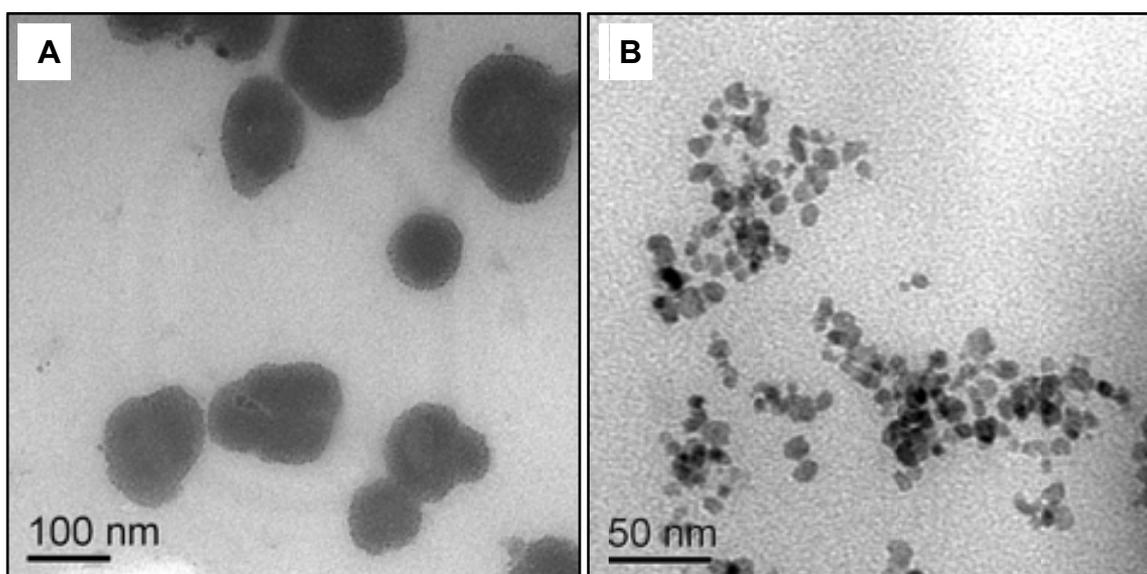


Figura 6: Fotomicrografias dos PAMs (A) e das NPs de maghemita utilizadas para preparo dos PAMs (B). MET realizada por Leandro Carlos Figueiredo e por Débora de Oliveira Cintra e Silva.

A distribuição log normal dos diâmetros obtidos pela MET mostrou que os PAMs apresentam diâmetro médio de aproximadamente 73 nm e desvio padrão de aproximadamente 0,37, como pode ser observado na Figura 7.

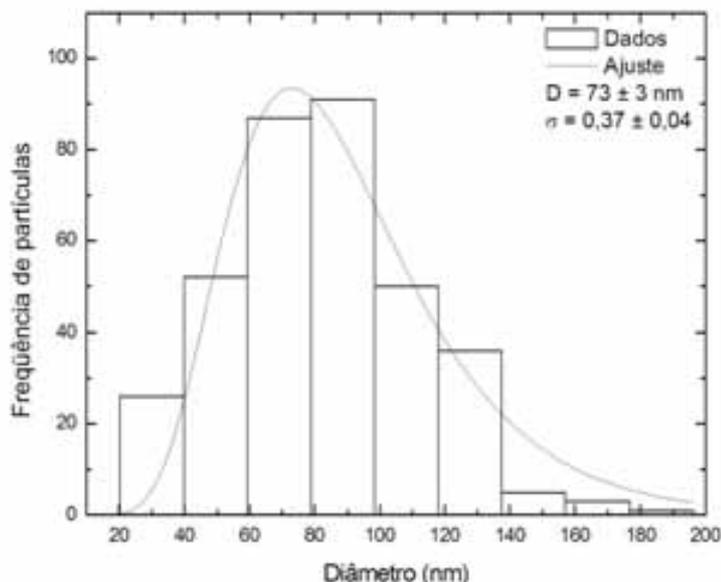


Figura 7: Histograma do diâmetro médio dos PAMs. Ajuste realizado por Leandro Carlos Figueiredo.

A distribuição log normal dos diâmetros obtidos pela MET indica que as NPs de maghemita, presentes na amostra PAM, apresentam diâmetro médio de aproximadamente 8,9 nm e desvio padrão de aproximadamente 0,25, como pode ser observado na Figura 8.

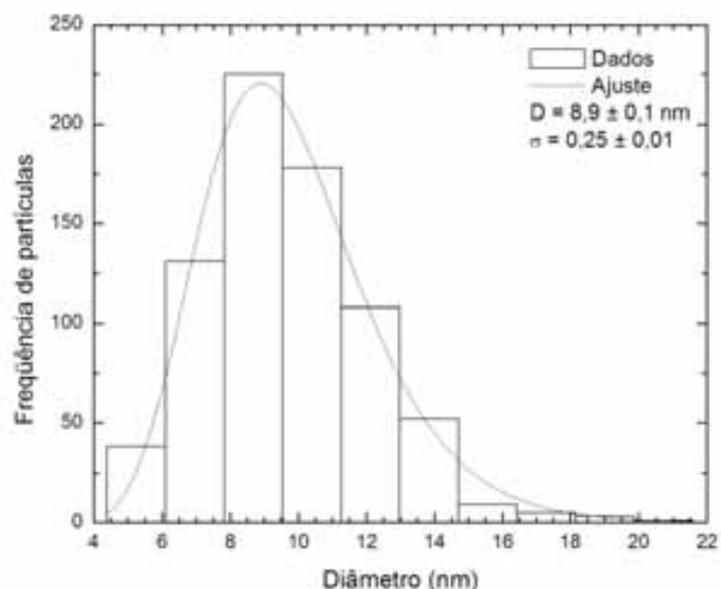


Figura 8: Histograma do diâmetro médio das NPs de maghemita da amostra PAM. Ajuste realizado por Leandro Carlos Figueiredo.

5.2. ANÁLISE CITOMÉTRICA

Para avaliação de possíveis efeitos citotóxicos, relacionados à ocorrência de processos inflamatórios causados pela administração dos PAMs, foi feita a análise da contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico e, também, da contagem diferencial de leucócitos peritoneais. Os estudos foram realizados em tempos variados após a administração da amostra.

5.2.1. Contagem global de leucócitos (CGL)

Os resultados encontrados mostram variações nas contagens globais de leucócitos (CGLs), de acordo com os diferentes tempos analisados, tanto no grupo tratado com PAMs, quanto no grupo tratado com soro fetal bovino (SFB). Foi feita comparação estatística dos animais tratados com SFB ou PAMs, nos diferentes tempos, com os animais que não foram submetidos a nenhum tratamento. Além disso, foram comparados estatisticamente os camundongos tratados com PAMs em relação aos tratados com SFB, após o mesmo tempo de tratamento.

Como pode ser observado na Figura 9, somente após 7 dias da aplicação dos PAMs, foi observada diminuição estatisticamente significativa da CGL. Ainda sim, essa diminuição não foi considerada estatisticamente diferente em relação ao grupo controle tratado com SFB após o mesmo período de tempo. Aos 15 dias, o valor da CGL do grupo tratado com PAMs tornou a ter valor semelhante ao encontrado no grupo controle sem tratamento.

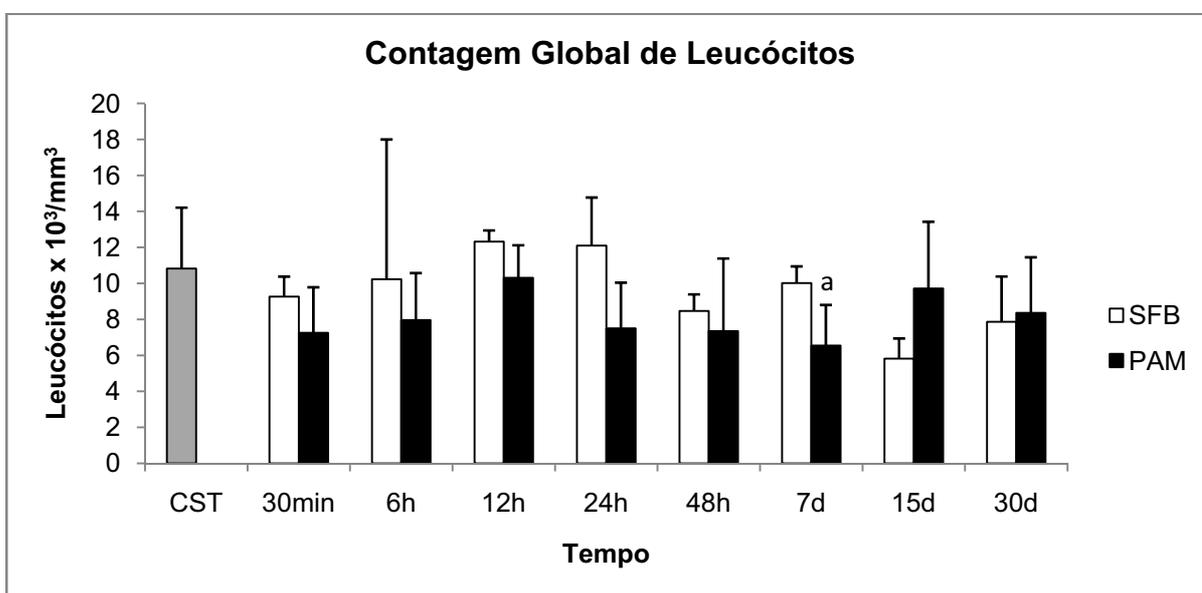


Figura 9: Efeitos da administração de PAMs na CGL do sangue periférico de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. (a) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$). A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

5.2.2. Contagem diferencial de leucócitos do sangue

De forma semelhante à CGL, a contagem da população de linfócitos sofreu alterações similares não significativas nos diferentes tempos. A única diferença estatisticamente significativa observada foi a diminuição da população de linfócitos dos animais analisados após 7 dias do tratamento com PAMs, em relação aos que não receberam nenhum tratamento. Não foi observada diferença estatística entre o grupo que recebeu injeção intraperitoneal da suspensão de PAMs e o grupo tratado com SFB, ambos após 7 dias do tratamento. Depois de 15 dias, houve recuperação na quantidade de linfócitos, fazendo com que os resultados voltassem a ser semelhantes entre o grupos tratados com PAMs e o grupo controle não tratado (Figura 10).

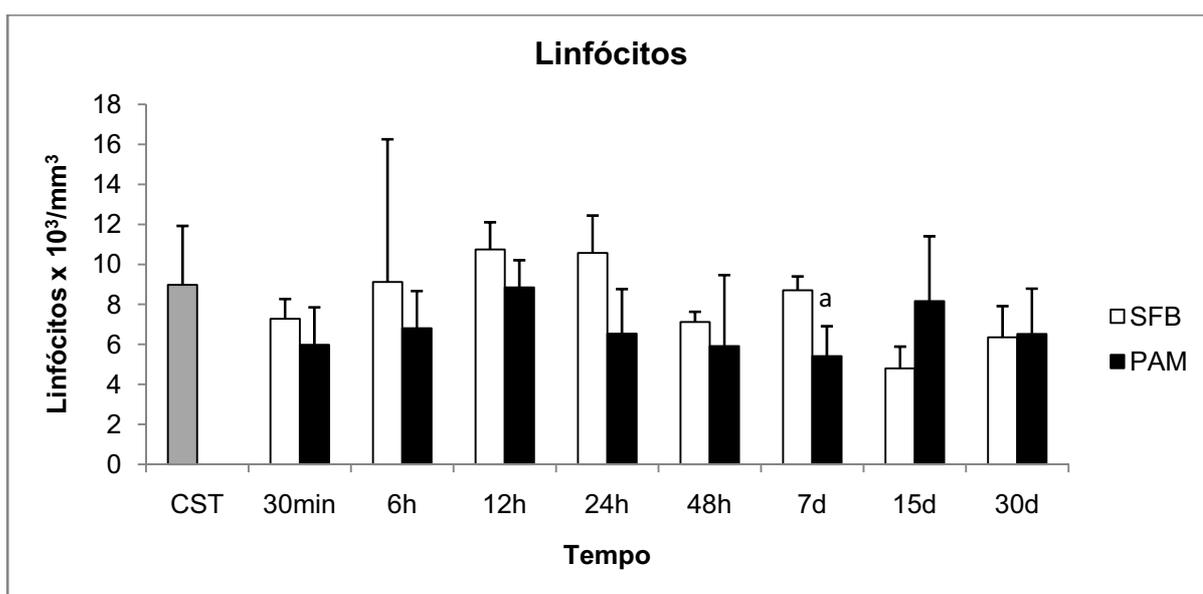


Figura 10: Efeitos da administração de PAMs na contagem de linfócitos do sangue periférico de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. (a) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$). A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

Em relação à contagem de neutrófilos do sangue periférico, foram também observadas leves diminuições não significativas no decorrer dos tempos após o tratamento com SFB ou PAMs. Como pode ser observado na Figura 11, apenas após 24 horas do tratamento com PAMs, a depleção de neutrófilos foi considerada estatisticamente significativa em relação ao grupo controle sem tratamento. Essa diminuição, entretanto, não foi considerada significativa em relação ao grupo tratado com SFB após o mesmo tempo de tratamento. Depois de 48 horas, foi observada recuperação na quantidade de neutrófilos, que passou a ter valores semelhantes aos do grupo controle não tratado.

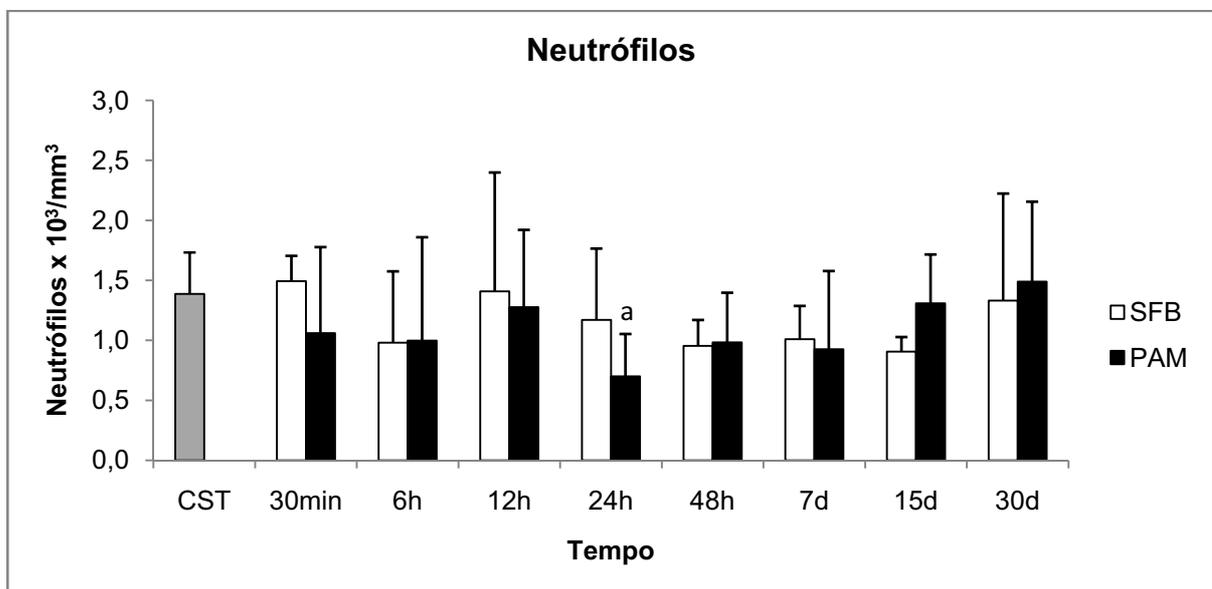


Figura 11: Efeitos da administração de PAMs na contagem de neutrófilos do sangue periférico de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. (a) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$). A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

Foi observada depleção da população de eosinófilos no sangue periférico dos camundongos após o tratamento com SFB ou PAMs, considerada estatisticamente significativa somente após 6 horas e 7 dias do tratamento com PAMs, em relação ao grupo que não recebeu tratamento. Porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com PAMs e os grupos tratados com SFB em nenhum dos tempos (Figura 12).

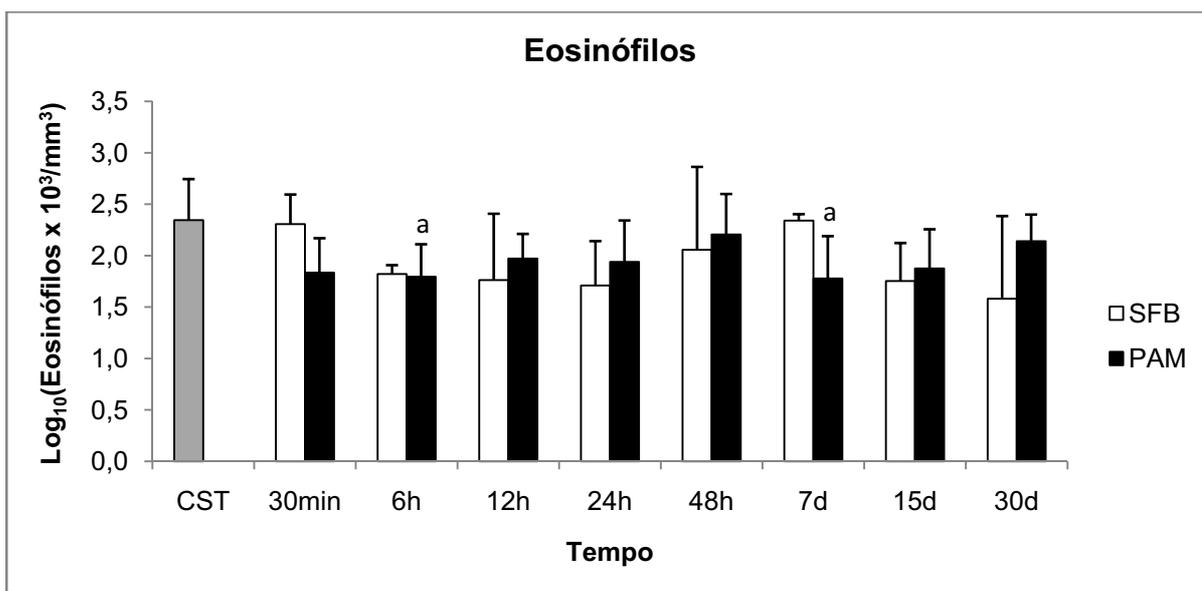


Figura 12: Efeitos da administração de PAMs na contagem de eosinófilos do sangue periférico de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. (a) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$). A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

Na avaliação da população de monócitos não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com PAMs ou SFB, em nenhum dos tempos de tratamento, e nem em relação ao grupo controle não tratado, como pode ser observado na Figura 13.

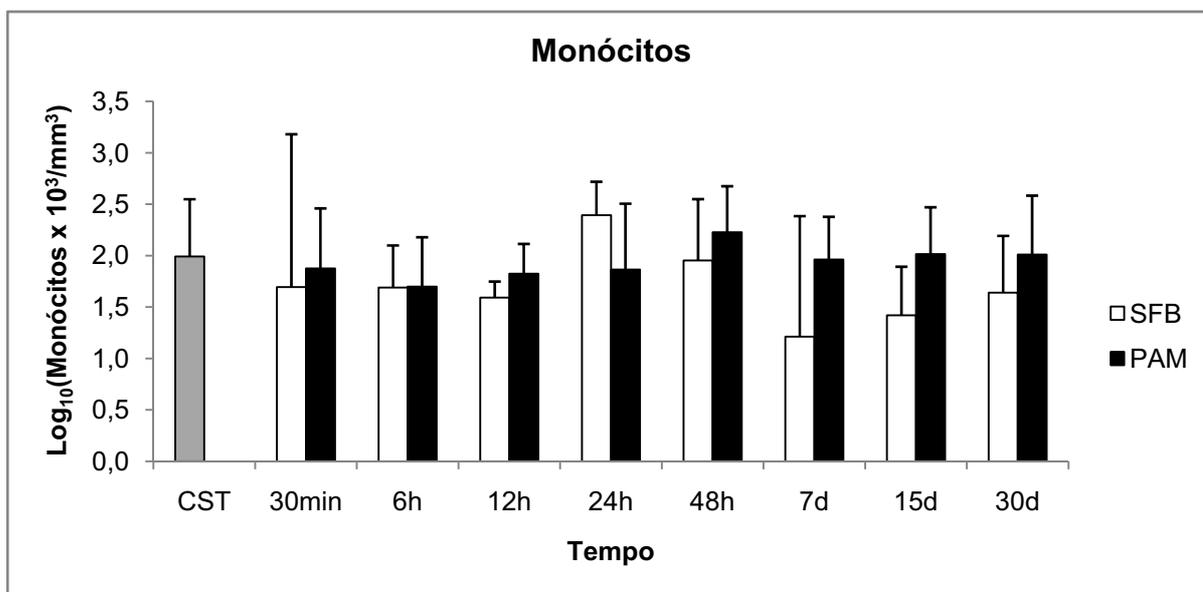


Figura 13: Efeitos da administração de PAMs na contagem de monócitos do sangue periférico de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

5.2.3. Contagem diferencial dos leucócitos peritoneais

Uma vez que a aplicação da amostra ocorreu via intraperitoneal, fez-se necessária a avaliação da ocorrência de processo inflamatório local, por meio da contagem diferencial dos leucócitos do peritônio.

Na avaliação da quantidade de macrófagos peritoneais nos diferentes tempos, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com SFB ou PAMs, em nenhum dos tempos, e nem em relação ao grupo não tratado (Figura 14).

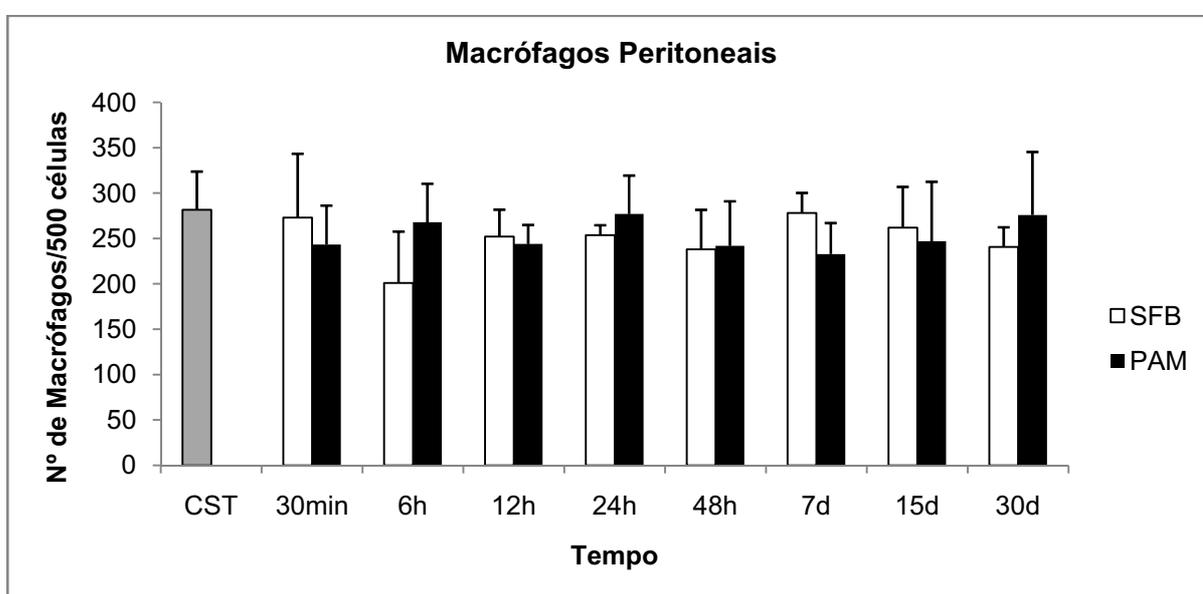


Figura 14: Efeitos da administração de PAMs na contagem de macrófagos peritoneais de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

Em relação aos linfócitos peritoneais, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com SFB ou PAMs, em nenhum dos tempos após os tratamentos, e nem em relação ao grupo controle não tratado, como pode ser observado na Figura 15.

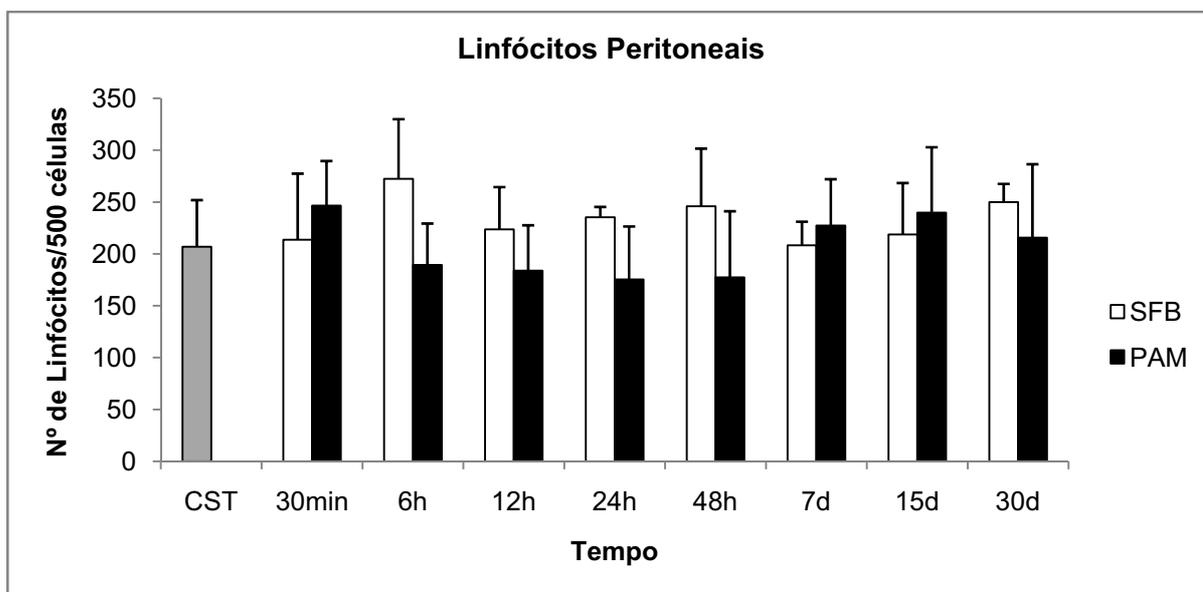


Figura 15: Efeitos da administração de PAMs na contagem de linfócitos peritoneais de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

Os efeitos da administração de PAMs foram observados principalmente nas populações de neutrófilos (Figura 16) e eosinófilos (Figura 17). Foi observado significativo aumento na população de neutrófilos peritoneais após 6 horas do tratamento, tanto no grupo que recebeu injeção intraperitoneal da suspensão de PAMs, quanto no grupo que recebeu SFB, em relação aos animais que não receberam nenhum tratamento. Após 12 horas da aplicação de SFB, foi verificada diminuição na população de neutrófilos em relação à contagem encontrada no grupo analisado após 6 horas do tratamento com SFB, de forma que não mais apresentava diferença estatística significativa em relação ao grupo controle sem tratamento. Essa ausência de diferença estatística nos grupos tratados com SFB foi observada até o final do experimento (30 dias). Após 12 horas do tratamento com PAMs, a quantidade de neutrófilos no peritônio aumentou ainda mais, intensificando a diferença estatística em relação ao controle sem tratamento, e apresentando diferença estatística também em relação ao grupo analisado após 12 horas do

tratamento com SFB. Vinte quatro horas após a aplicação intraperitoneal de PAMs, apesar da depleção na quantidade de neutrófilos peritoneais, continuou havendo diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo que não recebeu tratamento. Contudo, 48 horas após o tratamento com PAMs, foi identificado aumento expressivo na quantidade de neutrófilos peritoneais, sendo constatadas diferenças estatísticas, tanto em relação aos animais controle sem tratamento, quanto em relação aos animais tratados com SFB, após o mesmo tempo de tratamento. Após 7 dias e até 30 dias, a quantidade de neutrófilos peritoneais nos animais tratados com PAMs voltou a ser semelhante à encontrada nos animais não tratados e aos analisados depois de 7 dias da aplicação de SFB (Figura 16).

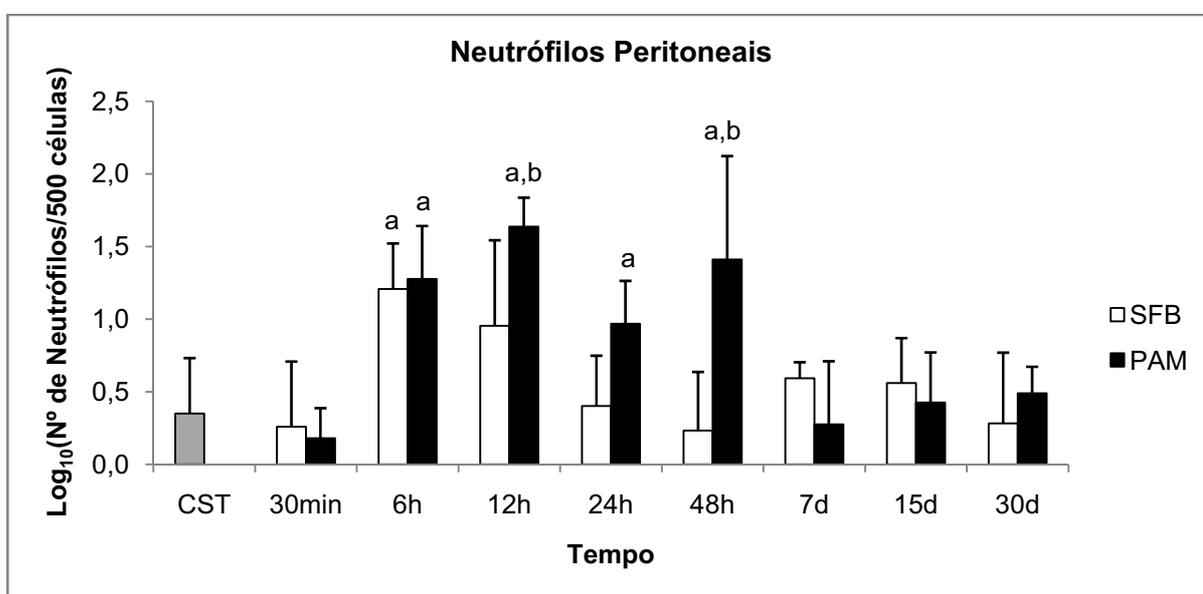


Figura 16: Efeitos da administração de PAMs na contagem de neutrófilos peritoneais de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. (a) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle sem tratamento e (b) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle tratado com SFB correspondente ao mesmo tempo de tratamento ($p < 0,05$). A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

A população de eosinófilos peritoneais (Figura 17) apresentou aumento estatisticamente significativo de 6 horas até 7 dias após a aplicação de PAMs, em relação ao grupo controle não tratado, sendo que após 24 horas do tratamento com PAMs, foi verificada diferença estatisticamente significativa também em relação ao grupo tratado com SFB, após o mesmo período de tempo. Aos 15 e 30 dias, a contagem de eosinófilos peritoneais nos animais tratados com PAMs era semelhante à encontrada nos animais tratados com SFB, após os mesmos tempos, e à do grupo controle não tratado.

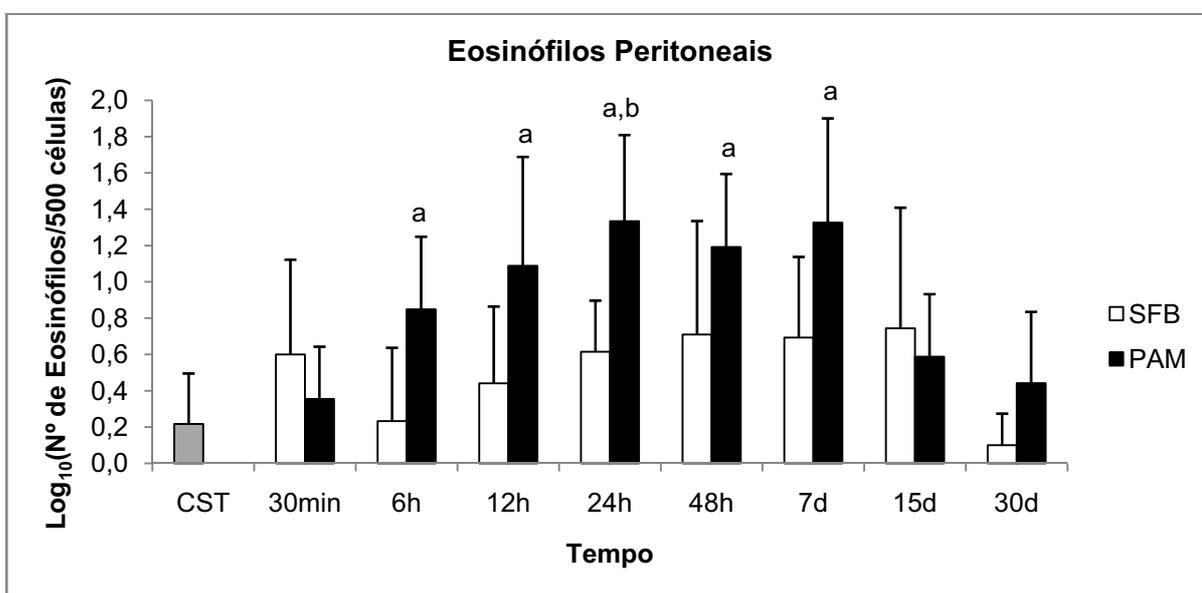


Figura 17: Efeitos da administração de PAMs na contagem de eosinófilos peritoneais de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. (a) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle sem tratamento e (b) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle tratado com SFB correspondente ao mesmo tempo de tratamento ($p < 0,05$). A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

Em relação à contagem de mastócitos peritoneais (Figura 18), foi verificada diminuição significativa, em relação ao grupo controle sem tratamento, somente 30 dias após a administração de PAMs. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com PAMs em relação aos tratados com SFB nos diferentes tempos correspondentes, inclusive após 30 dias.

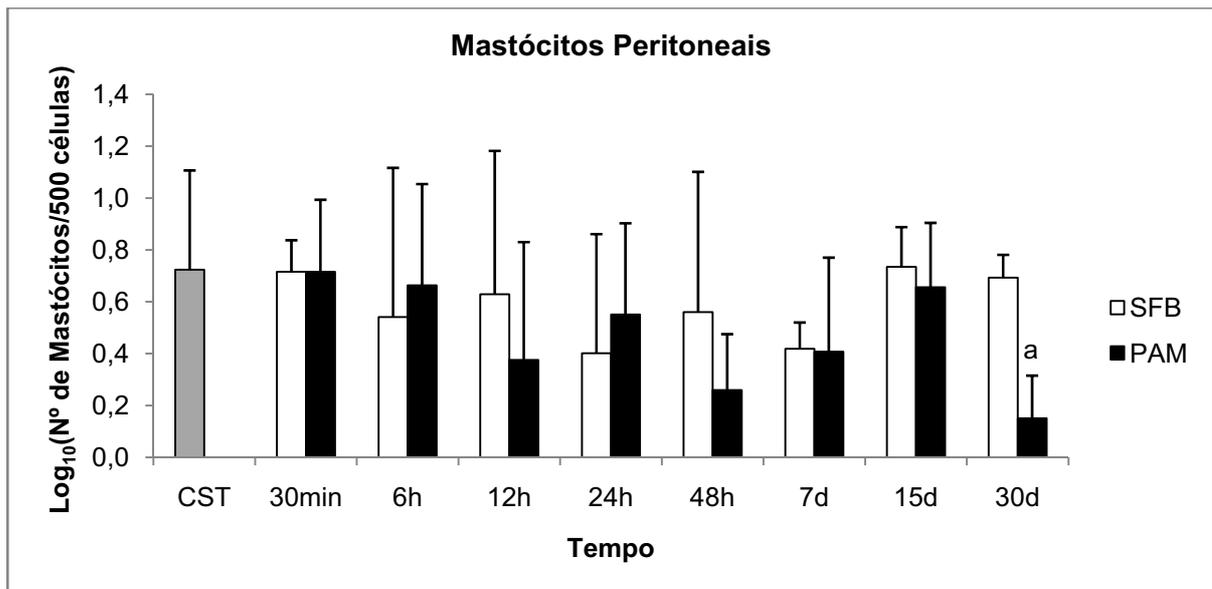


Figura 18: Efeitos da administração de PAMs na contagem de mastócitos peritoneais de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. (a) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$). A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

5.3. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS PERITONEAIS

Para avaliar os efeitos da administração de PAMs sobre a viabilidade das células do peritônio foi utilizado o corante azul de tripan, o qual permite diferenciar as células vivas das mortas. Foram calculadas as concentrações de células vivas e mortas por cm^3 (não mostrado) e a porcentagem de células peritoneais viáveis.

Como pode ser verificado na Figura 19, foi observada diminuição estatisticamente significativa na média percentual de células viáveis após 24 horas e 15 dias, tanto em relação ao grupo controle sem tratamento, quanto em relação ao grupo tratado com SFB após os mesmos tempos. Foram verificadas apenas ligeiras e não significativas variações na porcentagem de células viáveis nos grupos tratados com SFB. Após 30 dias, as médias do grupo tratado com SFB e do tratado com PAMs eram bastante similares entre si e em relação ao grupo não tratado.

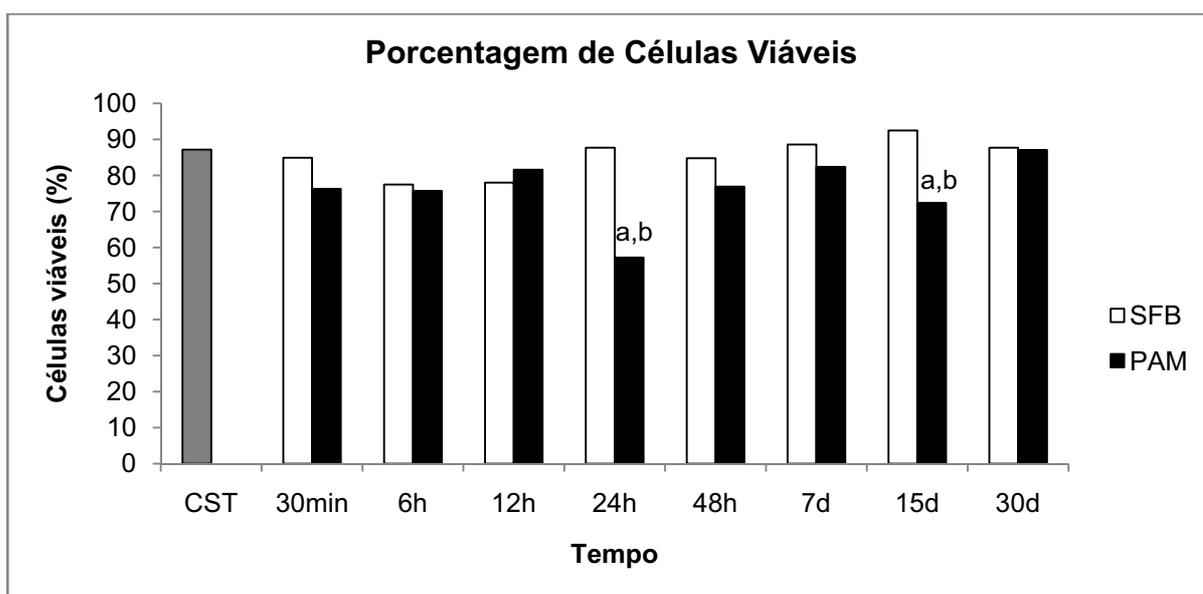


Figura 19: Efeitos da administração de PAMs na porcentagem de células peritoneais viáveis de camundongos, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. (a) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle sem tratamento e (b) aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle tratado com SFB correspondente ao mesmo tempo de tratamento ($p < 0,05$). A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento.

5.4. ANÁLISE GENOTÓXICA E CITOTÓXICA

O teste de micronúcleo e o cálculo do percentual de eritrócitos policromáticos (%EPC) são comumente utilizados para avaliar a ação genotóxica e citotóxica, respectivamente, de amostras de NPMs, no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília. As análises foram feitas em tempos variados após a aplicação de PAMs ou SFB.

5.4.1 Avaliação da genotoxicidade dos PAMs

Como pode ser observado na Figura 20, não foram verificadas alterações significativas na quantidade de micronúcleos (MNs) em eritrócitos policromáticos (EPCs) entre os animais tratados com PAMs e os animais tratados com SFB, e nem em relação ao grupo controle que não recebeu tratamento, em nenhum dos tempos estudados. O nítido aumento na freqüência de MNs em EPCs encontrado no grupo controle positivo tratado com ciclofosfamida, substância reconhecidamente genotóxica, em relação aos outros grupos, mostrou que a técnica utilizada foi adequada.

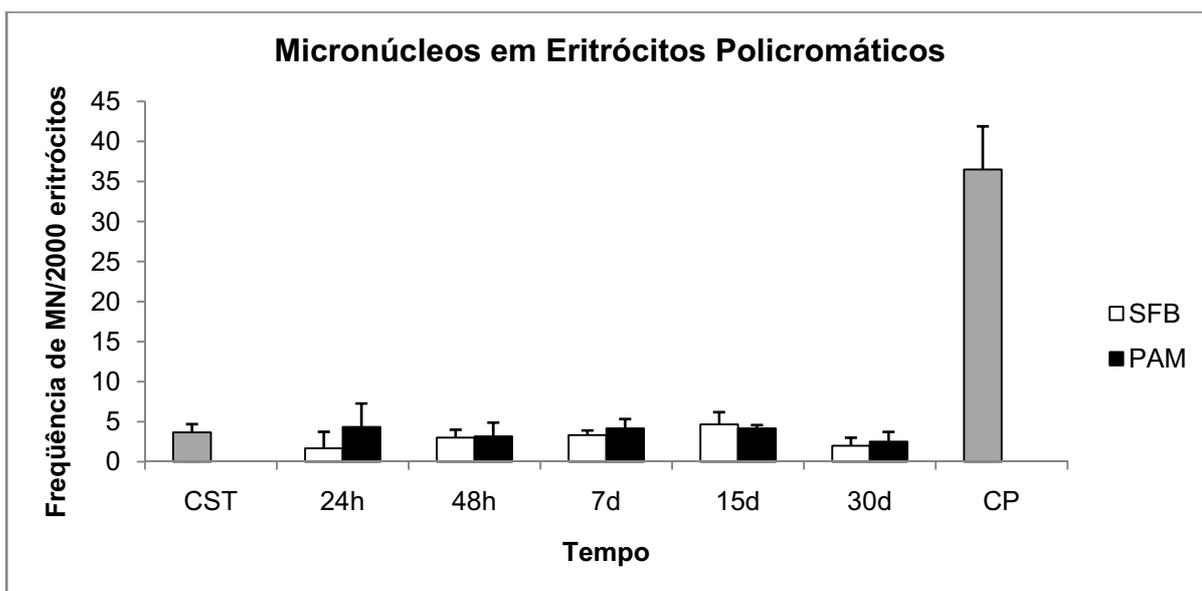


Figura 20: Efeitos da administração de PAMs na freqüência de MNs avaliada em 2000 EPCs, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento; CP - Controle positivo.

Nos eritrócitos normocromáticos (ENCs), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas relacionadas à frequência de MNs em ENCs nos animais tratados com PAMs, tanto em relação aos animais tratados com SFB, após os mesmos períodos de tempo, quanto em relação ao grupo controle não tratado (Figura 21). A quantidade de MNs encontrada no grupo controle positivo foi similar ao grupo que não recebeu nenhum tratamento.

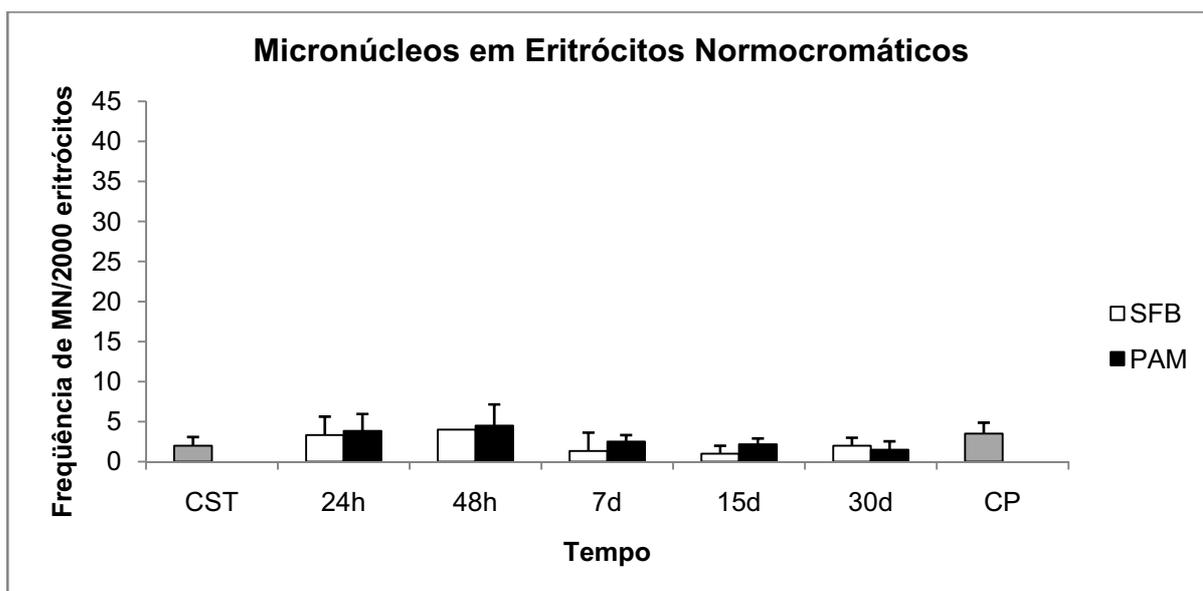


Figura 21: Efeitos da administração de PAMs na frequência de MNs avaliada em 2000 ENCs, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. A barra indica o desvio padrão. CST - controle sem tratamento; CP - Controle positivo.

5.4.2 Avaliação da citotoxicidade dos PAMs

A amostra PAM utilizada neste estudo não induziu alterações significativas no percentual de eritrócitos policromáticos (%EPC), nem em relação aos animais controle que não receberam nenhum tratamento, nem entre os grupos tratados com PAMs ou SFB, após o mesmo período de tempo (Figura 22). O %EPC encontrado no grupo controle positivo foi semelhante a todos os outros grupos, uma vez que a ciclofosfamida não é considerada citotóxica (não mostrado).

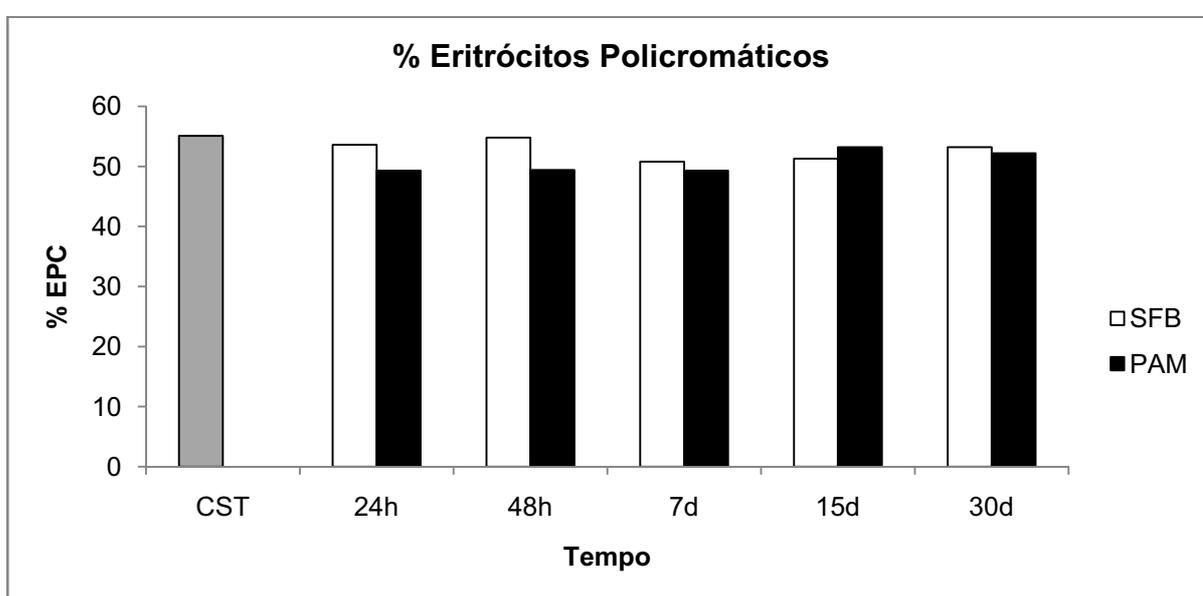


Figura 22: Efeitos da administração de PAMs no %EPC, com seus respectivos controles tratados com SFB, em função do tempo. CST - controle sem tratamento.

5.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Com o objetivo de se avaliar a presença e os efeitos da amostra PAM nos órgãos fígado, pulmões e baço, foi realizada a análise histológica, por microscopia de luz, utilizando colorações de hematoxilina e eosina (HE) e método de Perls.

A hematoxilina, por ser um corante básico, tem afinidade por estruturas ácidas como o núcleo celular, corando-o em azul ou violeta, enquanto que a eosina, por ser um corante ácido, reage com estruturas básicas como o citoplasma celular, corando-o em rosa. A combinação desses dois corantes é uma das mais utilizadas para análise histológica de tecidos. Os agregados de NPMs podem ser identificados por apresentarem coloração marrom dourada e foram confirmados pelo método de Perls.

Já o método de Perls, em que se emprega ferrocianeto de potássio e vermelho rápido nuclear, é utilizado para identificar a presença de ferro, endógeno ou proveniente das NPMs. Os íons férricos presentes nos tecidos reagem com os íons do ferrocianeto de potássio resultando em um produto azulado chamado ferrocianeto férrico. O vermelho rápido nuclear é utilizado para coloração dos núcleos celulares em rosa escuro e do citoplasma em rosa claro.

5.5.1. Fígado

As principais células do fígado, os hepatócitos, são células poliédricas que apresentam diâmetro de 20 a 30 μm . Tais células estão dispostas radialmente nos lóbulos hepáticos e são direcionadas para a veia centro-lobular. Na periferia dos lóbulos podem ser visualizados os espaços porta, constituídos por um ou mais ramos da veia porta e da artéria hepática, ducto biliar e vasos linfáticos, que são revestidos por tecido conjuntivo (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os cortes de fígado dos animais controle que não receberam nenhum tratamento apresentavam parênquima preservado, com hepatócitos de tamanho normal, núcleo e estrutura bem definidos e cápsula de tecido conjuntivo íntegra. Foi verificada a presença de pequenos e raros infiltrados inflamatórios, que eram sempre visualizados próximos às veias centro-lobulares (Figura 23-A). Não foram

visualizados agregados marrons na coloração de HE e nem azuis na coloração de Perls (Figura 24-A).

O fígado dos animais controle tratados com SFB, em todos os tempos analisados, apresentavam-se com aspecto histológico semelhante ao dos animais que não receberam nenhum tratamento e não apresentavam diferenças entre si. Inclusive foram verificados poucos infiltrados inflamatórios (não mostrados), de forma similar aos encontrados nos controles sem tratamento. Não foram visualizados agregados marrons nem azuis. As Figuras 23-B e 24-B, apresentam o fígado de um animal analisado após 48 horas do tratamento com SFB, e ilustram a aparência histológica observada em todos os outros animais tratados com SFB.

Os cortes de fígado dos animais tratados com PAMs, analisados nos diferentes tempos de tratamento, também não apresentavam quaisquer diferenças histológicas entre si, nem entre os animais dos grupos controle tratados com SFB e nem em relação ao grupo controle que não recebeu nenhum tratamento. Também foram verificados leves infiltrados inflamatórios próximos a vasos, mas em quantidade similar à dos animais controles (não mostrados). Apesar do tratamento com NPMs, não foi visualizada a presença de aglomerados marrons na coloração de HE e nem agregados azuis na coloração de Perls em nenhum animal, mesmo em aumento de 1000x. As Figuras 23-C,D,E,F e 24-C,D,E,F apresentam fotomicrografias de fígado de animais tratados com PAMs, em diferentes tempos, demonstrando a ausência de alterações com o decorrer do tempo e entre os grupos controles, bem como a ausência de agregados de NPMs.

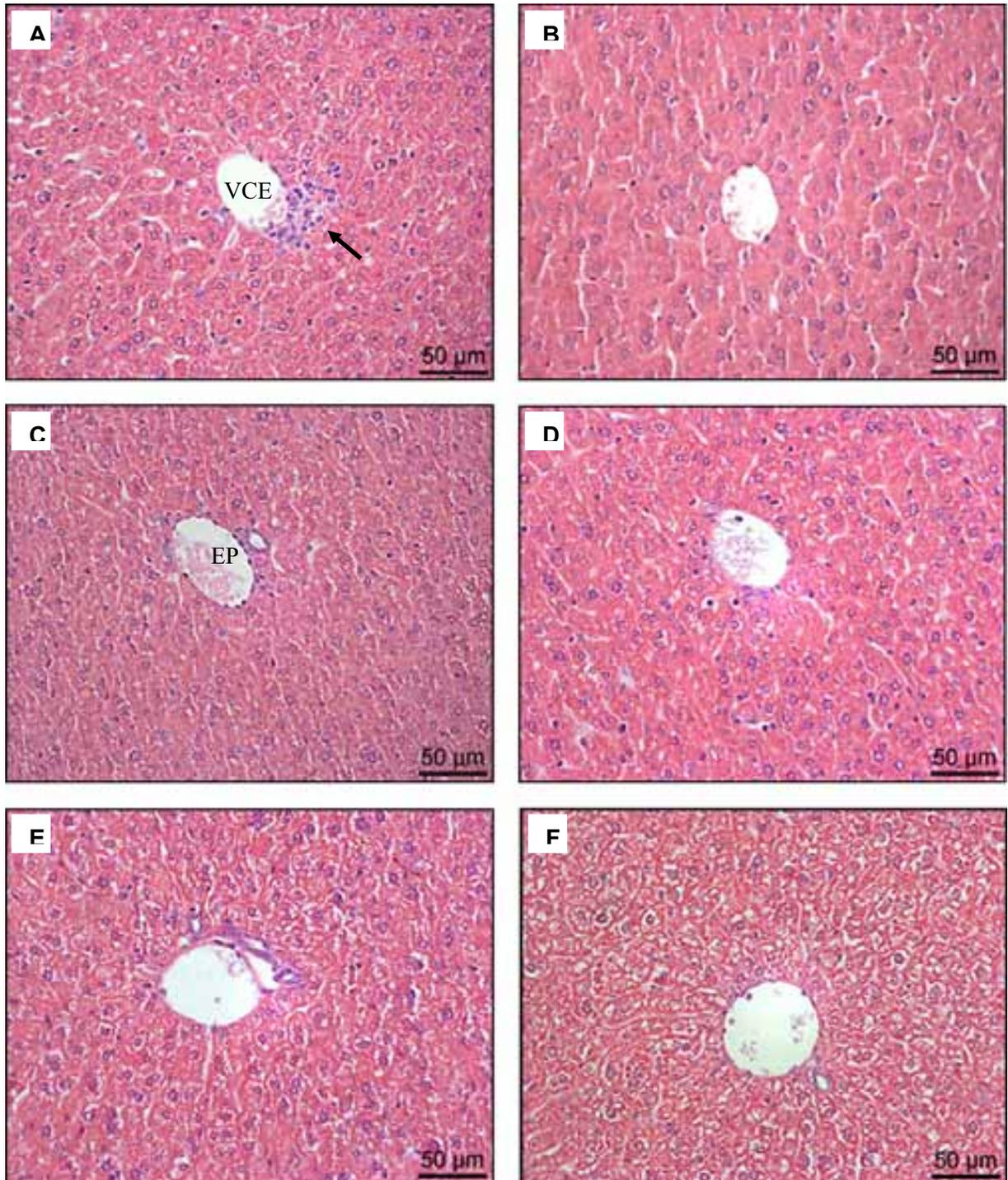


Figura 23: Fotomicrografias de fígado de camundongos não tratado (A); após 48 horas do tratamento com SFB (B); após 6 horas (C), 48 horas (D), 7 dias (E) e 30 dias (F) do tratamento com PAMs. Em A, a seta indica infiltrado inflamatório próximo à veia centrolobular (VCE). EP – espaço porta. Coloração por HE.

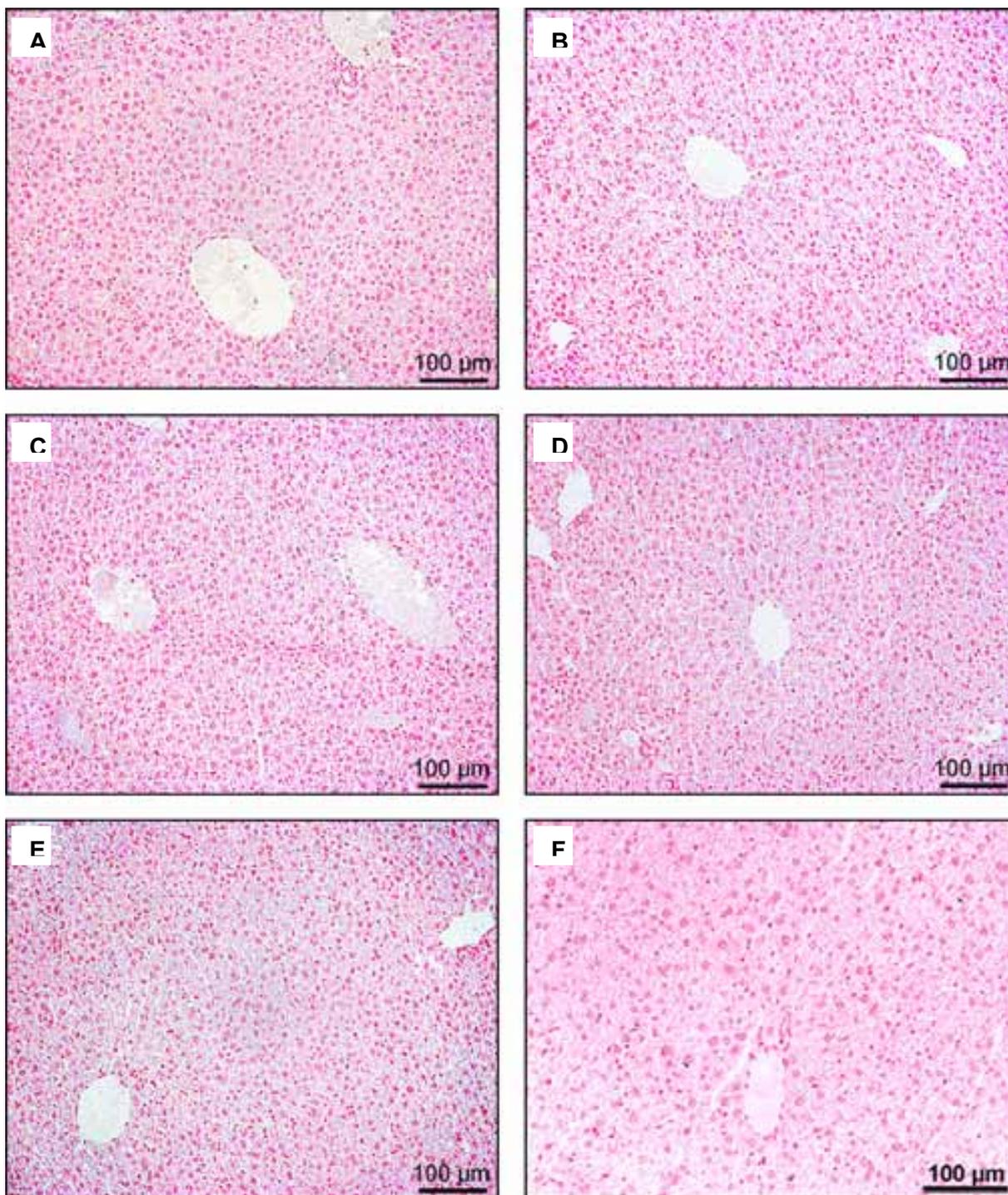


Figura 24: Fotomicrografias de fígado de camundongos não tratado (A); após 48 horas do tratamento com SFB (B); após 6 horas (C), 48 horas (D), 7 dias (E) e 30 dias (F) do tratamento com PAMs. Coloração por método de Perls.

5.5.2. Pulmões

Nos cortes histológicos dos pulmões pode-se visualizar os bronquíolos, ductos alveolares e alvéolos pulmonares. Os bronquíolos, nas porções finais, apresentam delgada camada de músculo liso e fibras elásticas e epitélio cilíndrico simples que varia de colunar baixo a cubóide, podendo apresentar ou não cílios. Tanto os ductos alveolares quanto os alvéolos são revestidos por epitélio simples, com células bastante delgadas. Nas bordas dos alvéolos pode-se ainda verificar a presença de músculo liso. Os alvéolos são delimitados pelos septos interalveolares, que são compostos por pneumócitos, tecido conjuntivo e finos capilares sangüíneos (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os cortes dos pulmões dos animais do grupo controle que não recebeu nenhum tratamento apresentavam vasos sangüíneos e bronquíolos com características padrões, alvéolos delimitados por septos com aspecto normal e capilares exibindo calibre normal (Figura 25-A) em que hemácias eram visualizadas. Foi observada a presença de leves infiltrados inflamatórios próximos a vasos e bronquíolos (dados não mostrado). Não foram visualizados aglomerados marrons na coloração de HE e nem azuis na coloração de Perls (Figura 26-A).

Os pulmões dos animais controles tratados com SFB, em todos os tempos analisados, apresentaram espessamento dos septos interalveolares, que ainda era pouco intenso após 30 minutos do tratamento com SFB. Após 6 horas os septos interalveolares já se encontravam bastante espessos e foi observado aumento na quantidade de infiltrados inflamatórios, em comparação com os animais controles sem tratamento (dados não mostrados). Entretanto, após 12 horas, foi observada diminuição do espessamento dos septos interalveolares, em comparação com os animais analisados após 6 horas do tratamento com SFB, mas ainda eram observadas áreas com espessamento, embora também tenham sido observadas áreas cujos septos apresentavam aspecto normal. De maneira geral, os animais analisados de 12 horas até 30 dias após o tratamento com SFB apresentavam características semelhantes, com áreas de aspecto normal e áreas dispersas com septos espessados, como pode ser observado na Figura 25-B. Além disso, nesses mesmos tempos, foi observada quantidade levemente maior de infiltrados inflamatórios em comparação com o grupo controle sem tratamento (dado não mostrado). Não foram visualizados agregados marrons nem azuis em nenhum

animal tratado com SFB (Figura 26-B). As Figuras 25-B e 26-B, apresentam pulmão de um animal analisado após 12 horas do tratamento com SFB, e ilustram a aparência histológica observada até 30 dias após a aplicação intraperitoneal de SFB.

Da mesma forma que no grupo tratado com SFB, foi observado leve espessamento dos septos interalveolares após 30 minutos do tratamento com PAMs e pequeno aumento de infiltrados inflamatórios próximos a vasos e bronquíolos (Figura 25-C). Após 6 horas, foi verificado aumento do espessamento dos septos alveolares e do infiltrado inflamatório, de maneira similar ao observado nos animais tratados com SFB após o mesmo tempo (dados não mostrados). Entretanto, depois de 12 horas da aplicação intraperitoneal de PAMs foram observadas áreas maiores de espessamento, em comparação com os animais tratados com SFB analisados após o mesmo período de tempo (Figura 25-D), porém a quantidade de infiltrados inflamatórios permaneceu similar entre os dois grupos. Apesar do tratamento com PAMs, não foi observada a presença de agregados marrons na coloração de HE e nem agregados azuis na coloração de Perls nos animais analisados após 30 minutos (Figura 26-C), 6 horas (não mostrado) e 12 horas (Figura 26-D). Contudo, após 24 horas do tratamento com PAMs, foi verificada em 1 dos 3 animais analisados, a presença de agregados marrons, confirmados pela coloração de Perls como sendo compostos de ferro, associados a intensos infiltrados inflamatórios. De todos os animais tratados com PAMs analisados, este foi o único animal em que foram observados agregados marrons e azuis (Figuras 25-E,F e 25-E,F). Apesar dos outros 2 animais analisados após 24 horas não terem apresentado agregados, todos os 3 animais apresentavam características histológicas similares, com grande quantidade de infiltrados inflamatórios e áreas maiores de espessamento dos septos interalveolares, em comparação com os animais tratados com SFB analisados após 24 horas. Os animais analisados após 48 horas (Figura 27-A,B), 7 dias (não mostrado), 15 dias (Figura 27-C,D) e 30 dias (Figura 27-E,F), após aplicação de PAMs, apresentavam algumas áreas com septos espessados e leves infiltrados inflamatórios, similares aos encontrados nos controles tratados com SFB após os mesmos tempos de tratamento. Nesses tempos, também não foram visualizados agregados marrons ou azuis, mesmo em aumento de 1000x.

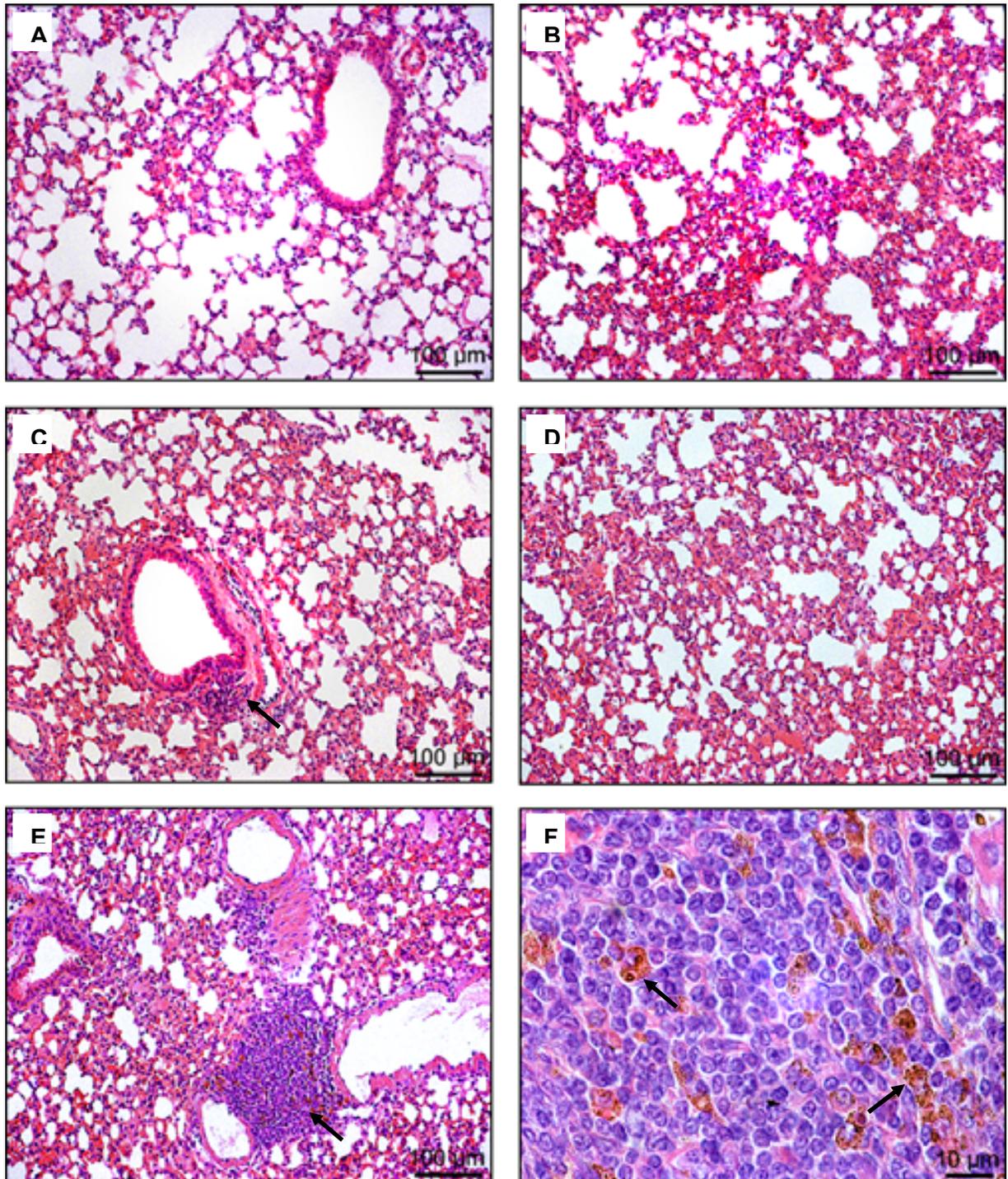


Figura 25: Fotomicrografias de pulmão de camundongos não tratado (A); após 12 horas do tratamento com SFB (B); após 30 minutos (C), 12 horas (D) e 24 horas (E e F) do tratamento com PAMs. Em C a seta indica infiltrado inflamatório próximo ao bronquíolo. Em E a seta indica inflamação associada à presença de NPs. Em F, as setas apontam os aglomerados de NPs apresentando cor marrom dourado. Coloração por HE.

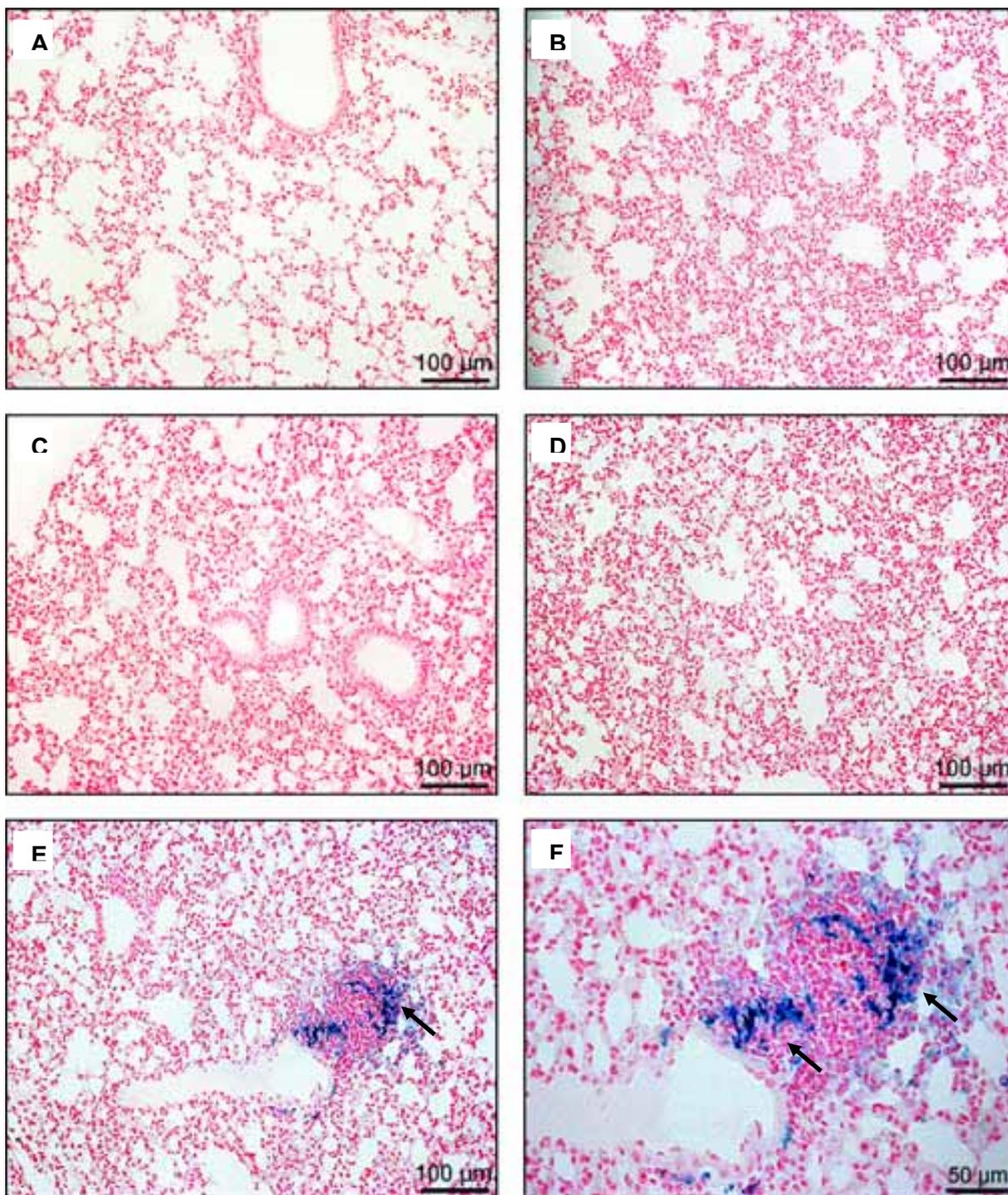


Figura 26: Fotomicrografias de pulmão de camundongos não tratado (A); após 12 horas do tratamento com SFB (B); após 30 minutos (C), 12 horas (D) e 24 horas (E e F) do tratamento com PAMs. Em E e F, as setas indicam os aglomerados de NPs apresentando cor azul. Coloração pelo método de Perls.

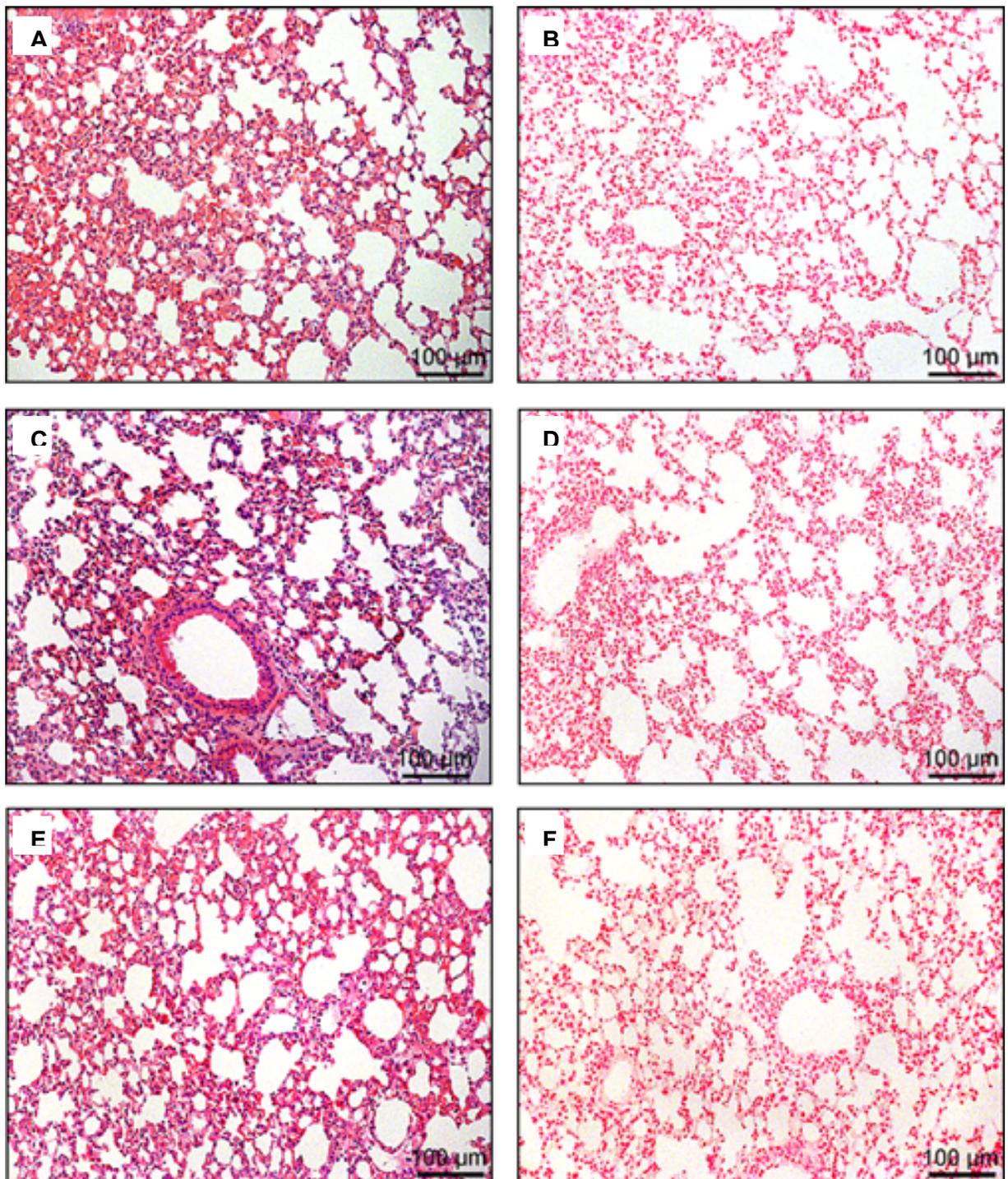


Figura 27: Fotomicrografias de pulmão de camundongos após 48 horas (A,B), 15 dias (C,D) e 30 dias (E e F) do tratamento com PAMs. Coloração por HE (A,C e E) e pelo método de Perls (B, D e F).

5.5.3. Baço

Nos cortes histológicos do baço, pode-se verificar a presença de uma cápsula composta por tecido conjuntivo, que emite trabéculas que dividem o parênquima do órgão. Além disso, pode-se diferenciar a polpa branca, que se cora em roxo pela coloração de HE, da polpa vermelha, que apresenta coloração próxima ao rosa. A polpa branca é constituída por células linfóides, enquanto que a polpa vermelha é composta por capilares sinusóides, que não são visíveis ao microscópio de luz, e pelos cordões esplênicos, formados por células e fibras reticulares, leucócitos, plaquetas e eritrócitos (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os cortes do baço dos animais controle que não receberam tratamento apresentavam cápsula de espessura normal, áreas de polpa branca bem delimitada, com presença de megacariócitos e células parenquimais bem preservadas. A polpa vermelha apresentava quantidade variável de aglomerados de cor marrom-dourada, quando corada por HE (Figura 28-A), e aglomerados azuis, quando corado por Perls. Tais agregados também foram visualizados na polpa branca, mas em quantidade muito menor (Figura 29-A).

O baço dos animais controle tratados com SFB, em todos os tempos analisados, apresentavam características histológicas semelhantes às dos animais que não receberam nenhum tratamento e não apresentavam diferenças consideráveis entre si. A quantidade de aglomerados marrons e azuis variou pouco entre os diferentes tempos e foi similar à dos controles não tratados. As Figuras 28-B e 29-B, apresentam o baço de um animal analisado após 7 dias do tratamento com SFB, e ilustram a aparência histológica observada em todos os outros animais tratados com SFB.

As secções do baço dos animais tratados com PAMs, analisados nos diferentes tempos de tratamento, não apresentaram diferenças histológicas entre si, nem entre os animais dos grupos controles tratados com SFB e nem em relação ao grupo controle que não recebeu nenhum tratamento. Entretanto, foi observada leve variação na quantidade de agregados marrons e azuis nos diferentes tempos, mas que ocorreu de forma similar à dos controles. Após 30 minutos, por exemplo, foi verificado leve aumento na quantidade de agregados, tanto na polpa vermelha quanto na branca, em 2 animais tratados com PAMs em comparação com os animais controles (Figura 29-C). De 6 horas até 30 dias após o tratamento com

PAMs, a quantidade de aglomerados foi bastante similar à dos controles. As Figuras 28-C,D,E,F e 29-C,D,E,F apresentam fotomicrografias de baço de animais tratados com PAMs, em diferentes tempos, demonstrando a ausência de alterações com o decorrer do tempo e entre os grupos controles. São também visualizados aglomerados de ferro, que podem ser endógenos ou decorrentes da presença de NPMs.

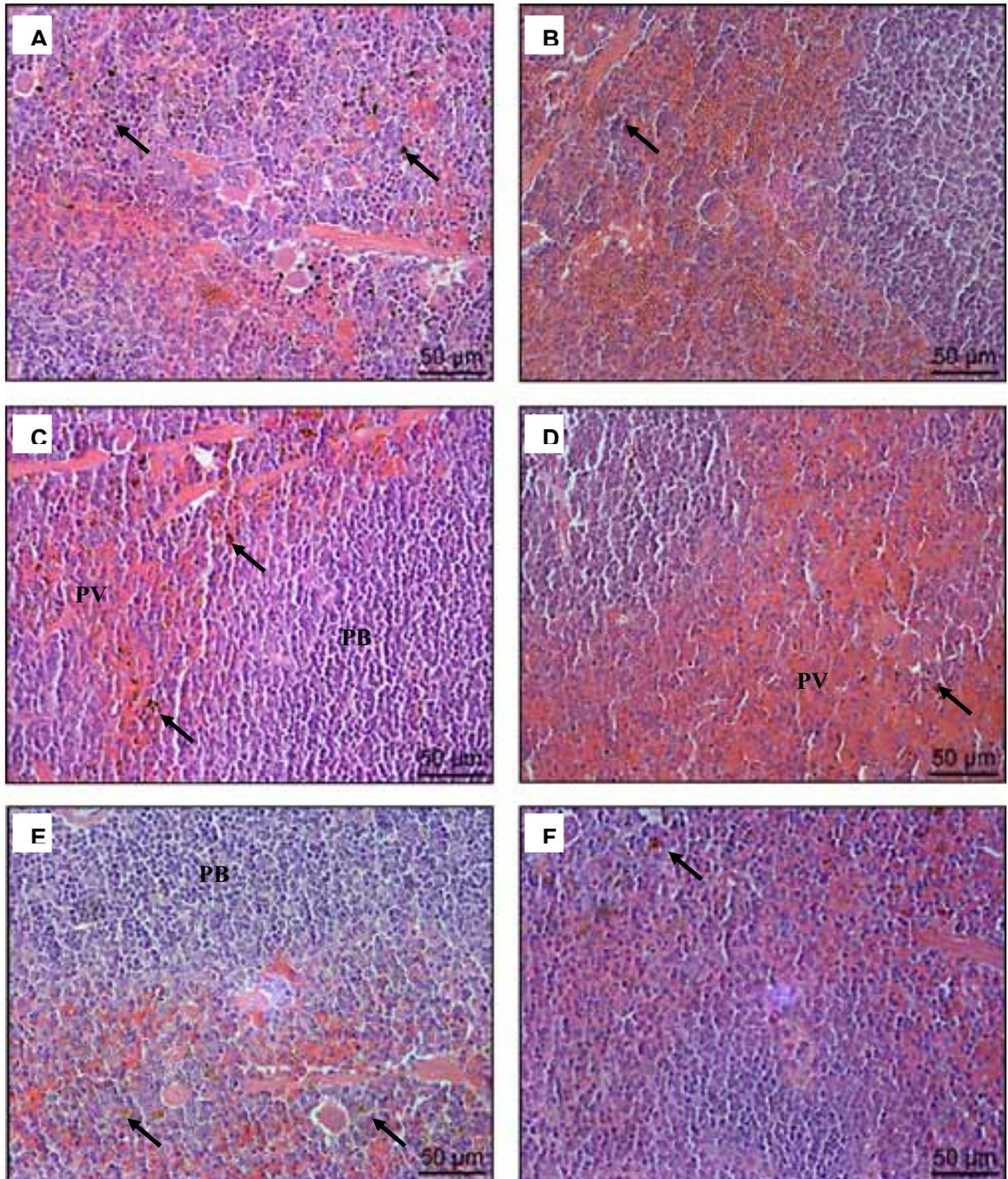


Figura 28: Fotomicrografias do baço de camundongos não tratado (A); após 7 dias do tratamento com SFB (B); após 30 minutos (C), 12 horas (D) 7 dias (E) e 30 dias (F) do tratamento com PAMs. As setas indicam os aglomerados de ferro que apresentam cor marrom dourada. PB – polpa branca; PV – polpa vermelha. Coloração por HE.

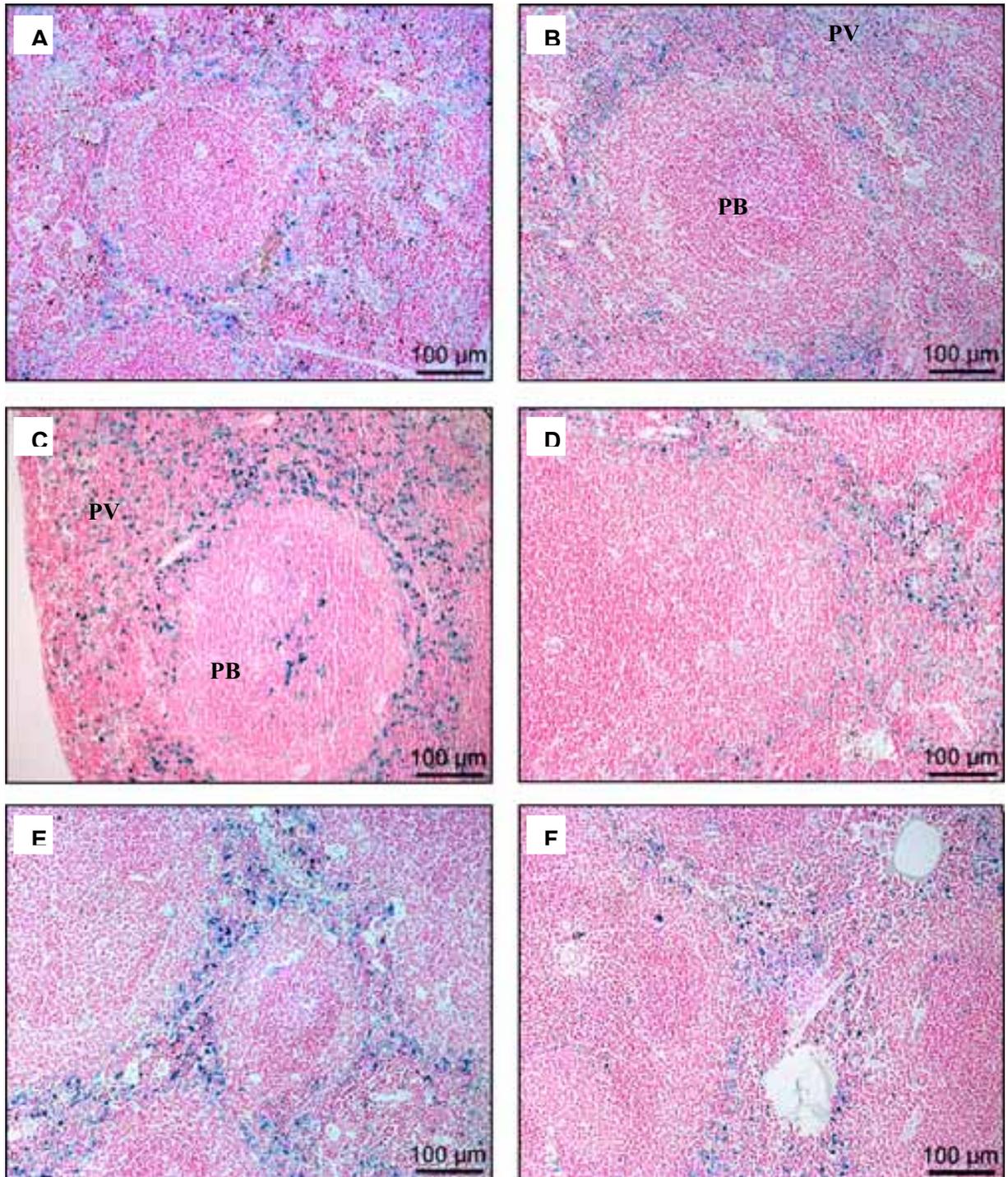


Figura 29: Fotomicrografias do baço de camundongos não tratado (A); após 7 dias do tratamento com SFB (B); após 30 minutos (C), 12 horas (D) 7 dias (E) e 30 dias (F) do tratamento com PAMs. Os aglomerados de ferro apresentam coloração azul. PB – polpa branca; PV – polpa vermelha. Coloração pelo método de Perls.

Neste trabalho, foi avaliada a biocompatibilidade de polímeros de albumina magnéticos (PAMs), compostos por nanopartículas (NPs) de maghemita, suspensos em soro fetal bovino (SFB), na concentração de 5 mg/cm^3 ($1,23 \times 10^{14}$ partículas/ cm^3), e aplicados intraperitonealmente em camundongos fêmeas Swiss. A biocompatibilidade da amostra foi estudada por meio da análise citométrica, da avaliação da viabilidade das células peritoneais, da análise genotóxica e citotóxica em eritrócitos da medula óssea, e dos efeitos das NPs no fígado, pulmões e baço analisados por microscopia de luz.

Os mesmos testes para avaliar a biocompatibilidade dos PAMs foram realizados em animais controles que não foram submetidos a nenhum tratamento e em animais controles tratados intraperitonealmente com SFB. A utilização do SFB como diluente para as NPs liofilizadas, foi devido à melhor diluição que essa substância promoveu em comparação com solução de cloreto de sódio a 0,9%, que é comumente utilizada para aplicação em animais controle. Entretanto, apesar do SFB utilizado ser inativado, poderia causar alguma alteração nos padrões leucocitários e teciduais dos animais, o que justificou a sua utilização em cada um dos tempos de tratamento.

6.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A AMOSTRA PAM

As nanopartículas magnéticas (NPMs) podem ter diferentes efeitos no organismo dependendo da composição química do núcleo e da cobertura, do tamanho e das cargas de superfície, sendo que mudanças em qualquer um desses fatores podem alterar a biocompatibilidade e biodistribuição desses nanocompostos (Moghimi et al., 2005; Tartaj et al., 2005; Owens III e Peppas, 2006; Dobrovolskaia e McNeil, 2007). Para que possam ser utilizados em aplicações biomédicas, os nanocompostos devem ser hemocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos ao organismo.

A escolha de se avaliar a biocompatibilidade de PAMs, constituídos de NPs de maghemita baseadas em polímeros de albumina, foi devido ao fato desses nanocompostos apresentarem propriedades interessantes para aplicações biomédicas, com grande possibilidade de serem utilizados em futuras aplicações para tratamento e diagnóstico de diferentes doenças, como o câncer. Exemplifica

essa possibilidade, o fato de já existir uma droga aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento de câncer de mama metastático, baseada em NPs de albumina (não-magnéticas) associadas com o quimioterápico paclitaxel. Essa nova formulação, comercializada com o nome Abraxane[®], causa menos efeitos colaterais em comparação com a administração do paclitaxel livre, além de permitir maior direcionamento para o tumor (Ibrahim et al., 2002, 2005; Gradishar et al., 2005; Nyman et al., 2005).

Um dos atributos interessantes dos PAMs é o fato da albumina ser biodegradável, não tóxica e não imunogênica, além de ter propriedades antioxidantes e ser a principal proteína do soro (Chuang et al., 2002). Os PAMs foram preparados utilizando-se albumina bovina, que apresenta aproximadamente 80% de homologia com a albumina humana e a de ratos (Bickel et al., 2001).

A albumina presente nos PAMs fornece determinadas características de superfície interessantes. Sabe-se que um dos principais problemas na aplicação de determinadas partículas *in vivo* é o rápido recobrimento por opsoninas presentes no soro, como anticorpos e fatores do complemento (Vonarbourg et al., 2006). As opsoninas agem facilitando a ligação de células fagocíticas, que vão retirar as partículas rapidamente da circulação evitando que elas atinjam o local de interesse (Illum e Davis, 1984; Leroux et al., 1995; Berry et al., 2003; Owens III e Peppas, 2006). As partículas que têm superfície hidrofóbica são mais rapidamente recobertas por opsoninas do que as que apresentam superfície hidrofílicas, permanecendo menos tempo na circulação (Lin et al., 1999; Vonarbourg et al., 2006; Dobrovolskaia e McNeil, 2007). De acordo com Ogawara et al. (2004) e Leroux et al., (1995), o recobrimento de NPs com proteínas do soro que não tem função de opsonina, como a albumina, faz com que o reconhecimento pelas células do sistema mononuclear fagocitário seja diminuído, embora os mecanismos envolvidos não estejam ainda bem elucidados. Dessa forma, os PAMs podem permanecer mais tempo no organismo, permitindo que cheguem ao local de interesse onde poderá ser utilizado, por exemplo, um campo magnético de frequência alternada para promoção da hipertermia e, assim, destruição mais específica de células tumorais.

As cargas de superfície também são importantes fatores para determinar a biocompatibilidade e a biodistribuição de determinadas NPs. Sabe-se que partículas catiônicas são mais facilmente internalizadas por células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas, devido às forças de atração com proteoglicanas

carregadas negativamente presentes na superfície dos fagócitos (Kwon et al., 2005). Além disso, de forma geral, partículas com superfície carregada positivamente (catiônicas) induzem mais reações inflamatórias do que as carregadas negativamente (aniônicas) ou as que possuem carga neutra (Dobrovolskaia e McNeil, 2007). Devido à presença de grande quantidade de aminoácidos com caráter ácido (como o ácido poliaspártico e ácido glutâmico) em comparação com aminoácidos de caráter básico (como lisina e argina), a molécula de albumina apresenta carga negativa em pH neutro (Bickel et al., 2001) e, dessa forma, os PAMs podem causar pouca ou nenhuma resposta inflamatória e serem menos fagocitados pelas células do sistema mononuclear fagocitário, permanecendo circulantes por mais tempo.

O tamanho das partículas também influencia a sua biodistribuição. De acordo com Gupta e Gupta (2005b), partículas maiores que 200 nm são usualmente seqüestradas pelo baço, como resultado da filtração mecânica e podem eventualmente ser removidas pelos fagócitos, resultando em menor tempo de circulação. Por outro lado, partículas com diâmetro menor que 10 nm são rapidamente removidas por meio do extravasamento e clearance renal. Partículas com tamanho em torno de 10 a 100 nm apresentam tamanho ideal, pois são pequenas o bastante para evadir o sistema mononuclear fagocitário, permanecendo mais tempo na circulação, bem como penetrar em pequenos capilares e assim ter uma distribuição mais efetiva (Moghimi et al., 2005; Heath e Davis, 2008). Neste trabalho, os PAMs apresentavam tamanho médio de 73 nm.

A associação de NPs à albumina também é vantajosa por essa proteína permitir a ligação de diferentes componentes, uma vez que apresenta diversos grupos amino e carboxílicos disponíveis para ligação de drogas, anticorpos e outros componentes. Quimioterápicos e anticorpos monoclonais para determinados tumores, por exemplo, podem ser associados aos PAMs permitindo a entrega do quimioterápico de forma específica para o tumor. Como neste trabalho foram utilizadas NPMs, somente um campo magnético externo teoricamente já poderia permitir esse direcionamento.

Além disso, os PAMs podem ser um importante instrumento no combate ao câncer, já que as células cancerosas superexpressam vários receptores para albumina, uma vez que utilizam essa proteína na sua nutrição por servirem como fonte de nitrogênio. Dessa forma, NPs associadas com albumina são então captadas

pelo tecido neoplásico em uma taxa maior do que o tecido normal (Simioni et al., 2006). Aliando-se a isso, o aumento da permeabilidade vascular tumoral e a baixa drenagem linfática características do câncer permitem um acúmulo maior e mais prolongado das partículas no tumor (Trynda-Lemiesz, 2004; Gradishar et al., 2005; Nie et al., 2007; Torchilin, 2007). A associação dessas partículas a drogas antineoplásicas e/ou a utilização de um campo magnético de frequência alternada para aumento da temperatura podem levar ao tratamento localizado do tumor, diminuindo a destruição de células saudáveis e, conseqüentemente, os efeitos colaterais.

O transporte da albumina através das células endoteliais é mediado pelo receptor gp60 que está envolvido na endocitose mediada por caveolina. A ligação da albumina ao receptor gp60 ativa a caveolina-1, que promove a formação de vesículas que transportam a albumina e outros constituintes do plasma através da célula endotelial para o espaço intersticial (Gradishar et al., 2005; Nyman et al., 2005; Desai et al., 2006). Além disso, uma proteína chamada osteonectina, também conhecida como proteína ácida rica em cisteína (SPARC), é expressa em diversas células tumorais e é secretada no intertúnculo tumoral. Por apresentar homologia com o receptor gp60, permite a ligação da albumina. Assim, essa proteína associada a quimioterápicos pode se acumular principalmente nos tumores possivelmente devido à ligação à SPARC, facilitando então o acúmulo intratumoral de drogas associadas à albumina (Gradishar et al., 2005; Nyman et al., 2005). Dessa forma, a utilização dos PAMs associados a quimioterápicos pode permitir o maior direcionamento de drogas para o tumor, tanto pela ligação da albumina à SPARC, quanto por um campo magnético externo, devido à presença das NPMs. Nesse caso, um campo magnético de frequência alternada também poderia ser utilizado para promover a liberação da droga dentro do tumor, além de induzir a hipertermia, levando à morte das células tumorais com menos efeitos nas células normais, uma vez que as células cancerosas são mais susceptíveis ao aumento de temperatura.

6.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS NPs DE MAGHEMITA

Especificamente em relação às NPs de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_4$) presentes nos PAMs, essas foram escolhidas por já estarem na forma oxidada, diferentemente da

magnetita, tendo portanto menor potencial em causar toxicidade tecidual, sendo mais promissoras para aplicações biomédicas. Estudos realizados no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília mostraram que NPs de maghemita recobertas por citrato (Brugin, 2007) ou recobertas por polifosfato (Portilho-Corrêa, 2007) apresentaram baixa toxicidade, sendo consideradas biocompatíveis.

As NPs de maghemita utilizadas neste trabalho, apresentavam tamanho médio de 8,9 nm e eram provenientes de um fluido magnético iônico estabilizado em pH ácido. Quando as partículas são preparadas em meio ácido, elas apresentam carga positiva e a não agregação das NPMs do fluido iônico depende principalmente da repulsão eletrostática. A atração entre as cargas positivas das NPs de maghemita e as cargas negativas dos polímeros de albumina permitiu uma forte interação entre esses componentes.

O componente férrico das partículas é fundamental para determinar a biocompatibilidade. Estudos realizados com NPs desenvolvidas a partir de diversas ferritas, porém recobertas com o mesmo surfactante, o ácido cítrico, causaram diferentes efeitos em camundongos. Nesses estudos, as NPs de ferrita de manganês induziram morte celular, genotoxicidade e reações inflamatórias severas (Lacava et al., 1999a); as NPs de magnetita causaram baixa genotoxicidade, não alteraram a proliferação de células da medula óssea e provocaram processo inflamatório brando (Garcia, 2002); enquanto que as NPs à base de ferrita de cobalto foram muito tóxicas às células do peritônio, induziram leve alteração da proliferação de células da medula óssea e pouco processo inflamatório (Kückelhaus, 2003).

Uma das preocupações do uso de NPMs é devido ao acúmulo excessivo de ferro, que induz a produção de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio e radical superóxido, que promovem a peroxidação da membrana celular, a oxidação de proteínas e causam dano ao DNA (Meneghini, 1997; Andrews, 2005; Papanikolaou e Pantopoulos, 2005). O dano à membrana celular gera a síntese de prostaglandinas, que causam vasodilatação e têm ação quimiotática, atraindo células de defesa, estimulando assim a inflamação, que pode inclusive levar ao dano tecidual (Abbas e Lichtman, 2005). Entretanto, acredita-se que a excreção do ferro é estimulada pelo aumento da sua concentração no organismo (Oates et al, 2000; Andrews, 2005), o que pode diminuir os efeitos negativos da aplicação das NPMs.

6.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS EFEITOS DOS PAMs NA ANÁLISE CITOMÉTRICA DO SANGUE PERIFÉRICO

A análise citométrica do sangue periférico é um método rotineiro para verificar a indução e a severidade de processos inflamatórios, alérgicos, parasitários, entre outros. As contagens global e diferencial de leucócitos tiveram aplicações importantes nesta pesquisa, uma vez que a determinação da biocompatibilidade dos PAMs depende, além de outros fatores, da verificação dos efeitos no sistema imune. De acordo com Chan (2006) e Dobrovolskaia e McNeil (2007), dependendo da composição e das características das NPs, elas podem estimular ou suprimir a resposta imune.

Ao microscópio de luz é possível diferenciar os leucócitos do sangue quanto ao seu aspecto morfológico em: linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e monócitos. Os mastócitos são células raramente observadas no sangue periférico e não foram verificados em nenhuma lâmina analisada.

Os linfócitos são células que variam de 8 a 12 μm (dependendo do estado de ativação), apresentam núcleo grande, com cromatina densa, e pouco citoplasma. Existem vários tipos de linfócitos, com diferentes funções, mas não é possível fazer a distinção por meio da análise morfológica. Os linfócitos podem agir na destruição direta de materiais estranhos, na apresentação de antígenos, na liberação de substâncias estimulantes para outras células e na produção de anticorpos (Abbas e Lichtman, 2005). Neste estudo, foi verificado que a aplicação intraperitoneal dos PAMs induziu diminuição significativa da contagem de linfócitos do sangue somente 7 dias após o tratamento, em comparação com o grupo que não recebeu tratamento. O mesmo resultado foi encontrado quando NPs de magnetita recobertas com ácido poliaspártico foram aplicadas intravenosamente (Sadeghiani, 2004). A depleção da população de linfócitos ocorreu possivelmente devido à migração dessas células para os tecidos. Após 15 dias, a quantidade de linfócitos já havia retornado a valores similares aos do controle, mostrando que a linfopenia (diminuição da quantidade de linfócitos) foi temporária.

Como a população celular mais abundante no sangue dos camundongos é a de linfócitos, a diminuição na quantidade global de leucócitos ocorrida após 7 dias do tratamento com PAMs pode ser explicada pela diminuição na população de linfócitos, que não foi compensada pelo aumento das outras populações

leucocitárias. Como pôde ser observado, a contagem global de leucócitos e a contagem diferencial de linfócitos apresentaram variação semelhante, justamente devido ao fato dos linfócitos serem os principais leucócitos do sangue em termos numéricos. Resultado semelhante foi encontrado por Brugin (2007), ao analisar os efeitos de NPs de maghemita recobertas com citrato aplicadas via intravenosa.

A segunda população de leucócitos mais abundante no sangue dos camundongos é a de neutrófilos. Essas células têm como função primária identificar, ingerir e destruir microorganismos. Apresentam diâmetro de 12 a 15 μm , núcleo segmentado em 3 a 5 lóbulos conectados e finos grânulos citoplasmáticos. Os neutrófilos estão envolvidos na resposta inflamatória inicial, podendo migrar para o local da inflamação após poucas horas do reconhecimento do organismo estranho (Junqueira e Carneiro, 2004; Abbas e Lichtman, 2005). Após 24 horas do tratamento com PAMs, foi observada diminuição significativa na quantidade de neutrófilos circulantes no sangue, em comparação com os animais não tratados, que ocorreu provavelmente devido à migração dessas células para outros órgãos. Essa migração, relativamente tardia, sugere que os PAMs demoraram mais tempo para serem reconhecidos pelas células do sistema mononuclear fagocitário possivelmente devido às suas características de superfície. Após 48 horas, a população de neutrófilos começou a aumentar, não apresentando mais diferença significativa em relação ao controle, mostrando que a amostra induz reação inflamatória temporária. Após 15 dias do tratamento com PAMs, a quantidade de neutrófilos era bastante similar a do grupo controle sem tratamento. Resultados diferentes foram encontrados por Portilho-Corrêa (2007), ao analisar os efeitos da aplicação intravenosa de NPs de maghemita recobertas com polifosfato, que identificou aumento dose dependente na quantidade de neutrófilos no sangue após 30 minutos a 12 horas da aplicação da droga. Os resultados divergentes observados neste trabalho, em comparação com os verificados por Portilho-Corrêa (2007), demonstram que mudanças na cobertura, na via de administração e até mesmo do tamanho das nanopartículas, são capazes de alterar os efeitos biológicos de diferentes nanocompostos.

Já os eosinófilos são leucócitos envolvidos nas reações inflamatórias tardias, sendo atraídos por citocinas e quimiocinas produzidas por linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Os eosinófilos apresentam aproximadamente o mesmo tamanho dos neutrófilos, núcleo bilobulado e grânulos citoplasmáticos grosseiros que se coram

fortemente pela eosina. No local da inflamação, essas células liberam seus grânulos, que contêm substâncias que induzem reações alérgicas (Junqueira e Carneiro, 2004; Abbas e Lichtman, 2005). Após 6 horas e 7 dias da aplicação intraperitoneal dos PAMs, foi verificada diminuição na quantidade de eosinófilos, que pode ter sido devido à migração dessas células para outros locais. A diminuição nessa população celular foi transitória e temporária, uma vez que após 15 dias a quantidade de eosinófilos era similar a do grupo controle sem tratamento. Resultados opostos foram encontrados por Portilho-Corrêa (2007), que identificou um aumento nessa população celular após 24 horas da aplicação de NPMs recobertas com polifosfato, mas que retornou a valores similares ao controle em 7 dias.

Os monócitos, as células que dão origem aos macrófagos teciduais, apresentam tamanho de 10 a 15 μm , possuem núcleo em forma de rim, cromatina frouxa e citoplasma abundante com grânulos muito finos (Junqueira e Carneiro, 2004; Abbas e Lichtman, 2005). Não foi verificada qualquer alteração significativa dessa população celular nos diferentes tempos analisados após o tratamento com PAMs ou SFB, diferentemente dos resultados obtidos por Sadeghiani (2004), que identificou que NPs de magnetita recobertas com ácido poliaspártico induzem o aumento na quantidade de monócitos circulantes.

As diferentes alterações observadas na análise citométrica foram temporárias, uma vez que após determinados períodos, os dados já se apresentavam dentro dos padrões encontrados no grupo controle sem tratamento. Já era esperado que os PAMs não causassem efeitos severos, uma vez que a albumina é biocompatível e possui características interessantes, como carga negativa, que diminui a imunogenicidade (Cui e Mumper, 2002; Dobrovolskaia e McNeil, 2007).

Não foi verificada nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados com PAMs e SFB, após o mesmo tempo de tratamento, e nem entre os grupos tratados com SFB e o grupo não tratado. Os grupos tratados com SFB, nos mesmos tempos de tratamento com PAMs, foram adicionados pela possibilidade do próprio SFB utilizado para diluir a amostra liofilizada, causasse alterações nos parâmetros analisados. Dessa forma, não foi observado qualquer efeito significativo do SFB na contagem de leucócitos do sangue periférico.

Os resultados encontrados na análise citométrica do sangue sugerem que os PAMs são biocompatíveis nas condições analisadas, uma vez que as alterações

observadas na contagem global e diferencial de leucócitos do sangue foram temporárias.

6.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS EFEITOS DOS PAMs NA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS PERITONEAIS

Como a aplicação dos PAMs ocorreu via intraperitoneal, foram avaliados os efeitos na contagem diferencial de leucócitos presentes no peritônio, com o objetivo de verificar a ocorrência de inflamação. O peritônio compreende uma camada de epitélio simples pavimentoso associado a tecido conjuntivo que reveste os órgãos da cavidade abdominal.

As células mais abundantes na cavidade peritoneal são os macrófagos e os linfócitos. Os macrófagos apresentam características morfológicas muito variáveis, mas em geral medem entre 10 e 30 µm de diâmetro e apresentam núcleo oval ou em forma de rim localizado excêntricamente (Junqueira e Carneiro, 2004). Estas células fazem parte do sistema mononuclear fagocitário, exercendo papel fundamental na apresentação e combate a agentes estranhos. Quando ativados, produzem uma variedade de substâncias, como citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral, interleucina 1, interleucina 12, entre outras), óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. As citocinas podem estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos e também atrair neutrófilos e eosinófilos para o local da inflamação (Neuhaus e Watson, 2004). O óxido nítrico induz vasodilatação e diapedese, enquanto que as espécies reativas de oxigênio são produzidas para destruição de agentes estranhos, mas em excesso podem causar dano tecidual.

Neste estudo não foi verificada qualquer alteração significativa, em nenhum dos tempos analisados, na quantidade de macrófagos presentes no peritônio. Esses resultados sugerem que os PAMs não estimularam a migração de monócitos do sangue periférico para a cavidade peritoneal, o que corrobora com a ausência de alterações na contagem de monócitos do sangue, relatada anteriormente. A depleção de macrófagos peritoneais observada em outros trabalhos utilizando NPMs (Lacava et al., 1999a; Lacava et al., 1999b; Freitas et al., 2002), foi considerada como sendo induzida pela fagocitose de grande quantidade de NPs, que perdem a

cobertura e se agregam, culminando no rompimento e morte das células fagocitárias, e também pelo efeito genotóxico das NPMs utilizadas nesses estudos.

Além disso, durante a análise das lâminas de esfregaço peritoneal, em microscópio de luz (1000x), não foram visualizados agregados de NPs dentro de macrófagos, o que sugere que a cobertura de albumina evitou o reconhecimento pelas células do sistema mononuclear fagocitário ou não foram formados agregados de NPs. Como os PAMs estudados apresentavam tamanho em torno de 73 nm, eles só poderiam ser visualizados ao microscópio de luz se estivessem aglomerados. Esses resultados são diferentes dos encontrados por Kückelhaus (2003), que verificou a presença de aglomerados de NPs de ferrita de cobalto recobertas com citrato dentro de macrófagos peritoneais, assim como Silva et al. (2005), que estudaram a captação de NPs de magnetita recobertas com DMSA, ácido cítrico e dextrana pelas células do peritônio. Os compostos com carga de superfície negativa, que é o caso dos PAMs, são menos fagocitados pelas células do sistema mononuclear fagocitário do que os compostos com carga positiva, o que pode explicar a ausência de agregados dentro dos macrófagos.

Também não foram verificadas alterações significativas nas contagens de linfócitos peritoneais, diferentemente dos estudos realizados com NPs de ferrita de manganês recobertas com citrato (Lacava et al., 1999a; Freitas et al., 2002), que induziram a migração de linfócitos para a cavidade peritoneal.

Entretanto, foram verificadas significativas alterações nas contagens de neutrófilos e eosinófilos peritoneais. Foi observado aumento, considerado estatisticamente significativo em relação ao grupo controle sem tratamento, na população de neutrófilos peritoneais dos grupos analisados de 6 a 48 horas após a aplicação intraperitoneal de PAMs, sendo observada uma leve diminuição após 24 horas, que voltou a aumentar após 48 horas. Os dados observados sugerem que o aumento na quantidade de neutrófilos foi devido também a substâncias presentes no SFB, utilizado como diluente dos PAMs liofilizados, uma vez que os animais tratados com SFB também apresentaram aumento significativo de neutrófilos após 6 horas, de forma similar aos tratados com PAMs. Entretanto, após 12 horas da aplicação intraperitoneal de SFB, a quantidade de neutrófilos começou a diminuir atingindo valor semelhante ao do grupo controle sem tratamento, permanecendo assim durante os tempos posteriores analisados neste estudo. Dessa forma, os resultados sugerem que a presença dos PAMs estimulou o recrutamento de neutrófilos para o

peritônio, o que é indicativo de resposta inflamatória, que também foi observada em outros trabalhos do grupo (Lacava et al., 1999a; Lacava et al., 1999b; Freitas et al., 2002). Possivelmente os neutrófilos foram atraídos para o peritônio devido à produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. A diminuição da quantidade de neutrófilos após 24 horas do tratamento com PAMs pode ser devido à morte de neutrófilos, uma vez que essas células morrem após a fagocitose de organismos estranhos. O aumento subsequente provavelmente foi devido ao estímulo constante da inflamação e da ação de citocinas. Entretanto, após 7 dias da aplicação dos PAMs, a quantidade de neutrófilos era similar à do grupo controle que não recebeu tratamento e à do grupo tratado com SFB, mostrando que a inflamação foi temporária.

Em relação aos eosinófilos, também foi observado aumento significativo dessas células nos grupos analisados de 6 horas a 7 dias após a administração dos PAMs. Os efeitos observados foram devido à presença dos PAMs, uma vez que os grupos tratados com SFB não induziram aumento significativo dessas células em comparação com o grupo não tratado. Os eosinófilos estão envolvidos em muitos processos alérgicos e na resposta contra a infecção por helmintos, mas também são encontrados em abundância em infiltrados inflamatórios por serem atraídos por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-5 (Abbas e Lichtman, 2005). Dessa forma, a presença concomitante de neutrófilos e eosinófilos, em quantidades aumentadas, indica que os PAMs podem causar reação inflamatória, mas esta é temporária, uma vez que a quantidade de eosinófilos dos animais analisados após 15 dias da administração dos PAMs era similar à do grupo controle que não foi submetido a nenhum tratamento.

Na contagem diferencial de leucócitos do peritônio foi possível verificar a presença de mastócitos, células que não foram encontradas no sangue circulante. Os mastócitos apresentam núcleo pequeno e esférico. O citoplasma é repleto de grânulos espessos que muitas vezes impedem a visualização do núcleo e que contêm histamina, fatores quimiotáticos para eosinófilos, e leucotrienos (Junqueira e Carneiro, 2004). Neste estudo, foi verificada depleção na quantidade de mastócitos peritoneais 12 e 48 horas após o tratamento com PAMs, mas essas diminuições não foram consideradas significativas e podem ser explicadas pelo aumento na quantidade de neutrófilos e eosinófilos nesses mesmos tempos. Entretanto, foi observada diminuição estatisticamente significativa de mastócitos após 30 dias do

tratamento com PAMs, que provavelmente ocorreu devido ao aumento das outras populações leucocitárias analisadas. Em 30 dias, as contagem de todos os outros leucócitos (linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) apresentavam-se levemente acima do grupo controle não tratado, o que resultou na diminuição de mastócitos contados.

Os resultados da contagem diferencial de leucócitos peritoneais demonstram que a amostra estudada induziu inflamação no local da aplicação dos PAMs. Entretanto, os efeitos foram temporários, sugerindo que a amostra pode ser considerada biocompatível sob as condições analisadas.

6.5. CONSIDERAÇÕES SOBRE A AÇÃO DOS PAMs SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS PERITONEAIS

O teste de viabilidade celular é bastante utilizado para estudar a toxicidade de diferentes compostos. Neste estudo foi utilizado o corante azul de tripan, que reage com células que apresentam defeitos na membrana, penetrando somente nas células mortas, corando-as em azul. As células consideradas viáveis apresentam coloração amarelo brilhante. Nesta pesquisa, foi verificado o efeito dos PAMs na viabilidade dos leucócitos peritoneais, dos quais os predominantes são os macrófagos e linfócitos.

Os macrófagos, por fazerem parte do sistema mononuclear fagocitário, têm papel importante na resposta primária gerada na cavidade abdominal em resposta a agentes estranhos, como as NPs. A morte de macrófagos demonstrada por Kückelhaus (2003), que estudou a biocompatibilidade de NPs de ferrita de cobalto recobertas com citrato, foi proporcional à quantidade de partículas fagocitadas. Na presença de partículas estranhas, os macrófagos também são ativados e produzem substâncias, como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, que podem levar à morte celular.

Neste trabalho, foi observado que a morte das células peritoneais aumentou em aproximadamente 28% e 15%, após 24 horas e 15 dias, respectivamente, do tratamento com PAMs em comparação ao grupo controle sem tratamento. Não foi verificada nenhuma alteração na viabilidade nos grupos tratados com SFB, o que indica que os efeitos observados não foram causados pelo diluente utilizado.

Diferentemente de outros estudos, como os realizados por Lacava et al. (1999a), Lacava et al. (1999b) e por Kückelhaus (2003), que observaram aglomerados de NPMs dentro de macrófagos, neste estudo não foi possível visualizar por microscopia de luz a presença de agregados de NPMs no interior de macrófagos. Dessa forma, os resultados encontrados nesta pesquisa indicam que a diminuição da viabilidade dos leucócitos peritoneais não ocorreu pelo rompimento de macrófagos e neutrófilos. O aumento da morte celular após 24 horas e 15 dias da aplicação dos PAMs, apesar de significativo, foi transitório, e possivelmente foi devido à formação de espécies reativas de oxigênio que causaram dano ao DNA.

Estudos prévios utilizando PAMs em cultura de células de macrófagos de camundongos mostraram a baixa toxicidade dessa amostra *in vitro* (Simioni et al., 2006). Testes posteriores mostraram que PAMs preparados a partir de um fluido magnético iônico, com concentração de $2,28 \times 10^{14}$ partículas/cm³, induziram 70% e 18% de morte em macrófagos *in vitro*, submetidos ou não, respectivamente, à aplicação de campo magnético (Simioni et al., 2007). Esses efeitos podem ter sido devido à alta susceptibilidade magnética dos PAMs e sugerem que essa amostra pode ser uma boa opção para aplicação da magnetohipertermia, uma vez que não há necessidade de grande quantidade de partículas para causar aumento suficiente da temperatura para provocar a morte celular.

A diminuição da viabilidade das células peritoneais observada neste trabalho foi temporária e transitória, o que corrobora com a idéia de que os PAMs possam ser considerados biocompatíveis nas condições analisadas.

6.6. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS EFEITOS DOS PAMs NAS ANÁLISES GENOTÓXICA E CITOTÓXICA NA MEDULA ÓSSEA

O teste do micronúcleo é um método de estudo estabelecido para identificar agentes físicos e substâncias químicas que causam dano cromossômico, sendo aceito internacionalmente para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos medicamentos (Ribeiro, 2003). Essa avaliação é importante uma vez que danos cromossômicos estão associados ao aparecimento e progressão de tumores, além de influenciarem o desenvolvimento e a reprodução (Krishna e Hayashi, 2000).

O micronúcleo (MN) é um pequeno núcleo, que varia de 5% a 20% do

tamanho do núcleo original (Krishna e Hayashi, 2000), formado por segmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros durante a divisão celular. O ensaio de micronúcleo em eritrócitos da medula óssea é um método simples para identificação da genotoxicidade a essas células.

Diferentemente das outras análises realizadas neste trabalho, o estudo da genotoxicidade e da citotoxicidade dos PAMs foi realizado somente após 1, 2, 7, 15 e 30 dias após o tratamento. A coleta de células da medula óssea, para realização do teste do micronúcleo, é realizada comumente entre 1 e 2 dias após o tratamento com a droga a ser analisada, uma vez que após esse tempo a maioria das drogas já foi metabolizada. Como os eritrócitos estão em constante renovação, os efeitos já não serão observados na medula óssea. Entretanto, as NPMs podem permanecer por longos períodos no organismo, o que justifica a realização do teste de MN até 30 dias após o tratamento com PAMs. Barbosa (2004) e Sadeghiani (2004), por exemplo, identificaram aumento significativo na quantidade de MNs em eritrócitos policromáticos (EPCs) até 15 e 30 dias, respectivamente, após a aplicação de diferentes NPMs. A realização do ensaio de micronúcleo a partir de 24 horas é devido ao fato que os MNs são observados nas células filhas dos eritroblastos após a sua divisão, e a formação dos EPCs ocorre em torno de 20 horas depois. Dessa forma, a presença de MNs em EPCs encontrados antes de 24 horas não se deve ao uso da substância testada.

Durante a eritropoiese normal os eritroblastos se dividem originando células filhas que, no decorrer da sua maturação, expulsam o núcleo formando os EPCs, que possuem grande quantidade de RNA e se coram em roxo pelo corante Giemsa. Os EPCs, com o passar do tempo, perdem RNA e passam a conter principalmente hemoglobina, tornando-se eritrócitos maduros chamados de eritrócitos normocromáticos (ENCs), que se coram em rosa pelo mesmo corante (Krishna e Hayashi, 2000; Junqueira e Carneiro, 2004). Entretanto, a ação de substâncias clastogênicas (que quebram cromossomos) ou aneugênicas (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) pode fazer com que fragmentos cromossômicos não sejam incorporados ao núcleo principal das células filhas após a mitose, formando os MNs, que ficam retidos no citoplasma dos eritrócitos (Krishna e Hayashi, 2000, Ribeiro, 2003).

Neste trabalho, não foi verificado aumento estatisticamente significativo na quantidade de micronúcleos em EPCs nem em ENCs em nenhum dos tempos

analisados, tanto nos animais tratados com PAMs, quanto nos animais tratados com SFB, em comparação com o grupo controle sem tratamento. Além disso, as médias de micronúcleos em EPCs e em ENCs, encontradas nos diferentes tempos após o tratamento com PAMs ou SFB, ficaram em torno de 5, o que está de acordo com Weaver e Torous (2000), que relataram que a frequência de micronúcleo em EPCs é de aproximadamente 6 MNs a cada 2000 EPCs em camundongos não submetidos a agentes genotóxicos. Dessa forma, os PAMs não mostraram ter ação genotóxica, o que indica a biocompatibilidade dessa amostra sob os parâmetros analisados neste estudo.

O grupo controle positivo, tratado com ciclofosfamida, foi utilizado para assegurar que a metodologia utilizada é confiável. A ciclofosfamida é uma substância sabidamente clastogênica e que, por esse motivo, induz a formação de MNs. Os animais do grupo controle positivo analisados neste trabalho apresentaram aumento significativo na quantidade de MNs em EPCs, como era esperado, demonstrando a genotoxicidade dessa substância durante as 24 horas de exposição. A ausência de alterações significativas na frequência de MNs em ENCs no grupo controle positivo também era esperada, uma vez que após 24 horas ainda não são observados ENCs decorrentes da maturação de EPCs contendo micronúcleo.

Segundo Ribeiro (2003), é importante também avaliar o percentual de EPC (%EPC) em relação ao total de eritrócitos, com o objetivo de se avaliar a citotoxicidade na medula óssea. Normalmente, o %EPC varia de 50 a 60% (Gollapudi e McFadden, 1995), sendo que valores menores que 20% em relação ao grupo controle indicam citotoxicidade (Ribeiro, 2003). Neste estudo não foi verificada diferença estatística no %EPC, em nenhum dos tempos analisados, nos animais tratados com PAMs em comparação com os grupos controles. Esses resultados indicam que os PAMs não causam alteração da proliferação da linhagem eritrocitária da medula óssea, não sendo considerados citotóxicos. Resultados diferentes foram encontrados por Kückelhaus (2003), Sadeghiani (2004) e Barbosa (2004) que verificaram redução do %EPC após o tratamento com NPs de ferrita de cobalto recobertas com citrato, NPs de magnetita recobertas com ácido poliaspártico e NPs de magnetita recobertas com ácido glucônico, respectivamente, sendo que as alterações foram dose e tempo dependente.

Sabe-se que o excesso de ferro pode induzir a formação de radicais livres causando dano oxidativo ao material genético das células. Em um estudo realizado por Premkumar e Bowlus (2003), foi verificado que camundongos cuja alimentação continha excesso de ferro apresentavam aumento na frequência de MNs nos eritrócitos da medula óssea. Entretanto, neste trabalho, os PAMs não causaram alteração na quantidade de MNs e nem no %EPC, indicando que a divisão e a maturação dos eritroblastos não foram afetadas pelo ferro presente na amostra. A ausência de genotoxicidade e citotoxicidade após a administração dos PAMs é um fator importante para estimular futuras pesquisas objetivando aplicações biomédicas dessa amostra.

6.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica é um método imprescindível para se avaliar a distribuição e a biocompatibilidade de diferentes amostras baseadas em NPMs. Por meio da observação dos tecidos, é possível verificar se uma determinada cobertura promove o direcionamento para um órgão específico, como observado por Chaves et al. (2002) e Garcia (2005), utilizando NPs de magnetita recobertas com DMSA, que mostraram direcionamento preferencial para os pulmões. Além disso, o estudo dos tecidos permite a verificação de possíveis alterações teciduais e indução de processos inflamatórios causados pela presença de NPs.

A cobertura e as características da superfície das NPMs são fatores relacionados ao maior tempo de circulação no organismo e ao acúmulo preferencial em determinados locais. Percebe-se que diversas formulações de NPs se depositam preferencialmente no fígado, baço e outros locais de acúmulo de células do sistema mononuclear fagocitário, dependendo das suas características de superfície (Moghimi et al., 2005; Garnett e Kallinteri, 2006; Vonarbourg et al., 2006). Partículas que são mais hidrofóbicas são preferencialmente captadas pelo fígado, seguido pelo baço e pulmões. As nanopartículas que são mais hidrofílicas, em torno de 35 nm de diâmetro, como as preparadas de poli(vinil pirrolidona), mostram menos que 1% de captação pelo baço e fígado e, 8 horas depois da injeção, mostram 5 a 10% de partículas ainda circulantes nos vasos sanguíneos (Brannon-Peppas e Blanchette, 2004).

Em trabalhos anteriores utilizando NPMs, desenvolvidos nos laboratório de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, diversos órgãos, como fígado, pulmões, baço, pâncreas, rins e cérebro, foram analisados por microscopia de luz. Entretanto, na maioria dos estudos foi observado que as partículas se acumulavam preferencialmente no fígado, pulmões e baço (Garcia, 2002; Sadeghiani, 2004; Brugin, 2007; Portilho-Corrêa, 2007), o que levou à escolha desses órgãos para serem analisados neste trabalho. Vale ressaltar, que os órgãos cérebro, rins, pâncreas e coração também foram coletados e estão sendo analisados.

Os agregados de NPMs podem ser visualizados pela coloração de HE, em que apresentam cor marrom dourado, e pelo método de Perls, em que os aglomerados de ferro são corados em azul. Neste trabalho, não foi possível verificar por microscopia de luz, mesmo em aumento de 1000x, a presença de agregados de NPMs no fígado e nos pulmões, com exceção de apenas um animal que apresentou agregados nos pulmões após 24 horas do tratamento com os PAMs. Já o baço possui naturalmente uma grande quantidade de ferro endógeno, o qual se apresenta corado da mesma maneira que os agregados de NPMs, dificultando a diferenciação desses aglomerados nos animais tratados com os PAMs.

O fato dos PAMs não terem sido visualizados nos órgãos estudados, com exceção de um animal que apresentou aglomerados nos pulmões, sugere que a albumina, por ser hidrofílica e aniônica, evita ou pelo menos diminui o reconhecimento pelos fagócitos. Um dos fatores que sugerem que os PAMs não tenham sido fagocitados é o fato deles não terem sido visualizados no interior de macrófagos durante a contagem diferencial de leucócitos do peritônio, diferentemente do observado por Kückelhaus (2003), que verificou a presença de aglomerados de NPs de ferrita de cobalto recobertas com citrato no interior de macrófagos peritoneais. Além disso, durante a análise de viabilidade celular não foram visualizados aglomerados dentro dos macrófagos, diferentemente das análises feitas por Brugin (2007) e por Portilho-Corrêa (2007).

Essa hipótese está de acordo com Brannon-Peppas e Blanchette (2004), que demonstraram a baixa captação de NPs hidrofílicas pelo baço e pelo fígado, órgãos que apresentam grande quantidade de células mononucleares fagocitárias e, portanto, permaneceram mais tempo na circulação sanguínea. Caso realmente os PAMs não tenham se acumulado nos órgãos estudados, diferentemente do observado em estudos utilizando NPMs de diferentes composições (Garcia, 2002;

Garcia, 2005; Barbosa, 2004; Sadeghiani, 2004; Brugin, 2007; Portilho-Corrêa, 2007), eles teoricamente estariam mais disponíveis para serem guiados por um campo magnético externo para um local específico, por exemplo um tumor, podendo então ser aplicada a técnica de magnetohipertermia para destruição mais específica das células cancerosas.

Entretanto, a não visualização dos PAMs por meio da microscopia de luz, não significa que eles não estejam presentes nos órgãos analisados. Como as partículas estudadas apresentam tamanho nanométrico, elas só são visíveis ao microscópio de luz quando se apresentam aglomeradas. Ao serem fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário, as NPs perdem sua cobertura e, assim, sua estabilidade devido à perda da repulsão estérica, aglomeram e, conseqüentemente, precipitam. Aglomerados de partículas apresentam tamanhos que podem dificultar a fagocitose e a eliminação do organismo, induzindo processos inflamatórios que podem levar ao dano tecidual, além de que, no interior dos capilares, podem interromper a circulação. Contudo, neste estudo foram utilizadas NPs de maghemita preparadas a partir de um fluido iônico, cuja estabilidade está essencialmente associada à repulsão eletrostática. As NPs de maghemita foram preparadas em pH ácido, ficando carregadas positivamente. Assim, mesmo com a perda da cobertura, é possível que as NPMs se repeliram por apresentarem mesma carga de superfície, evitando a aglomeração.

Dessa forma, outra hipótese possível é de que os PAMs estariam presentes nos órgãos analisados, mas por não serem facilmente reconhecidos por fagócitos não teriam perdido sua cobertura e, conseqüentemente as NPMs não se agregaram, ou a própria repulsão eletrostática das NPMs evitou a aglomeração das mesmas, impedindo, assim, a visualização ao microscópio de luz. A não aglomeração dos PAMs é uma característica interessante, uma vez que uma das propriedades desejáveis de amostras biocompatíveis é que elas sejam estáveis o suficiente para não formarem aglomerados e precipitarem.

Um dos principais fatores que validam essa hipótese é de que na análise do cérebro dos animais tratados com PAMs, realizada por Cintra (comunicação pessoal), foi visualizada a presença dos PAMs por microscopia eletrônica de transmissão (MET) até 30 dias após a aplicação da amostra, porém em alguns tempos a presença dos PAMs não foi revelada quando analisada por microscopia de luz. A técnica de MET, devido ao seu alto poder de resolução, permite a visualização

ultraestrutural. Assim, como não foi possível visualizar os PAMs no fígado e no baço por meio da microscopia de luz, uma das formas de se determinar a presença dos PAMs nesses órgãos e, também, nos pulmões, seria a análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Outro fator que corrobora com a idéia de que os PAMs poderiam estar presentes nos órgãos analisados, é o estudo realizado por Gong et al. (2004), que demonstraram que NPMs de albumina podem atravessar o endotélio e se acumular no fígado de camundongos com tumor hepático. O direcionamento para o fígado ocorreu devido à maior vascularização do tumor e, quando foi aplicado campo magnético, houve acúmulo ainda maior de NPMs no tecido tumoral. Além disso, segundo Langer et al. (2003), NPs em torno de 100 nm são capazes de atravessar as fenestrações nos capilares sinusóides do fígado, que apresentam tamanho em torno de 150 a 200 nm (McNeil, 2005), acumulando-se nesse órgão. Neste trabalho, os PAMs apresentavam tamanho médio de 73 nm, o que portanto permite o acúmulo no fígado.

Entretanto, é provável que os PAMs não tenham se direcionado principalmente para o fígado, uma vez que em uma pesquisa desenvolvida por Ogawara et al. (2004), cujos dados corroboram com os relatos de Brannon-Peppas e Blanchette (2004), foram comparados os efeitos de nanoesferas de 50 nm recobertas ou não por albumina. Verificou-se que os nanocompostos recobertos com albumina permaneciam por longo tempo na corrente sanguínea, mas se acumulavam pouco no fígado, em comparação com as nanoesferas sem cobertura, que eram facilmente reconhecidas pelas células fagocitárias e retiradas do organismo.

Independentemente da presença ou não dos PAMs no fígado e no baço, esses nanocompostos, nas condições estudadas, não causaram qualquer alteração tecidual nesses órgãos em nenhum dos animais tratados com PAMs ou com SFB. Leves infiltrados inflamatórios no fígado foram observados em todos os tempos, mas também eram encontrados nos animais controles que não receberam nenhum tratamento.

Embora não tenham sido visualizados agregados de NPMs nos pulmões, exceto em um animal analisado após 24 horas do tratamento com PAMs, foi verificado espessamento dos septos interalveolares em todos os tempos de tratamento. Barbosa (2004) também identificou espessamento dos septos alveolares

após a aplicação de NPs de magnetita recobertas com ácido glucônico, entretanto, diferentemente deste trabalho, foi possível a visualização de agregados de NPMs nos pulmões. Contudo, nesta pesquisa, o espessamento foi também observado em todos os tempos após o tratamento com SFB, indicando que essa substância causou alterações nos pulmões. A ausência de espessamento nos animais que não foram submetidos a nenhum tratamento, indica que a ocorrência dessa alteração foi causada pelas substâncias injetadas intraperitonealmente nos animais. Após 30 minutos da aplicação dos PAMs ou de SFB, o espessamento ainda era pouco, mas já era bastante intenso após 6 horas e com aumento de infiltrado inflamatório próximo a vasos e bronquíolos, em comparação com os animais controle sem tratamento, que também apresentavam poucos infiltrados inflamatórios e nenhum espessamento. Entretanto, depois de 12 horas, os animais tratados com SFB apresentavam menor espessamento dos septos interalveolares e também áreas de aspecto normal, enquanto que nos animais tratados com PAMs foi observado que o espessamento dos septos atingia áreas maiores dos pulmões em comparação com os animais analisados após 6 horas do tratamento. Após 24 horas, foram visualizados aglomerados de NPMs em apenas 1 animal dos 3 analisados, que foram confirmados pela coloração de Perls, sendo que tais aglomerados estavam associados a infiltrados inflamatórios próximos a vasos e bronquíolos. Os 3 animais analisados após 24 horas apresentavam maior espessamento do que os controles tratados com SFB estudados após o mesmo tempo de tratamento, além de apresentarem grande quantidade de leucócitos infiltrados. Os animais analisados após 48 horas, 7, 15 e 30 dias após a aplicação dos PAMs apresentavam algumas áreas com septos espessados e leves infiltrados inflamatórios, similares aos encontrados nos controles tratados com SFB após os mesmos tempos de tratamento, indicando uma tendência de melhora nas alterações causadas pela presença tanto do SFB, quanto dos PAMs.

Devido aos aspectos observados nos pulmões, o SFB, utilizado como diluente dos PAMs liofilizados, causou reações que levaram às alterações teciduais nesses órgãos. Entretanto, nos animais tratados com PAMs o espessamento dos septos alveolares foi mais intenso e duradouro e a quantidade de infiltrados inflamatórios foi maior em alguns tempos, em comparação com os animais tratados somente com SFB. Esses dados indicam que, embora tenham sido visualizados somente em um animal, os PAMs provavelmente estavam presentes nos pulmões, de forma não

agregada, o que potencializou os dados teciduais causados pelo diluente utilizado. A visualização de aglomerados de NPMs em um animal após 24 horas do tratamento com os PAMs, corrobora com a idéia de que esses nanocompostos não são rapidamente reconhecidos pelas células do sistema mononuclear fagocitário, permanecendo no organismo por tempo suficiente para atingir o local de interesse.

Os resultados observados na análise histológica não foram conclusivos para avaliar a distribuição dos PAMs no fígado, pulmões e baço. Entretanto, há indícios de que essa amostra possa ser considerada biocompatível, uma vez que não causou nenhum dano ao fígado e ao baço. Em relação aos pulmões, os principais efeitos prejudiciais foram induzidos pelo SFB, utilizado como diluente dos PAMs liofilizados. A utilização de outro diluente possivelmente aumentaria a biocompatibilidade da amostra em relação aos pulmões. As alterações significativas nesses órgãos, causadas pela aplicação dos PAMs, parecem ter ocorrido principalmente após 12 e 24 horas do tratamento, apresentando, portanto, um efeito temporário, o que é mais um indicativo da biocompatibilidade dos nanocompostos estudados neste trabalho.

6.8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os testes empregados nesta pesquisa são comumente utilizados para investigação de NPMs para aplicações biomédicas. Os resultados encontrados demonstram que, sob as condições analisadas, os PAMs apresentam várias características que indicam sua biocompatibilidade. As alterações observadas na análise citométrica e na avaliação da viabilidade das células peritoneais foram temporárias, e podem ser consideradas como uma resposta normal à presença de materiais estranhos, como as NPs. Além disso, não foi verificado qualquer efeito genotóxico e citotóxico da amostra nos eritrócitos da medula óssea. Entretanto, não foi possível visualizar aglomerados de NPs nas análises histológicas por microscopia de luz, exceto nos pulmões de um animal, impedindo, assim, a avaliação da distribuição dos PAMs nos órgãos estudados. Mas, por outro lado, não foi evidenciada nenhuma alteração histológica no fígado, nem no baço, sendo observadas alterações somente nos pulmões, decorrentes, principalmente, pelo uso

do SFB como diluidor da amostra liofilizada. Vale ressaltar, também, que não foi observada morte de nenhum animal durante todo o período estudado.

Outro aspecto relacionado à biocompatibilidade refere-se à concentração da amostra utilizada. Vários trabalhos anteriores mostraram que a ocorrência de inflamação, genotoxicidade, citotoxicidade e alterações morfológicas eram dose dependente. Neste trabalho, foi utilizada uma concentração menor, tendo sido aplicadas $1,23 \times 10^{13}$ partículas em cada animal, dose aproximadamente 100 vezes menor do que a utilizada em outras pesquisas com diferentes NPMs (Barbosa, 2004; Sadeghiani, 2004; Brugin, 2007; Portilho-Corrêa, 2007). Contudo, diferentemente de todas as amostras testadas anteriormente, os PAMs estudados neste trabalho foram preparados a partir de um fluido magnético iônico que apresentava alta susceptibilidade magnética. Dessa forma, não há necessidade de se aplicar uma grande quantidade de partículas para que haja uma resposta satisfatória ao campo magnético, com o objetivo de se realizar a magnetohipertermia. Além disso, a baixa concentração de partículas injetadas diminui os efeitos colaterais, aumentando a biocompatibilidade da amostra, como foi verificado.

Devido aos resultados encontrados nesta pesquisa, julgamos ser interessante a análise dos órgãos fígado, pulmões e baço pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET), para confirmação da suposição de que as NPMs não foram visualizadas por microscopia de luz por não estarem agregadas. Em conformidade com essa idéia, amostras desses órgãos foram coletadas para realização de futuras análises por MET.

Outra forma de verificar a presença de NPMs é por meio da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPME), que foi realizada em estudos anteriores para estudar a biodistribuição de NPs de magnetita recobertas com dextrana (Lacava, 2004), ácido poliaspártico (Sadeghiani, 2004) e DMSA (Chaves et al., 2002; Garcia, 2005). Já foram realizadas coletas de fígado, pulmões, baço, pâncreas, coração, rins, cérebro, timo, medula óssea e sangue para análise da biodistribuição dos PAMs nesses órgãos, em diferentes tempos. Entretanto, por meio da técnica de RPME é possível quantificar a presença de NPMs somente em concentrações entre 10^{11} a 10^{18} partículas/cm³, assim, mesmo presentes em determinados órgãos, porém em concentrações abaixo de 10^{11} partículas/cm³, não há emissão de sinal magnético suficiente para quantificação das NPMs. Dessa forma, estamos buscando outras técnicas que permitam resultados mais precisos

para análise das amostras já coletadas, com o objetivo de estabelecermos o padrão da biodistribuição dos PAMs de 5 minutos a 30 dias.

Devido aos resultados positivos encontrados nesta pesquisa e na realizada por Cintra (comunicação pessoal) sobre os efeitos dos PAMs, outros estudos serão desenvolvidos com essa amostra, por acreditarmos na possibilidade do seu uso em futuras aplicações biomédicas. Há grande interesse na utilização de sistemas nanoparticulados para entrega de drogas e para indução da magnetohipertermia, especialmente para tratamento auxiliar do câncer. A verificação da biocompatibilidade dos PAMs, sob as condições analisadas neste trabalho, e a capacidade das mesmas atravessarem a barreira hemato-encefálica, observada por Cintra (comunicação pessoal), indicam que os PAMs podem ter importante aplicação em terapias de doenças cerebrais, uma vez que muitas drogas não conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica. Dessa forma, os PAMs poderiam ser utilizados como sistemas carreadores de drogas para tratamento de doenças cerebrais e até mesmo para tratamento do câncer por meio da magnetohipertermia. Estudos realizados por Bickel et al. (2001) já tinham mostrado que a albumina apresenta grande seletividade para o tecido cerebral, em comparação com outros órgãos como fígado, coração e pulmões, em ratos. Experimentos realizados por Thöle et al. (2002) demonstraram que lipossomas recobertos com polietilenoglicol associados com albumina bovina atravessaram o endotélio cerebral por endocitose. O mesmo foi verificado por Lu et al. (2005), utilizando NPs poliméricas conjugadas com albumina bovina. Dessa forma, pretendemos aprofundar os conhecimentos sobre a ação dos PAMs, realizando estudos em camundongos portadores de tumores.

Os resultados obtidos neste estudo, cujo objetivo geral era estudar os efeitos biológicos de polímeros de albumina magnéticos (PAMs), aplicados intraperitonealmente em camundongos fêmeas Swiss, permitem concluir que os PAMs suspensos em soro fetal bovino (SFB):

- Induzem ligeiro e temporário processo inflamatório, como constatado pela contagem global e diferencial dos leucócitos do sangue;
- Provocam aumento temporário de neutrófilos e eosinófilos peritoneais, células envolvidas na resposta inflamatória, sendo provável que o SFB tenha contribuído para esse efeito;
- Não formam agregados dentro de macrófagos e neutrófilos, como verificado pela análise das lâminas de esfregaço peritoneal, o que sugere que a albumina evitou o reconhecimento por células fagocíticas e/ou aglomeração das nanopartículas;
- Causam diminuição temporária da viabilidade das células peritoneais;
- Não induzem qualquer efeito genotóxico e citotóxico aos eritrócitos da medula óssea, como observado pelo teste de micronúcleo e pelo cálculo do percentual de eritrócitos policromáticos, respectivamente;
- Não se aglomeram, ou por não serem fagocitadas e subseqüentemente perderem sua cobertura, ou pelo fato das nanopartículas de maghemita preparadas a partir do fluido magnético iônico continuarem apresentando repulsão eletrostática em meio fisiológico. A ausência de aglomerados impediu a visualização das nanopartículas ao microscópio de luz;
- Não causam qualquer alteração na histologia do fígado e do baço, independente de estarem ou não presentes nesses órgãos;
- Causam espessamento dos septos interalveolares e de infiltrados inflamatórios nos pulmões. Entretanto, esses efeitos prolongados foram induzidos, principalmente, pelo SFB utilizado como diluente;
- Podem ser considerados biocompatíveis, nas condições estudadas, com potencial significativo para aplicações biomédicas.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

BARBOSA, L.S. **Avaliação *in vivo* da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico**. 2004. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

ANDREWS, N.C. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 159-169, 2005.

BERRY, C.C.; CURTIS, A.S.G. Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p. R198-R206, June 2003.

BERRY, C.C.; WELLS, S.; CHARLES, S.; CURTIS, A.S.G. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 25, p. 4551-4557, Nov. 2003.

BICKEL, U.; YOSHIKAWA, T.; PARDRIDGE, W.M. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 247-279, Mar. 2001.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J.O. Nanoparticle and target systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 11, p. 1649-1659, Sept. 2004.

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

BRUGIN, A. **Avaliação da biocompatibilidade / toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss**. 2007. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

CHAN, V.S.W. Nanomedicine: an unresolved regulatory issue. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 218-224, Dec. 2006.

CHAVES, S.B.; LACAVA, L.M.; LACAVA, Z.G.M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 38, n. 5, p. 3231-3233, Sept. 2002.

CHUANG, V.T.G.; KRAGH-HANSEN, U.; OTAGIRI, M. Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 5, p. 569-577, May 2002.

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

CUI, Z.; MUMPER, R.J. Coating of cationized protein on engineered nanoparticles results in enhanced immune responses. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 238, n. 1-2, p. 229-239, May 2002.

DESAI, N.; TRIEU, V.; YAO, Z.; LOUIE, L.; CI, S.; YANG, A.; TAO, C.; DE, T.; BEALS, B.; DYKES, D.; NOKER, P.; YAO, R.; LABAO, E.; HAWKINS, M.; SOON-SHIONG, P. Increased antitumor activity, intratumor Paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of Cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1317-1324, Feb. 2006.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; MCNEIL, S.E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n.8, p. 469-478, Aug. 2007.

FENG, S-S.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chemical Engineering Science**, v. 58, p. 4087-4114, 2003.

FREITAS, M.L.L.; SILVA, L.P.; AZEVEDO, R.B.; GARCIA, V.A.P.; LACAVA, L.M.; GRISÓLIA, C.K.; LUCCI, C.M.; MORAIS, P.C.; DA SILVA, M.F.; BUSKE, N.; CURI, R.; LACAVA, Z.G.M. A double-coated magnetite-based magnetic fluid evaluation by cytometry and genetic tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, p. 396-398, 2002.

GARCIA, M.P. **Estudo *in vivo* dos efeitos sub-crônicos e crônicos de nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com DMSA**. 2005. Tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

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

GARNETT, M.C.; KALLINTERI, P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. **Occupational Medicine**, v. 56, n. 5, p. 307-311, Aug. 2006.

GOLLAPUDI, B.B.; MCFADDEN, L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 347, n. 2, p. 97-99, July 1995.

GONG, L-S.; ZHANG, Y-D.; LIU, S. Target distribution of magnetic albumin nanoparticles containing adriamycin in transplanted rat liver cancer model. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 3, n. 3, p. 365-368, Aug. 2004.

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

GUEDES, M.H.A.; GUEDES, M.E.A.; MORAIS, P.C.; DA SILVA, M.F.; SANTOS, T.S.; ALVES JÚNIOR, J.P.; BERTELLI, C.E.; AZEVEDO, R.B.; LACAVAL, Z.G.M. Proposal of a magnetohyperthermia system: preliminary biological tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272-276, p. 2406-2407, 2004.

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

GUPTA, A.K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, June 2005.

GUPTA, A.K.; GUPTA, M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. **Biomaterials**, v. 26, n. 13, p. 1565-1573, May 2005.

GUTERRES, S.S.; BENVENUTTI, E.V.; POHLMANN, A.R. Nanopartículas poliméricas para administração de fármacos. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia – Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006. p. 161-166.

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

HUSSAIN, S.M.; HESS, K.L.; GEARHART, J.M.; GEISS, K.T.; SCHLAGER, J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicology in vitro**, v. 19, n. 7, p. 975-983, Oct. 2005.

IBRAHIM, N.K.; DESAI, N.; LEGHA, S.; SOON-SHIONG, P.; THERIAULT, R.L.; RIVERA, E.; ESMAELI, B.; RING, S.E.; BEDIKIAN, A.; HORTOBAGYI, G.N.; ELLERHORST, J.A. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of Paclitaxel. **Clinical Cancer Research**, v.8, n. 5, p. 1038-1044, May 2002.

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

ILLUM, L.; DAVIS, S.S. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer 338). **FEBS Letters**, v. 167, n. 1, p. 79- 82, Feb. 1984.

INCA – Instituto Nacional do Câncer – **Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 28 nov. 2007.

INCA – Instituto Nacional do Câncer – **Situação do câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 5 dez. 2006.

JAIN, T.K.; MORALES, M.A.; SAHOO, S.K.; LESLIE-PELECKY, D.L.; LABHASETWAR, V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. **Molecular Pharmaceutics**, v. 2, n. 3, p. 194-205, May-June 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAWASHITA, M.; TANAKA, M.; KOKUBO, T.; INOUE, Y; YAO, T.; HAMADA, S.; SHINJO, T. Preparation of ferrimagnetic magnetite microspheres for in situ hyperthermic treatment of câncer. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2231-2238, May 2005.

KRISHNA, H.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 155-166, Nov. 2000.

KÜCKELHAUS, S. **Avaliação biológica de materiais magnéticos à base de ferrita de cobalto desenvolvidos para tratamento alternativo do câncer**. 2003. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2003.

KWON, Y.J.; STANDLEY, S.M.; GOH, S.L.; FRÉCHET, J.M.J. Enhanced antigen presentation and immunostimulation of dendritic cells using acid-degradable cationic nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 105, n. 3, p. 199-212, July 2005.

LACAVA, L. M.; **Estudos de biodistribuição e toxicidade de fluido magnético à base de partículas de magnetite recobertas por dextran em camudongos**. 2004. Tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

LACAVA, Z.G.M. Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia – Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006. p. 175-181.

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.; DA SILVA, M.F. Toxic effects of ionic magnetic fluids in mice. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, p. 90-95, 1999.

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.; DA SILVA, M.F.; MORAIS, P.C. Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, p. 431-434, 1999.

LACAVA, Z.G.M.; MORAIS, P.C. Aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas. In: **Parcerias estratégicas**. n. 18. Brasília: CGEE, 2004. p. 73-81.

LANGER, K.; BALTHASAR, S.; VOGEL, V.; DINAUER, N.; VON BRIESEN, H.; SCHUBERT, D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, n. 1-2, p. 169-180, May 2003.

LEROUX, J-C.; DE JAEGHERE, F.; ANNER, B.; DOELKER, E.; GURNY, R. An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly (D,L-lactic acid) nanoparticles by human monocytes. **Life Sciences**, v. 57, n. 7, p. 695-703, 1995.

LIN, W.; GARNETT, M.C.; SCHACHT, E.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Preparation and in vitro characterization of HSA-mPEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 189, n. 2, p. 161-170, Nov. 1999.

LU, W.; TAN, Y-Z.; HU, K-L.; JIANG, X-G. Cationic albumin conjugated pegylated nanoparticles with its transcytosis ability and little toxicity against blood-brain barrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, n. 1-2, p. 247-260, May 2005.

MCNEIL, S.E. Nanotechnology for the biologist. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 3, p. 585-594, Sept. 2005.

MEDEIROS, E.L.; PATERNO, L.G.; MATTOSO, L.H.C. Nanotecnologia. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia – Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006. p. 13-29.

MELO, C.P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. In: **Parcerias estratégicas**. n.18. Brasília: CGEE, 2004. p. 9-21.

MENEGHINI, R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, n. 5, p. 783-792, 1997.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB Journal**, v.19, n. 3, p. 311-330, Mar. 2005.

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

MU, L.; FENG, S.S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. **Journal of Controlled Release**, v. 86, n. 1, p. 33-48, Jan. 2003.

NEUHAUS, S.J.; WATSON, D.I. Pneumoperitoneum and peritoneal surface changes. **Surgical Endoscopy**, v. 18, n. 9, p. 1316-1322, Sept. 2004.

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

NYMAN, D.W.; CAMPBELL, K.J.; HERSH, E.; LONG, K.; RICHARDSON, K.; TRIEU, V.; DESAI, N.; HAWKINS, M.J.; VON HOFF, D.D. Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of Paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n.31, p. 7785-7793, Nov. 2005.

OATES, P.S.; JEFFREY, G.P.; BASCLAIN, K.A.; THOMAS, C.; MORGAN, E.H. Iron excretion in iron-overloaded rats following the change from an iron-loaded to an iron-deficient diet. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 6, p. 665-674, June 2000.

OGAWARA, K-I.; FURUMOTO, K.; NAGAYAMA, S.; MINATO, K.; HIGAKI, K.; KAI, T.; KIMURA, T. Pre-coating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 3, p. 451-455, Dec. 2004.

OWENS III, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, Jan. 2006.

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

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 3, p. 329-347, Feb. 2003.

PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. **Iron metabolism and toxicity**. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 202, n. 2, p. 199-211, Jan. 2005.

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

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

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

PREMKUMAR, K.; BOWLUS, C.L. Ascorbic acid reduces the frequency of induced micronuclei in bone marrow cells of mice. **Mutation Research**, v. 542, n. 1-2, p. 99-103, Dec. 2003.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, EK. **Mutagenese Ambiental**. São Paulo: Editora ULBRA, 2003. p.173-200.

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

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

SIGMA-ALDRICH. **Trypan blue solution**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com//sigma/product%20information%20sheet/t8154pis.pdf>>. Acesso em 12 dez. 2007.

SILVA, G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surgical Neurology**, v. 61, n. 3, p. 216-220, Mar 2004.

SILVA, L.P.; KUCKELHAUS, S.; GUEDES, M.H.A.; LACAVAL, Z.G.M.; TEDESCO, A.C.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Kinetic of magnetic nanoparticles uptake

evaluated by morphometry of mice peritoneal cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 463-465, 2005.

SIMIONI, A.R.; MARTINS, O.P.; LACAVAL, Z.G.; AZEVEDO, R.B.; LIMA, E.C.; LACAVAL, B.M.; MORAIS, P.C.; TEDESCO, A.C. Cell toxicity studies of albumin-based nanosized magnetic beads. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 8, p. 2413-2415, Aug. 2006.

SIMIONI, A.R.; PRIMO, F.L.; RODRIGUES, M.M.A.; LACAVAL, Z.G.M.; MORAIS, P.C.; TEDESCO, A.C. Preparation, characterizations and in vitro toxicity test of magnetic nanoparticle-based drug delivery system to hyperthermia of biological tissues. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 43, n. 6, p. 2459-2461, June 2007.

TARTAJ, P.; MORALES, M.P.; GONZÁLEZ-CARREÑO, T.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; SERNA, C.J. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 290-291, p. 28-34, 2005.

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

THÖLE, M.; NOBMANN, S.; HUWYLER, J.; BARTMANN, A.; FRICKER, G. Uptake of cationized albumin coupled liposomes by culture porcine brain microvessel endothelial cells and intact brain capillaries. **Journal of Drug Targeting**, v. 10, n. 4, p. 337-344, June 2002.

TORCHILIN, V.P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for câncer therapy and imaging. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 2, p. E128-E-147, May 2007.

TRYNDA-LEMIESZ, L. Paclitaxel-HSA interaction. Binding sites on HSA molecule. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 12, p. 3269-3275, June 2004.

VONARBOURG, A.; PASSIRANI, C.; SAULNIER, P.; BENOIT, J-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 27, n. 24, p. 4356-4373, Aug. 2006.

WEAVER, J.L.; TOROUS, D. Flow cytometry assay for counting micronucleated erythrocytes: development process. **Methods**, v. 21, n. 3, p. 281-287, July 2000.