

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**JÚLIA POUBEL COELHO**

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE  
MAGNETOLIPOSSOMAS À BASE DE NANOPARTÍCULAS  
DE MAGHEMITA**

**BRASÍLIA  
2008**

**JÚLIA POUBEL COELHO**

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE  
MAGNETOLIPOSSOMAS À BASE DE NANOPARTÍCULAS  
DE MAGHEMITA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

**BRASÍLIA  
2008**

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Zulmira Lacava, pelos ensinamentos ao longo de vários anos, sempre atenciosa, paciente e carinhosa.

Aos meus amigos da Universidade de Brasília, que muito contribuíram para a realização deste estudo. Em especial à minha querida amiga Danielle Lima, presente em vários momentos importantes da minha vida. Agradeço à Lane Barbosa, Luciana Landim, Flávia Arruda, Neda Sadeghiani, Adriana Brugin e Camila Saldanha (obrigada pela ajuda nos experimentos *in vitro*) que me ajudaram muito nos experimentos e discussões de artigos, mas acima de tudo, pela amizade. Agradeço à Eliza Januário, cuja colaboração no laboratório foi imprescindível em vários momentos. Aliás, os colegas do Laboratório de Genética contribuíram de maneira especial, por isso agradeço a todos, em especial, ao Arthur Akimoto, Mila Diniz, Penha Zaidan e Carol Gontijo e aos alunos do estágio e do PIBIC, principalmente Mary-Ann Xavier, André Hideo Ono, Ana Laura Araújo e Nayara Baldini. Agradeço também ao pessoal do Laboratório de Morfologia, em especial, Graziella Joanitti, João Paulo Longo, Sacha Braun, Carol Valois, Patrícia Cunha, Shélida Braz e Djalma Santos (pelo auxílio na confecção das lâminas de histologia). Este trabalho me deu oportunidade de trabalhar com pessoas em diversos laboratórios e quero agradecer pelo apoio do meu amigo Marcos Elói (Instituto de Física), Débora de Oliveira e Marcela Bretas (Laboratório de Microscopia Eletrônica) e Elaine Nascimento (Laboratório de Bioquímica).

Agradecimento especial à Izabel Cristina Silva (Laboratório de Biologia Molecular), por ter me ensinado bastante sobre estatística, por ter me ajudado muito neste aspecto, de maneira tão atenciosa e dedicada.

Aos amigos que não estiveram envolvidos diretamente neste trabalho, mas que sempre me apoiaram. Impossível citar todos os nomes aqui, mas cada um que me deu uma palavra de apoio, que compreendeu a minha ausência, que torceu por mim, sabe o quanto sou grata. Obrigada Juliana, Marcelo e Vítor; Gustavo, Roberta e Maria Luiza.

Aos professores, pelos ensinamentos e colaboração. Agradecimento especial aos professores do Laboratório de Genética, sempre presentes, me apoiando no dia-a-dia, Professor César Grisólia, Professoras Maria de Nazaré Klatau e Silviene Fabiana de Oliveira. À professora Loreny Gimenes Giugliano (e seu aluno Alex Pereira), do Laboratório de Microbiologia, por ter cedido o espectrofotômetro para realização das medidas de ferro sérico. À Professora Giane Regina Paludo (e suas alunas, Tatiana Marçola e Marta Vasconcelos), do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário, que colaborou de maneira importante na realização e interpretação dos ensaios bioquímicos. Agradeço à Professora Emília Celma de Oliveira Lima (IQ-UFG) e Professor Antônio Cláudio Tedesco (FFCLRP, USP/RP) (e suas alunas, Andreza Simioni e Carol Vaccari) que sintetizaram e gentilmente cederam a amostra utilizada neste trabalho (e fizeram sua caracterização). Ao Professor Paulo César de Moraes que sempre contribuiu de maneira importante.

Agradeço especialmente aos membros da banca examinadora, Professor Márcio José Poças Fonseca, Dra. Maria Helena Guedes e Professora Maria de Fátima Santos, pelas preciosas contribuições e ensinamentos.

Aos meus familiares, pelo apoio e amor incomensuráveis. Em especial, agradeço à minha mãe, Haydée Poubel, que me incentivou muito, sempre. Ao meu pai, Antônio Carlos Coelho, e meus irmãos, Flávio e Felipe Poubel, pela paciência (compartilhamos o computador) e incentivo. Agradeço também o apoio que veio de longe, de minha família (avó, tios e primos). Agradeço muito ao meu namorado, Rafael Barreto, que me acompanhou com carinho durante todo esse período, sempre me dando força, e também à família dele, em especial Ângela e Armando Barreto, que me incentivaram e torceram por mim.

Ao CNPq, CAPES, FINATEC, FAP-DF, CNANO e Rede de Nanobiomagnetismo (CNPq/MCT), agradeço o apoio financeiro.

Agradeço finalmente a Deus, por todas as graças, por minha vida, por tudo.

## RESUMO

A nanobiotecnologia consiste em um campo de pesquisa emergente e promissor. Materiais nanoestruturados, tais como fluidos magnéticos e magnetolipossomas (ML), têm sido propostos como sistemas de entrega de drogas e termoterapia contra o câncer, entre outras aplicações em biomedicina. Em particular, ML são estruturas fisiologicamente estáveis, constituídas por nanopartículas magnéticas (NPM) acondicionadas em uma bicamada fosfolipídica. Uma amostra de ML contendo nanopartículas de maghemita recobertas com citrato encapsuladas em lipossomas (denominada ML-Magh) foi sintetizada com propósitos de aplicações biomédicas. Polietilenoglicol (PEG) foi associado à bicamada lipídica. A proposta deste estudo foi investigar o comportamento biológico de ML-Magh ( $1,0 \times 10^{14}$  partículas/ mL), avaliando sua biocompatibilidade/ toxicidade por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. O tamanho e o potencial de carga de superfície dos ML foram estudados e apresentaram diâmetro médio de 124 nm e carga negativa (potencial zeta, -24,4 mV). Nos testes *in vitro*, células ductais de glândula submandibular humana (HSG) e células mesangiais (CM) foram cultivadas durante 24 horas na presença de ML-Magh em duas diferentes doses (50  $\mu$ L and 100  $\mu$ L). Análises por microscopia de luz mostraram que ML-Magh não induz alterações morfológicas em ambos os tipos celulares. Para os testes *in vivo*, 100  $\mu$ L de ML-Magh foram endovenosa ou intraperitonealmente administrada em camundongos fêmeas Swiss (n=5-6). Animais controle (n=3) foram tratados com solução salina tamponada por fosfato (PBS). Os efeitos da amostra ML-Magh foram investigados de 30 minutos até 30 dias após administração, dependendo do teste. A viabilidade de células peritoneais investigada por meio de dois diferentes métodos, exclusão por Nigrosina e Iodeto de Propídio, não foi afetada. A contagem de leucócitos do sangue indicou que ML-Magh não apresenta potencial pró-inflamatório. Apenas um aumento na população de eosinófilos foi observado, uma hora após administração de ML-Magh, sugerindo um ligeiro processo alérgico. A ausência de genotoxicidade e citotoxicidade foi confirmada respectivamente, pelo teste de micronúcleo e porcentagem de eritrócitos policromáticos. A análise histopatológica realizada em três tecidos mostrou poucos agregados de NPM em pulmões e baço, e nenhum no fígado. Alterações morfológicas não foram encontradas nestes tecidos durante todo o período experimental. Os raros infiltrados inflamatórios observados após tratamento no fígado e nos pulmões também foram vistos nos animais controle. Testes bioquímicos realizados no sangue mostraram alterações irrelevantes, uma vez que as concentrações de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia e creatinina foram constantes em quase todos os tempos após administração de ML-Magh, sugerindo ausência de danos hepáticos e renais. A determinação dos níveis de ferro sérico mostrou que ML-Magh não alterou significativamente os níveis de ferro, exceto em testes com o dobro (200  $\mu$ L) da concentração usual. Os dados sugerem que a amostra investigada é biocompatível e tem potencial para ser usada em aplicações biomédicas, especialmente como agentes na terapia contra o câncer, por meio da magnetohipertermia ou sistemas de entrega de drogas.

Palavras-chave: Nanobiotecnologia. Nanotoxicologia. Magnetolipossomas. Nanopartículas magnéticas. Biocompatibilidade.

## ABSTRACT

Nanobiotechnology represents an emerging and promising research field. Nanostructured materials, such as magnetic fluids and magnetoliposomes (MLs), have been proposed for drug-delivery systems and thermal-based cancer therapy amongst other several applications in biomedicine. In particular, MLs are physiologically stable structures, consisting of magnetic nanoparticles (MNPs) wrapped by a phospholipid bilayer. A ML sample containing citrate-coated maghemite nanoparticles encapsulated in liposomes (called ML-Magh) was synthesized for biomedical applications purposes. Polyethylene glycol (PEG) was grafted onto the liposome bilayer. The aim of this work was to investigate the biological behaviour of ML-Magh ( $1,0 \times 10^{14}$  particle/ mL), by evaluating their biocompatibility/toxicity through in vitro and in vivo tests. The particle size and surface charge potential of MLs were determined. They presented a mean particle size of 124 nm and a negative surface charge, as determined by measuring the zeta potential (-24,4 mV). To perform the in vitro test, human submandibular duct cells (HSG) and mesangial cells (CM) were cultivated during 24 hours in the presence of the ML-Magh sample at two different doses (50  $\mu$ L and 100  $\mu$ L). Analysis by light microscopy showed that ML-Magh does not induce morphological alterations on both cellular types. For the in vivo tests, 100  $\mu$ L of the ML-Magh sample were endovenously or intraperitoneally administrated to female Swiss mice (n=5-6). Control animals (n=3) were treated with phosphate buffered saline (PBS). ML-Magh sample effects were investigated from 30 minutes until 30 days after the administration. The viability of peritoneal cells was not affected by the ML-Magh treatment, as investigated by two different methods: nigrosin dye exclusion and propidium iodide exclusion. The leukocytes cytometry indicated that ML-Magh has no pro-inflammatory action. The eosinophil population presented an increase one hour after ML-Magh administration, suggesting a slight allergic process. Absence of genotoxicity and cytotoxicity was confirmed by micronucleus test and polychromatic erythrocyte percentage, respectively. The histopathology analysis performed in three tissues showed few particle clusters in the lungs and spleen. Clusters were not observed in the liver. No morphological alterations were found in these tissues during all the experimental time. The rare inflammatory infiltration observed in the liver and lungs of ML-Magh-treated mice was also observed in control animals. Biochemical blood tests showed irrelevant alterations. Concentrations of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), urea, and creatinine were constant almost all over the experiment, suggesting no hepatic or splenic injury. The levels of serum iron were not affected by ML-Magh treatment. Nevertheless, serum iron levels are dose-dependent. Data suggest that the investigated sample is biocompatible and it has potential to be used in biomedical applications, especially as agents for anticancer therapy through magnetohyperthermia and drug delivery systems.

*Keywords:* Nanobiotechnology. Nanotoxicology. Magnetoliposomes. Magnetic nanoparticles. Biocompatibility.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	– Alanina aminotransferase
CM	– Células mesangiais
DLP	– Doxorrubicina lipossomal associada ao polietilenoglicol
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
DPPC	– L- $\alpha$ -dipalmitoil fosfatidil-colina
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENC	– Eritrócitos normocromáticos
EPC	– Eritrócitos policromáticos
FA	– Fosfatase alcalina
FSC	– Dispersão frontal ( <i>Forward Scatter</i> )
HSG	– Células ductais de glândula submandibular humana
MET	– Microscopia eletrônica de transmissão
ML	– Magnetolipossomas
ML-Magh	– Magnetolipossoma à base de nanopartículas de maghemita revestidas com citrato e incluídas em lipossomas
MN	– Micronúcleos
NPM	– Nanopartículas magnéticas
PBS	– Solução salina tamponada por fosfato
PEG	– Polietilenoglicol
PI	– Iodeto de propídio
RMN	– Ressonância magnética nuclear
SFM	– Sistema fagocitário mononuclear
SSC	– Dispersão lateral ( <i>Side Scatter</i> )
TFD	– Terapia fotodinâmica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1 Amostra à base de magnetolipossomas - ML-Magh	21
3.2 Estudo <i>in vitro</i> para avaliação morfológica das linhagens de células ductais de glândula submandibular humana (HSG) e mesangiais humanas (CM) após tratamento com ML-Magh	21
3.3 Animais	22
3.4 Tratamento dos animais	23
3.5 Avaliação da citotoxicidade em células peritoneais – teste de viabilidade celular com Nigrosina e citometria de fluxo utilizando Iodeto de Propídio	23
3.6 Contagem diferencial e total de leucócitos sanguíneos	25
3.7 Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade em eritrócitos da medula óssea – teste de micronúcleo e índice de eritrócitos policromáticos	25
3.8 Avaliação histológica	27
3.9 Ensaio bioquímico	27
3.10 Medidas do ferro sérico	28
3.11 Análise estatística dos dados	29
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>30</b>
4.1 Caracterização da amostra à base de magnetolipossomas - ML-Magh	31
4.2 Avaliação morfológica <i>in vitro</i> das linhagens de células ductais de glândula submandibular humana (HSG) e mesangiais humanas (CM) após tratamento com ML-Magh	31
4.3 Monitoramento dos grupos de animais ao longo do período experimental	32
4.4 Avaliação da citotoxicidade em células peritoneais – teste de viabilidade celular com Nigrosina e citometria de fluxo utilizando Iodeto de Propídio	33
4.5 Avaliação da contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos	37
4.6 Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade em eritrócitos da medula óssea – teste de micronúcleo e índice de eritrócitos policromáticos	40
4.7 Avaliação histológica	42
4.7.1 Pulmões	42
4.7.2 Fígado	43
4.7.3 Baço	43
4.8 Ensaio bioquímico	51
4.9 Medidas do ferro sérico	51
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
5.1 Considerações sobre a amostra ML-Magh	54
5.2 Considerações sobre a avaliação morfológica das linhagens de células submandibulares humanas (HSG) e mesangiais humanas (CM) após tratamento com ML-Magh	56
5.3 Considerações sobre os animais tratados com ML-Magh	57
5.4 Considerações sobre a avaliação da citotoxicidade em células peritoneais – teste de viabilidade celular com Nigrosina (microscopia de luz) e com Iodeto de Propídio (citometria de fluxo)	58
5.5 Considerações sobre a contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos	59
5.6 Considerações sobre a avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade em eritrócitos da medula óssea – teste de micronúcleo e índice de eritrócitos policromáticos	61

5.7 Considerações sobre a histologia dos pulmões, fígado e baço	62
5.8 Considerações sobre os ensaios bioquímicos	64
5.9 Considerações sobre os níveis séricos de ferro	65
5.10 Considerações finais e perspectivas	67
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>84</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

A nanotecnologia é o ramo da ciência responsável pelo desenvolvimento e pesquisa de estruturas e materiais manipulados em escala nanométrica. Um nanômetro (nm) corresponde à bilionésima parte do metro ( $1 \times 10^{-9}$  m) e as estruturas produzidas em escala que varia, em geral, de 1 a 100 nm, acabam assumindo novas propriedades (físicas (mecânicas, elétricas), químicas, biológicas) e fenômenos inéditos (Melo e Pimenta, 2004; Scheu et al., 2006), como o comportamento superparamagnético das partículas quando na nanoescala o que significa que o magnetismo não é mais retido após remoção do campo magnético (Berry e Curtis, 2003). Um dos principais fatores que faz com que os nanomateriais sejam significativamente diferentes de outros materiais é o aumento relativo da superfície de contato. O fato de que inúmeras reações químicas podem ocorrer na superfície das partículas implica que uma dada massa de material nanoparticulado será muito mais reativa que a mesma massa de material feito com partículas grandes, o que pode afetar os comportamentos óptico, elétrico e magnético dos materiais (Pison et al., 2006).

Idéias acerca da nanotecnologia vêm sendo construídas ao longo de muitos anos. Em 1959, o físico americano Richard Feynman chamou atenção para o fato de que não havia obstáculos teóricos à construção de pequenos dispositivos compostos por elementos de tamanho muito reduzido, e que na dimensão atômica devem ser esperados eventos diferentes e novos efeitos (Alves, 2004). Desde então, a nanociência tem apresentado crescimento acelerado e o grande interesse científico nessa área é demonstrado, tanto pelos altos investimentos observados nos últimos anos, como pelo número crescente de patentes e publicações relacionados ao tema (Hullmann e Meyer, 2003; Silva, 2004).

No tocante à exploração das novas possibilidades oferecidas pela manipulação da matéria em escala tão reduzida, uma área em evidência é a nanomedicina, que consiste na nanotecnologia aplicada à área médica, e que vem se tornando cada vez mais interessante, pois busca novas formas de diagnóstico (Herr, 2006; Yun, 2007) e terapia para diversas doenças que acometem a saúde humana (Freitas Jr, 2005). A síntese e o desenvolvimento de estruturas em nanoescala podem ser importantes para aplicações biomédicas, uma vez que as nanopartículas são perfeitamente capazes de interagir com sistemas biológicos de tamanho também pequeno, como células, vírus, proteínas e o DNA.

As nanopartículas magnéticas (NPM) inspiram interesse especial, podendo ser utilizadas para preparar nanocompósitos magnéticos, fluidos magnéticos e magnetolipossomas (Lacava e Morais, 2004) que, para serem empregados na área biomédica, devem ser biocompatíveis (Lacava et al., 2004) a fim de se evitar efeitos biológicos indesejáveis, tais como inflamação ou dano ao material genético (Freitas et al., 2002).

Características ideais de biocompatibilidade podem ser obtidas por meio do controle dos parâmetros físicos das NPM, como tamanho, susceptibilidade magnética, e também pelo recobrimento com materiais biologicamente ativos, como peptídeos, vitaminas, nucleotídeos e anticorpos (Lacava e Morais, 2004). Um tipo especial de recobrimento é obtido quando as NPM são encapsuladas em lipossomas, vesículas similares a membranas celulares, que apresentam características adequadas e interessantes para aplicações biomédicas (Banerjee, 2001; Hodenius et al., 2002; Muller e Keck, 2004). Essas coberturas lipossomais evitam a fagocitose imediata das NPM pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) e fazem com que permaneçam na circulação tempo suficiente para exercerem a sua ação. Os lipossomas podem também ser associados ao polietilenoglicol (PEG), polímero flexível e hidrofílico, capaz de minimizar ainda mais o reconhecimento e captação das NPM pelo SFM (Dong e Feng, 2007). A Doxorubicina Lipossomal associada ao PEG (DLP) consiste em um exemplo interessante de formulação lipossomal de um quimioterápico (doxorubicina), que sofre baixa captação pelo SFM, tanto por estar ligada a polímeros (PEG), como por possuir uma camada lipídica semelhante a membranas celulares. A DLP tem sido testada com sucesso em estudos clínicos em pacientes portadores de metástases cerebrais provenientes de tumores sólidos (Caraglia, 2006).

Materiais magnéticos nanoestruturados têm sido propostos em diversas aplicações na área médica, tais como diagnóstico - pela melhora do contraste em imagens de ressonância magnética nuclear (RMN) - e terapêutica - com potencialidade para utilização na magnetohipertermia, no desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas a sítios específicos e até mesmo na terapia gênica, todas elas direcionadas a diversas patologias, com particular interesse no câncer.

Anualmente, seis milhões de pessoas morrem de câncer no mundo e cerca de dez milhões de novos casos são diagnosticados (*International Agency for Research on Cancer*, 2003). Para o tratamento da doença, as três principais abordagens atuais são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, cuja escolha depende do tipo de tumor e do estágio de seu desenvolvimento (Rang et al., 2004). Embora estes tratamentos sejam de grande valor, podem apresentar desvantagens e limitações, como complicações pós-cirúrgicas e toxicidade sistêmica. Por esta razão, pesquisas que buscam métodos alternativos de tratamento estão em evidência (Rothenberg, Carbone e Johnson, 2003) e visam sempre ser mais eficientes em relação às terapias convencionais e minimizar os efeitos colaterais. O uso de biomateriais baseados em NPM tem mostrado grande potencial como arma para combater o câncer pois podem, entre outras, detectar precocemente a doença melhorando o contraste em

imagens de RMN e destruir células tumorais em micrometástases, por meio da técnica de magnetohipertermia (Berry e Curtis, 2003).

A ressonância magnética nuclear é uma técnica amplamente utilizada na área biomédica e destaca-se devido à obtenção de imagens internas do organismo que apresentam alta resolução espacial e um bom contraste entre os tecidos, sobretudo quando são utilizados agentes de contraste adequados, capazes de realçar estruturas microscópicas na imagem e assim possibilitar o diagnóstico precoce de diversas patologias. O nanodiagnóstico tem a finalidade principal de identificar doenças o mais precocemente possível (Pison et al., 2006), e quando associado à RMN representa uma tentativa de vencer importante limitação no diagnóstico de metástases “ocultas” em linfonodos humanos, uma vez que estas não causam aumento no tamanho do linfonodo. Nanopartículas linfotrópicas superparamagnéticas têm sido testadas como agente de contraste em imagens de RMN. Um estudo clínico revelou que a técnica é sensível e segura para auxiliar na detecção de metástases em pacientes com câncer de próstata, enquanto a RMN convencional não seria capaz de identificar tais metástases em seus estágios iniciais (Mukesh et al., 2003).

O diagnóstico precoce de micrometástases possibilita a intervenção terapêutica imediata, seja por radio, quimioterapia, ou ainda por meio da magnetohipertermia. O carcinoma hepatocelular é exemplo de câncer muito comum, cujo método mais efetivo de tratamento é a remoção cirúrgica que é, entretanto, indicada a poucos pacientes. Esse fato ilustra a grande necessidade de se encontrar novos métodos para tratar esta doença, como a magnetohipertermia que além de induzir morte celular, é antiproliferativa para este tipo de câncer (Yan et al., 2005).

A magnetohipertermia tem se mostrado uma alternativa muito promissora para tratar tumores. A técnica consiste em infiltrar o tecido-alvo com NPM e posteriormente aplicar um campo magnético de frequência alternada, capaz de elevar a temperatura local até 42-45°C, destruindo as células tumorais sem afetar as normais (Yan et al., 2005). As partículas transformam a energia do campo magnético alternado em calor por meio de diversos mecanismos físicos (Ma et al., 2004), proporcionando um aquecimento local capaz de destruir as células tumorais, mais susceptíveis a variações de temperatura do que as células normais (Nielsen, Horsman e Overgaard, 2001).

Em adição a essas potenciais melhoras na área diagnóstica e terapêutica, as NPM devido à sua susceptibilidade magnética, possibilitam seu direcionamento e manutenção em sítios específicos do organismo com o uso de magnetos externos, o que representa vantagens relacionadas à entrega de drogas a sítios específicos e liberação controlada de agentes

terapêuticos. O objetivo desses sistemas é o melhor controle sobre a farmacocinética e farmacodinâmica, toxicidade, imunogenicidade e bioreconhecimento dos sistemas em questão, a fim de melhorar a eficácia de drogas. Os novos entregadores de drogas, conjugados a nanossistemas, podem ser produzidos de modo a sofrerem uma degradação controlada, reagirem a estímulos e serem sítio-específicos (Pison et al., 2006). Sengupta e colaboradores (2005) desenvolveram nanocélulas constituídas por uma nanopartícula nuclear e um envelope extranuclear lipídico, que são preferencialmente interiorizadas por células tumorais. A estrutura deste sistema permite a liberação controlada de duas drogas: inicialmente, o envelope externo libera um agente antiangiogênico, causando interrupção vascular local e, posteriormente, a nanopartícula central, já aprisionada no tumor, libera um agente quimioterápico. Usando esta estratégia, é possível aumentar a eficácia terapêutica antitumoral ao mesmo tempo em que se reduz a toxicidade ao organismo.

Nos últimos anos, drogas alvo-específicas estão sendo investigadas para serem utilizadas em quimioterapia, pois apresentam baixa toxicidade aos tecidos normais e redução no custo dos tratamentos, uma vez que a dose de fármaco necessária passa a ser menor. Estas drogas podem atuar de forma ativa, quando ligadas a anticorpos específicos contra as células tumorais, ou de forma passiva, se ligadas a substâncias magnéticas que podem ser direcionadas ao local desejado pela aplicação de um campo magnético externo (Lemke et al., 2004). Em um estudo clínico de fase I foi avaliado um sistema de entrega do quimioterápico epirrubicina associado a fluido magnético para tumores superficiais, utilizando magnetos externos para o direcionamento da droga e exames de imagem por RMN para detectar a presença da droga no local-alvo. A tolerância dos pacientes ao tratamento e ausência de efeitos colaterais foi considerada satisfatória, além de ter sido observado acúmulo da droga no tumor e regressão tumoral. O efeito local obtido com o tratamento permite o uso de agentes antineoplásicos que seriam muito tóxicos para o organismo caso fossem utilizados sistemicamente (Lemke et al., 2004). Um composto à base de nanopartículas de albumina ligadas ao quimioterápico paclitaxel (ABI-007, 130 nm) mostrou, em estudo clínico de fase III em mulheres portadoras de câncer de mama, ser menos tóxico, com importante diminuição da neuropatia causada pelo paclitaxel na sua forma padrão. A especificidade da droga nanoparticulada ao tumor resulta em um aumento de sua atividade antitumoral sem haver toxicidade ao organismo, elevando a eficácia do medicamento, sua concentração no local do tumor e a segurança em seu uso. A entrega preferencial da droga ao alvo pode ocorrer, entre outros fatores, devido à interação com receptores de albumina, o que facilita seu transporte para o interior das células (Gradishar et al., 2005).

Novos sistemas para utilização clínica estão sendo propostos, como a utilização de nanocápsulas, a fim de aumentar a proteção da droga contra a degradação nos fluidos biológicos, melhorar a penetração nas células, melhorar a eficácia de drogas já existentes e assim criar novos sistemas de tratamento eficazes. O ácido úsnico, por exemplo, é uma substância cuja atividade antitumoral já é conhecida, no entanto, suas aplicações são limitadas devido à hepatotoxicidade que induz. Em estudos pré-clínicos, o ácido úsnico nanoencapsulado apresentou maior efeito na regressão tumoral e menor toxicidade quando comparado ao ácido úsnico na forma livre (Santos et al., 2006).

O uso de sistemas de entrega de drogas também é bastante útil no emprego da terapia fotodinâmica (TFD), uma modalidade de tratamento baseada na aplicação de substâncias fotossensíveis que devem se acumular nas células alvo e ser então ativadas por uma fonte luminosa de comprimento de onda específico, resultando em um processo capaz de gerar espécies reativas de oxigênio, responsáveis pelo dano de membranas celulares e conseqüente destruição tumoral. O mecanismo de ação também pode estar relacionado à destruição vascular tumoral e ativação da resposta imune contra o tumor (Dolmans, Fukumura e Jain, 2003). A utilização da luz como alternativa terapêutica para diversas doenças já ocorre há milhares de anos (Ackroyd et al., 2001), mas foi no último século, sobretudo nos últimos anos, que a TFD passou a se destacar no tratamento de doenças como o câncer.

O tratamento de câncer de pele utilizando a TFD já demonstrou sucesso em estudos clínicos e muitos agentes de uso tópico já são empregados na prática clínica (Ackroyd et al., 2001; Simplicio, Maionchi e Hioka, 2002). A dificuldade a ser vencida atualmente é formular sistemas para TFD que possam atingir tumores mais profundos (Bown et al., 2002), e a associação de nanopartículas a agentes fotossensíveis têm demonstrado enorme potencial até mesmo contra cânceres cerebrais, que são agressivos e difíceis de tratar (Gao et al., 2006). É importante destacar que nestes sistemas o agente não precisa se dissociar de seu carreador para ser ativado, ou seja, ele pode ser ligado de maneira estável à NPM e ser conduzido ao sítio alvo, sem precisar sofrer uma liberação local, sendo ativado somente por aplicação de luz de comprimento de onda adequado, o que corrobora com a especificidade ao alvo, uma vez que a fonte luminosa será direcionada apenas ao local desejado (Dolmans, Fukumura e Jain, 2003).

No futuro, espera-se que a TFD continue a ser utilizada como modalidade única ou em combinação com quimioterapia, cirurgia, radioterapia e outras estratégias novas, como a terapia antiangiogênica (Ferrario et al., 2000) e a magnetohipertermia, para combater o câncer. Vários sistemas de entrega têm sido testados em modelos pré-clínicos e constituem

exemplos importantes desses sistemas os lipossomas e imunolipossomas, que podem ser conjugados a fotossensibilizadores (Dolmans, Fukumura e Jain, 2003; Oliveira et al., 2006).

Além de entregar drogas a alvos específicos, a medicina e a biologia ainda poderão se beneficiar bastante com a síntese de nanopartículas a serem utilizadas como vetores não virais para entrega de genes. Técnicas de transferência gênica por sistemas nanoparticulados têm sido testadas e os resultados apontam para um novo campo de atuação promissor para a nanobiotecnologia (Lavertu et al., 2006; Bhavsar e Amiji, 2007). As principais vantagens em relação aos vetores virais são a não ocorrência de recombinação endógena, ausência de efeitos oncogênicos e de reações imunológicas. Plasmídios de DNA podem ser ligados a biopolímeros formando complexos nanométricos (200 – 400 nm) que apresentam alta eficiência na transferência gênica *in vitro*. Melhorias nos parâmetros de formulação e nas condições de transfecção podem levar à utilização de nanoestruturas na terapia gênica (Lavertu et al., 2006).

A pesquisa de novas drogas e sistemas diagnósticos/ terapêuticos deve passar por uma série de etapas até ser avaliada por autoridades regulatórias e aprovada para uso em humanos. Testes *in vitro* e *in vivo* em diferentes espécies animais consistem nas primeiras etapas de estudos, os pré-clínicos, que depois passam aos estudos clínicos, em seres humanos, que avaliam em suas fases a segurança da nova droga, tolerância, dose adequada, farmacocinética, efeitos adversos, entre outros parâmetros (ANVISA, 2008). Alguns sistemas baseados em nanotecnologia já se encontram em fase de estudos clínicos e têm mostrado um potencial enorme em melhorar o perfil farmacológico de agentes antineoplásicos (Ibrahim et al., 2002; Gradishar et al., 2005; Ibrahim et al., 2005). Contudo, ainda há muito que se pesquisar, tanto por meio de ensaios *in vitro* quanto *in vivo*, sobre sistemas nanoparticulados novos que têm potencial para serem empregados futuramente em humanos. Qualquer característica inédita nas amostras testadas, seja na superfície das partículas (p.ex.: ácido dodecanóico e álcool etoxilado (Freitas et al., 2002), carboximetildextrana (Guedes et al., 2005)), na composição do núcleo (p.ex.: magnetita (Freitas et al., 2002; Lacava et al., 2004; Guedes et al., 2005; Barbosa et al., 2006; Sadeghiani et al., 2006), ferritas de cobalto (Kuckelhaus et al., 2004), de manganês (Lacava et al., 1999a), maghemita (Brugin, 2007; Portilho-Corrêa, 2007)) ou do meio em que estão suspensas (p.ex.: água (Guedes et al., 2005), solução salina tamponada por fosfato (PBS) (Barbosa et al., 2006)), entre outras, justificam a realização de testes biológicos que possam garantir sua biocompatibilidade, que envolve a biodegradabilidade, hemocompatibilidade e ausência de efeitos tóxicos antes que possam ser usadas em seres humanos.

A combinação de ações que podem ser atribuídas aos nanomateriais, como ocorrência de fagocitose das partículas e sua interação molecular, pode gerar efeitos biológicos adversos que poderiam não ocorrer com o mesmo material em tamanho maior, por exemplo. Embora os nanomateriais exibam propriedades extraordinárias, são necessárias abordagens diversificadas de investigação para avaliar os riscos em potencial (Nel et al., 2006). Estudos em nanotoxicologia são voltados para caracterizar a segurança de nanomateriais, com foco especial em definir seus mecanismos de ação bem como seus perfis toxicológicos, verificando desde os efeitos agudos em testes preliminares, como os procedidos *in vitro*, como os efeitos subcrônicos e crônicos, extremamente necessários quando se investiga novos nanomateriais (Holsapple et al., 2005).

Estudos indicam que o tamanho pequeno, a extensa superfície de contato e a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio estão relacionados à capacidade de nanopartículas induzirem injúria tecidual, inflamação, fibrose, citotoxicidade e outras alterações (Oberdörster, Oberdörster e Oberdörster, 2005; Nel et al., 2006). Portanto, a realização de testes biológicos variados, que avaliem características da amostra, efeitos *in vitro* (Sestier et al., 2002) e *in vivo*, em camundongos tratados com substâncias baseadas em NPM (Guedes et al., 2005; Barbosa et al., 2006), é imprescindível na busca de agentes que possam ser empregados futuramente em seres humanos.

## **2. OBJETIVOS**

O desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados a serem empregados como alternativas no diagnóstico e na terapia de várias patologias, sobretudo o câncer, tem sido incentivado e obtém destaque na atualidade. A fim de que alternativas promissoras na melhora da saúde humana possam chegar à prática clínica, tais materiais precisam ter avaliadas, entre outros aspectos, sua biocompatibilidade / toxicidade, tanto por meio de testes *in vitro* como *in vivo*. Em consonância, este trabalho tem como objetivo geral avaliar efeitos biológicos de uma amostra de magnetolipossomas à base de nanopartículas de maghemita (ML-Magh) por meio de diferentes testes, que definem os seguintes objetivos específicos:

- 1) Determinar o diâmetro modal das partículas em suspensão na amostra ML-Magh e o potencial de carga da superfície (potencial zeta);
- 2) Investigar possíveis alterações na morfologia celular de linhagens HSG e CM tratadas com ML-Magh por meio da microscopia de luz;
- 3) Avaliar a possível citotoxicidade da amostra ML-Magh sobre células peritoneais de camundongos e avaliar a concordância de dois métodos utilizados para verificar a viabilidade celular (porcentagem de células não coradas por Nigrosina em microscópio de luz × porcentagem de células não marcadas com Iodeto de Propídio em citômetro de fluxo);
- 4) Avaliar o potencial pró-inflamatório da amostra ML-Magh por meio da contagem de leucócitos sanguíneos;
- 5) Avaliar possíveis efeitos genotóxicos e citotóxicos induzidos pela amostra ML-Magh em células da medula óssea por meio dos testes de micronúcleo e índice de eritrócitos policromáticos (EPC), respectivamente;
- 6) Avaliar a histologia dos pulmões, fígado e baço, bem como a presença de partículas da amostra ML-Magh nesses tecidos por meio de microscopia de luz e técnicas de coloração de HE e Perls;

- 7) Avaliar possível comprometimento hepático e renal induzido pela amostra ML-Magh por meio de ensaios bioquímicos que medem alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia e creatinina sangüíneas;
- 8) Verificar possíveis alterações na concentração de ferro sérico de camundongos após tratamento com ML-Magh.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Amostra à base de magnetolipossomas - ML-Magh**

A amostra de magnetolipossomas utilizada neste estudo foi sintetizada e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (FFCLRP, USP/RP). A amostra foi desenvolvida à base de nanopartículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) recobertas com citrato (fluido magnético com concentração de  $1,3 \times 10^{17}$  partículas/mL e aproximadamente 25 mg/mL de ferro), sintetizadas pela Profa. Dra. Emília Lima do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, subseqüentemente incluídas em lipossomas baseados em L- $\alpha$ -dipalmitoil fosfatidil-colina (DPPC) e colesterol e associados a moléculas de polietilenoglicol (PEG), semelhantemente ao processo de síntese já descrito na literatura (Oliveira et al., 2006). Resumidamente, os magnetolipossomas foram preparados por um método que consiste na injeção (por uma bomba peristáltica de adição controlada) de uma solução etanólica de lipídio em volume adequado de fluido magnético (em meio orgânico) em tampão fosfato (PBS), pH 7,4, contida em uma jaqueta termostaticada e com agitação magnética constante, com a finalidade de se obter a concentração final de partículas/ mL desejada. Os lipossomas contendo o fluido magnético ou o fluido magnético mais algum fármaco (p.ex.: agente fotossensibilizador; quimioterápico) são preparados por meio deste procedimento.

A concentração final da amostra utilizada neste estudo, denominada ML-Magh, foi de  $1,0 \times 10^{14}$  partículas/mL.

O tamanho dos lipossomas e o potencial de carga da superfície (potencial zeta) foram determinados em aparelho analisador de partículas pelos métodos de difração a laser e mobilidade eletroforética, respectivamente (LS 13320, Beckman Coulter, Inc., EUA). Essas medidas foram realizadas na FFCLRP, USP/RP.

### **3.2 Estudo in vitro para avaliação morfológica das linhagens de células ductais de glândula submandibular humana (HSG) e mesangiais humanas (CM) após tratamento com ML-Magh**

A linhagem de células HSG, estabelecida em 1981, a partir de uma glândula salivar humana irradiada (Shirasuna, Sato e Miyazaki, 1981), e a CM, imortalizada a partir de uma cultura de células primárias, conforme descrito por Banas e colaboradores (1999), foram mantidas em meio de cultura DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% dos antibióticos penicilina-estreptomicina, e tamponado com bicarbonato de sódio, pH 7,4. As

culturas foram estabelecidas a partir de uma passagem inicial de  $2 \times 10^5$  células em frascos de cultura de poliestireno de  $75 \text{ cm}^2$  e mantidas em estufa com atmosfera úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após atingir cerca de 80% de confluência, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 175 g durante cinco minutos, contadas em câmara de Neubauer e passadas para placa de cultura.

As células foram preparadas para análise morfológica em uma placa de cultura de seis poços, contendo uma lamínula de microscopia ( $18 \times 18 \text{ mm}$ ) em cada poço. Foram cultivadas inicialmente  $2 \times 10^5$  células que cresceram aderidas às lamínulas. Após 24 horas, cada grupo experimental recebeu tratamento, conforme descrito na Tabela 1. Os testes foram realizados em triplicata. Após o tempo de tratamento, que expôs as células à amostra ML-Magh durante 24h, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas três vezes com PBS.

**Tabela 1:** Esquema de tratamento *in vitro* com ML-Magh das linhagens de células ductais de glândula submandibular humana (HSG) e células mesangiais (CM). Tempo de exposição ao tratamento: 24h.

<b>Grupo experimental</b>	<b>Tratamento</b>
Controle	Células não receberam tratamento algum
Tratamento 1	Células tratadas com 50 $\mu\text{L}$ de ML-Magh
Tratamento 2	Células tratadas com 100 $\mu\text{L}$ de ML-Magh

As células aderidas às lamínulas foram coradas com solução de Giemsa 4% em metanol, por 5 minutos. Após serem lavadas com PBS, as lamínulas foram retiradas dos poços e montadas sobre lâminas de vidro para microscopia ( $26 \times 76 \text{ mm}$ ), com a face contendo as células coradas em contato com a lâmina. As células foram imediatamente analisadas e fotografadas em microscópio Zeiss Axiophot.

### 3.3 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos albinos da linhagem Swiss, fêmeas, não isogênicos, livres de patógenos e com idade de 3 meses, fornecidos pelo biotério da FFCLRP, USP/RP. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, com controle de temperatura e luz, onde receberam água e ração balanceada.

No momento da coleta de amostras teciduais dos animais, os mesmos foram sedados em câmara de éter etílico e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical.

O projeto para a realização deste trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

### **3.4 Tratamento dos animais**

Os animais foram divididos em dois grupos: (1) animais controle (n=3), tratados com 100 µL/ animal de tampão fosfato (PBS) por via intravenosa (IV), na veia lateral da cauda; (2) animais tratados (n=6) com dose única de 100 µL/ animal de ML-Magh (concentração de  $1,0 \times 10^{14}$  partículas/ mL), por via IV. Os animais foram sacrificados 1h, 6h, 12h, 24h, 48h, 7, 15 e 30 dias após administração de PBS ou de ML-Magh para realização dos testes que serão descritos a seguir. Fazem exceção, os experimentos para avaliação da citotoxicidade em células peritoneais, em que os animais foram divididos em dois grupos (n=3-5), e receberam tratamentos por via intraperitoneal (IP), sendo sacrificados 30 minutos, 6h, 12h, 24h, 48h, 7, 15 e 30 dias após o tratamento. O peso corporal médio dos grupos foi monitorado ao longo do período experimental. Todos os animais foram observados diariamente com relação a aspectos de morbidade e mortalidade.

### **3.5 Avaliação da citotoxicidade em células peritoneais – teste de viabilidade celular com Nigrosina e citometria de fluxo utilizando Iodeto de Propídio**

Para verificar a toxicidade causada por ML-Magh administrado via IP, os animais foram sedados com éter, sofreram uma lavagem peritoneal com 10 mL de PBS gelado e foram sacrificados. Imediatamente após, 8 mL do lavado foram recuperados com auxílio de pipeta Pasteur em tubo Falcon acondicionado em isopor com gelo. O material foi levado à centrifuga por 5 minutos, 168 g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células foi ressuspensão em 1 mL de PBS. A suspensão celular foi homogeneizada e 40 µL foram retirados, misturados em tubo Eppendorf com 160 µL de Nigrosina a 0,05%, um corante supravital do tipo aniônico que não penetra em células vivas. A contagem das células vivas (coloração clara e brilhante) e mortas (coloração preta) foi feita com auxílio de câmara de Neubauer, e a porcentagem de células vivas foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

Viabilidade celular (%) =  $n^{\circ}$  de células vivas / ( $n^{\circ}$  de células vivas +  $n^{\circ}$  de células mortas)  $\times$  100

A fim de avaliar a concordância do método que utiliza Nigrosina com o método que verifica a viabilidade celular peritoneal de camundongos por Iodeto de Propídio, a suspensão celular obtida descrita anteriormente foi diluída novamente com 1040 $\mu$ L de PBS, homogeneizada e fracionada em dois tubos para citometria de fluxo: tubo 1, somente a suspensão celular; tubo 2, suspensão celular adicionada de 1  $\mu$ g de Iodeto de Propídio (PI). O tubo 2 foi mantido por 5 minutos no escuro, a 4°C, após incubação com PI, enquanto o tubo 1 foi levado para análise em citômetro de fluxo (Cyflow Space, Partec, Alemanha), equipado com laser de argônio que opera no comprimento de onda de 488 nm (laser azul). A análise da suspensão celular foi realizada para servir como controle da distribuição das células peritoneais antes da marcação com PI, definindo-se dessa forma a região característica em que estas células aparecem no gráfico FSC (referente ao tamanho das células)  $\times$  SSC (referente à granulosidade/ complexidade citoplasmática das células), em escala logarítmica (log3). Após os 5 minutos de incubação com PI, as células do tubo 2 foram analisadas no citômetro de fluxo. Células marcadas pelo corante fluorescente PI, que penetra apenas em células não viáveis, foram detectadas no canal FL2 (emissão de fluorescência na faixa de 560-580 nm). O PI é uma substância que, ao se ligar ao DNA exposto de células em processo de morte ou inviáveis, emite fluorescência (Steinkamp, Lehnert e Lehnert, 1999), permitindo distinguir células viáveis e inviáveis e definir a toxicidade causada pela amostra testada sobre as células peritoneais.

A partir da utilização do *software* Partec FloMax, que possibilita análises dos dados obtidos por meio de imagens na forma de gráficos de histograma ou de dispersão de pontos (*dot plot*), foram definidas janelas de análise (*gates*) e quadrantes para determinar as regiões em que aparecem as células viáveis e as não viáveis, e a porcentagem de células vivas e mortas foi obtida em poucos minutos.

Os resultados obtidos a partir dos testes com Nigrosina e com PI foram analisados segundo o modelo de Bland & Altman (Bland e Altman, 1999), que consiste em uma ferramenta estatística para verificação de concordância entre dois métodos. Trata-se da representação gráfica da comparação de métodos, onde são plotadas a diferença entre as duas medidas (eixo Y) pela sua respectiva média (eixo X). O gráfico apresenta linhas horizontais que representam a diferença média entre as duas séries de medidas (linha central) e as linhas que ficam acima e abaixo desta, que correspondem à média das diferenças mais (linha superior) ou menos (linha inferior) 1,96 multiplicado pelo desvio-padrão das diferenças. Se a

amplitude do intervalo entre os limites superior e inferior não parece ser biologicamente importante, os dois métodos em questão são intercambiáveis. O gráfico é útil em revelar a relação entre as diferenças e as médias das duas técnicas empregadas, e para visualização de erros sistemáticos e identificação de possíveis valores discrepantes. Os testes foram realizados com auxílio do *software* de estatística MedCalc<sup>®</sup> versão 9.4.

### **3.6 Contagem diferencial e total de leucócitos sanguíneos**

Para a contagem diferencial de leucócitos, os animais foram sedados em câmara com éter, e 1 mL de sangue foi coletado por punção cardíaca, com auxílio de uma seringa de 1 mL previamente tratada com EDTA. O material foi acondicionado em tubos para hemograma contendo EDTA. Imediatamente após a coleta, aproximadamente 20 µL de sangue foram utilizados para confecção de lâminas com esfregaço sanguíneo que secou à temperatura ambiente e foi então fixado em metanol e depois corado com Wright-Giemsa. A análise foi realizada em microscópio de luz (1000×), onde foram contadas 500 células/ lâmina, em teste cego, distinguindo-se os leucócitos em basófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e neutrófilos, e observando-se suas possíveis alterações.

Para a contagem total de leucócitos, foram retirados 20 µL do sangue coletado, que foi homogeneizado em tubo Eppendorf juntamente com 380 µL de líquido de Turk, solução diluidora baseada em azul de metileno e que promove a lise dos eritrócitos, permitindo evidenciar apenas os leucócitos. Foram contados os 4 retículos laterais da câmara de Neubauer, que foi preenchida com 10 µL da solução homogênea preparada com o sangue, em microscópio de luz (400×). O número de células contadas foi multiplicado pelo fator de cálculo (50) para expressar o total de leucócitos por mm<sup>3</sup> de sangue.

A análise citométrica fornece informações sobre as populações celulares, permitindo o conhecimento não apenas do tipo celular e sua quantificação, mas do comportamento do organismo em resposta à substância administrada. O teste é indicado por ser rápido, não dispendioso, apresentar a resposta *in vivo*, além de verificar respostas inflamatórias induzidas.

### **3.7 Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade em eritrócitos da medula óssea – teste de micronúcleo e índice de eritrócitos policromáticos**

A genotoxicidade da amostra foi avaliada por meio da contagem de micronúcleos (MN) em eritrócitos da medula óssea. A citotoxicidade foi verificada a partir do cálculo da

porcentagem de eritrócitos policromáticos (EPC, eritrócitos jovens) e eritrócitos normocromáticos (ENC, eritrócitos maduros) na medula óssea.

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, os fêmures foram retirados e as epífises seccionadas. Em uma das extremidades, introduziu-se uma agulha acoplada à seringa, contendo 1 mL de soro fetal bovino, a fim de se proceder à retirada da medula óssea.

O material foi centrifugado por 5 minutos, a 168 g e o sedimento ressuspensão; aproximadamente 20 µL da suspensão foi pingada na extremidade de uma lâmina de vidro. Utilizando uma outra lâmina, inclinada num ângulo de 45°, fez-se o esfregaço. Após a secagem, as lâminas foram fixadas em metanol e coradas com solução de Giemsa e tampão fosfato (14:1), por cinco minutos.

A análise foi realizada em microscópio de luz (1000×), perfazendo um total de 4000 células, sendo 2000 EPC e 2000 ENC por animal. Foram registrados os percentuais de cada um dos dois grupos celulares e também o número de micronúcleos encontrados.

O percentual de células policromáticas (%EPC) foi calculado pela fórmula:

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

Para controle positivo da técnica de micronúcleo, foi incluído um grupo de cinco animais tratados com ciclofosfamida (50 mg/ Kg), agente sabidamente clastogênico, 24h antes da coleta.

Os micronúcleos são estruturas encontradas no citoplasma de células em divisão que possuem características semelhantes às do núcleo principal quando avaliados ao microscópio de luz, exceto pelo tamanho, que é cerca de dez vezes menor. Eles podem ser gerados espontaneamente ou em função de algum agente tóxico presente no organismo (Ribeiro, 2003).

Para que o resultado negativo no teste de micronúcleo seja aceito é necessário que haja aumento significativo de EPC micronucleados nos animais controles positivo. A substância utilizada como controle positivo deve ser administrada em concentração que produza aumento moderado na frequência de EPC micronucleados, quando comparado ao controle negativo (solvente/veículo), mas que não revele a quem está analisando, a identidade do grupo (Ribeiro et al., 2004). O aumento significativo da quantidade eritrócitos micronucleados em animais expostos à substância-teste indica que tal substância é genotóxica.

O índice de EPC no grupo exposto a algum agente não pode ser menor que 20% do valor do controle negativo (Ribeiro et al., 2004), caso contrário, o agente estará causando citotoxicidade ao organismo.

### 3.8 Avaliação Histológica

Para avaliação de tecidos – pulmões, fígado e baço – foram utilizados três animais dos grupos tratados com ML-Magh e um animal controle para cada tempo de tratamento avaliado. Os órgãos foram retirados após o sacrifício dos animais, lavados com soro fisiológico e partes menores foram seccionadas com auxílio de lâmina de bisturi. O material foi fixado com fixador de Davidson a 4°C durante 08 a 10 horas. Em seguida o material foi acondicionado em cassetes de plástico para histologia, devidamente identificados e transferidos para um frasco com álcool a 70%. Posteriormente o material foi processado conforme metodologia clássica descrita na literatura: desidratação por meio de imersão sequencial em soluções alcoólicas com percentual decrescente de água, diafanização em soluções de xileno e finalmente, inclusão em parafina. Os tecidos foram seccionados em micrótomo, em cortes semi-seriados de 5 µm de espessura, que foram corados com vermelho rápido nuclear associado ao método de Perls e com hematoxilina-eosina (HE). A captura de imagens dos tecidos foi realizada em microscópio de luz modelo Zeiss, equipado com câmera AxioCam, e as fotos digitalmente gravadas com o auxílio do *software* AxioVision 4.6.1.0 (Carl Zeiss Vision).

### 3.9 Ensaios Bioquímicos

Os testes utilizados para dosar enzimas e metabólitos de camundongos tratados com ML-Magh estão apresentados na **Tabela 2** e foram realizados em parceria com o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília. Para tanto, 1 mL de sangue dos animais controle e dos animais tratados intravenosamente com ML-Magh (conforme já descrito) foi coletado, o plasma foi separado e armazenado em geladeira para posterior uso na realização dos exames bioquímicos em analisador bioquímico semi-automático modelo BIO-2000 (Bioplus, Brasil).

**Tabela 2** - Testes utilizados para dosagens bioquímicas de camundongos tratados com ML-Magh.

Teste	Método*
Alanina aminotransferase (ALT)	Cinética UV - IFCC
Fosfatase alcalina (FA)	Roy modificado
Uréia	Urease-Labtest
Creatinina	Picrato-Labtest

\* kits de reagentes da Labtest (Brasil).

### 3.10 Medidas do Ferro Sérico

Para determinação do ferro sérico, foram utilizados grupos de animais (n= 3-5) tratados com 100 µL de ML-Magh ( $1,0 \times 10^{14}$  partículas/mL) e 10 animais controle para estabelecimento de valores de referência, conforme recomendação do fabricante do kit de reagentes utilizado (Labtest, Brasil). Foi utilizado um kit de reagentes para determinação de ferro sérico em amostras de sangue (Labtest, Brasil) e a metodologia de Goodwin modificada. Todo o material utilizado no experimento foi tratado com solução de ácido nítrico 10% durante uma noite, lavado exaustivamente com água corrente e enxaguado com água deionizada para evitar a obtenção de dados incorretos devido à contaminação com traços de ferro. Após 10 minutos, 1h, 6h, 24h, 48h e 7dias da administração de ML-Magh, 1 mL de sangue foi coletado dos animais por punção cardíaca, o sangue foi centrifugado durante 5 minutos a 1500 g e o soro foi separado, para ser utilizado nas análises. Para cada teste, 250 µL de soro foram misturados a 1 mL de tampão e 25 µL de Ferrozine<sup>®</sup> em um tubo Eppendorf. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos e depois transferida para cubetas de acrílico para fotômetro e as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (Ultrospec<sup>®</sup> 1000, Amersham Pharmacia Biotech, 200-900nm) com comprimento de onda definido em 560 nm. Foi também utilizado o branco (250 µL de água deionizada misturada com 1 mL de tampão e 25 µL de Ferrozine<sup>®</sup>) que foi ajustado com o valor zero no aparelho. Foi utilizado ainda um padrão (250 µL da solução padrão do kit misturada com 1 mL de tampão e 25 µL de Ferrozine<sup>®</sup>), cuja absorbância foi utilizada para calcular o valor de ferro sérico de cada animal, segundo a fórmula:

$$\text{Ferro } (\mu\text{g/dL}) = \text{Absorbância do teste do animal} / \text{absorbância do padrão} \times 500$$

O valor médio do ferro sérico de cada grupo de tratamento foi considerado para verificação de variação dessa medida de acordo com o tempo de tratamento com ML-Magh.

O princípio do teste é o de que íons férrico são dissociados da transferrina por ação do tampão de pH ácido e reduzidos a íon ferroso por ação da hidroxilamina, e o Ferrozine<sup>®</sup> quando adicionado, forma um complexo magenta brilhante cuja absorbância, medida em 560 nm, é proporcional à quantidade de ferro na amostra.

Foi realizado um teste utilizando 100 µL da amostra ML-Magh pura, em substituição ao soro, e foi demonstrado que os reagentes do kit revelam o ferro presente na amostra (absorbância = 0,540 ou o equivalente a aproximadamente 560 µg/dL de ferro). Foi incluído um grupo de animais tratados (n=3) com o volume máximo tolerado por camundongos por via IV, 200 µL de ML-Magh, cujo ferro sérico foi medido após 10 minutos, que serviu como uma espécie de controle positivo da técnica.

### **3.11 Análise estatística dos dados**

Para análise dos dados obtidos neste trabalho foram utilizadas as estatísticas descritiva e inferencial. As variáveis do estudo, que são quantitativas, foram testadas quanto ao tipo de distribuição por meio do teste de normalidade de Ryan-Joiner, similar ao Shapiro-Wilk. Para verificar a homogeneidade de variâncias, foi utilizado o teste de Levene. Quando os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, foi utilizado o teste t de Student, teste paramétrico para comparação de dois grupos independentes. Para os dados com distribuição não-normal e/ ou variâncias não homogêneas (dados não paramétricos) foi utilizado o teste U de Mann-Whitney para comparar dois grupos independentes. O nível de significância adotado nos testes foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Os testes foram realizados com auxílio do *software* de estatística MINITAB<sup>®</sup> versão 14.1.

#### **4. RESULTADOS**

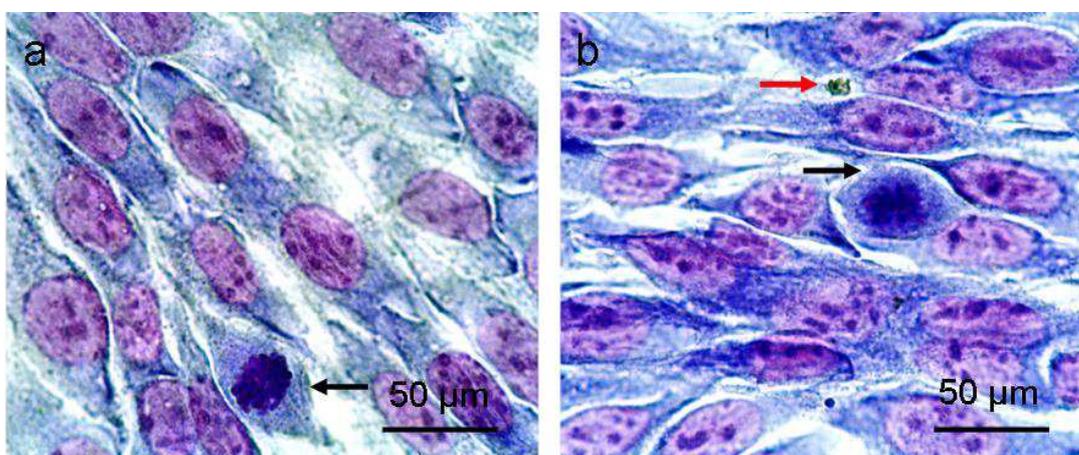
#### 4.1 Caracterização da amostra à base de magnetolipossomas - ML-Magh

A amostra de fluido magnético que deu origem à ML-Magh apresentou, em estudos de microscopia eletrônica de transmissão prévios, nanopartículas com diâmetro modal de 10 nm (Brugin, 2007).

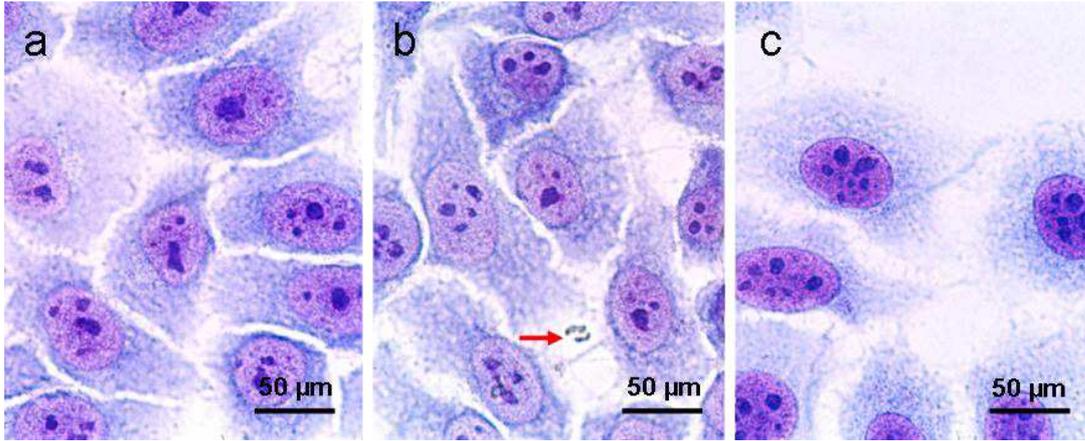
Os lipossomas da amostra ML-Magh apresentaram, pela técnica de difração a laser, tamanho médio de  $124 \pm 75$  nm e índice de polidispersão de 0,319. Foi determinado por medida do potencial zeta ( $\xi$ ) ( $-24,4 \pm 19,3$  mV), que a carga de superfície dos lipossomas é negativa (ver Anexo 1).

#### 4.2 Avaliação morfológica *in vitro* das linhagens de células ductais de glândula submandibular humana (HSG) e mesangiais humanas (CM) após tratamento com ML-Magh

A fim de avaliar a possível ocorrência de alterações na morfologia de células HSG e CM induzidas por ML-Magh, as linhagens foram tratadas com essa amostra e avaliadas ao microscópio de luz, após 24h de cultura. Tanto as lâminas do grupo controle, como as dos grupos tratados com 50  $\mu$ L ou 100  $\mu$ L de ML-Magh apresentaram células com formato normal, margem bem delimitada, coloração homogênea, muitas unidades celulares (inclusive em processo de divisão celular (**Figura 1**)) e ausência de fragmentos celulares (**Figuras 1 e 2**). Pequenos agregados sugestivos de serem precipitados de magnetolipossomas foram visualizados (**Figuras 1b e 2b**).



**Figura 1:** Fotomicrografias de células mesangiais (CM): (a) controle; (b) 24h após tratamento com 100 $\mu$ L de ML-Magh. As setas pretas indicam células em processo de divisão celular. A seta vermelha indica um possível aglomerado de magnetolipossomas.

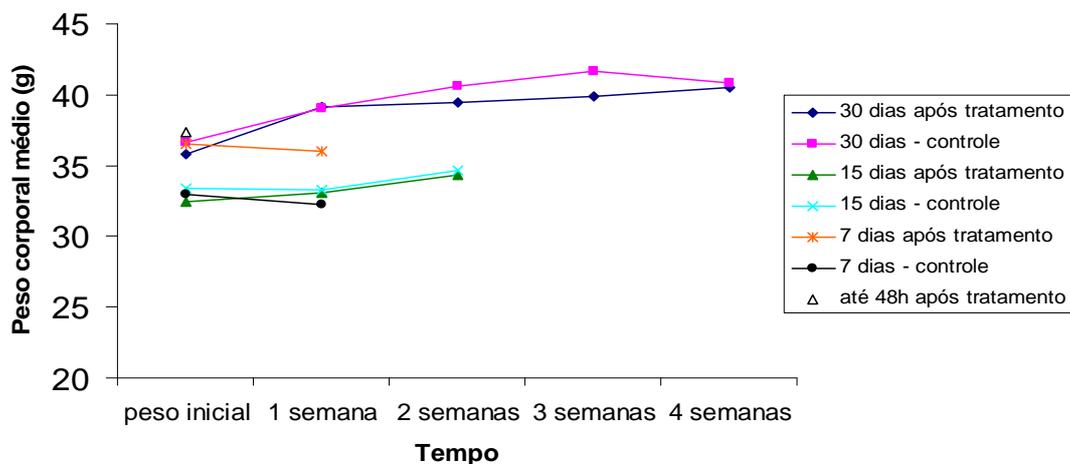


**Figura 2:** Fotomicrografias de células ductais de glândula submandibular humana (HSG): (a) controle; (b) 24h após tratamento com 50µL de ML-Magh; (c) 24h após tratamento com 100µL de ML-Magh. A seta indica um possível aglomerado de magnetolipossomas.

### 4.3 Monitoramento dos grupos de animais ao longo do período experimental

O peso dos camundongos foi registrado a partir do início do tratamento com a amostra ML-Magh, quando os animais tinham aproximadamente três meses de idade. O peso médio dos camundongos de cada grupo de tratamento foi mensurado semanalmente ao longo de todo o período experimental (**Figura 3**) e não apresentou diferenças significativas em relação ao controle.

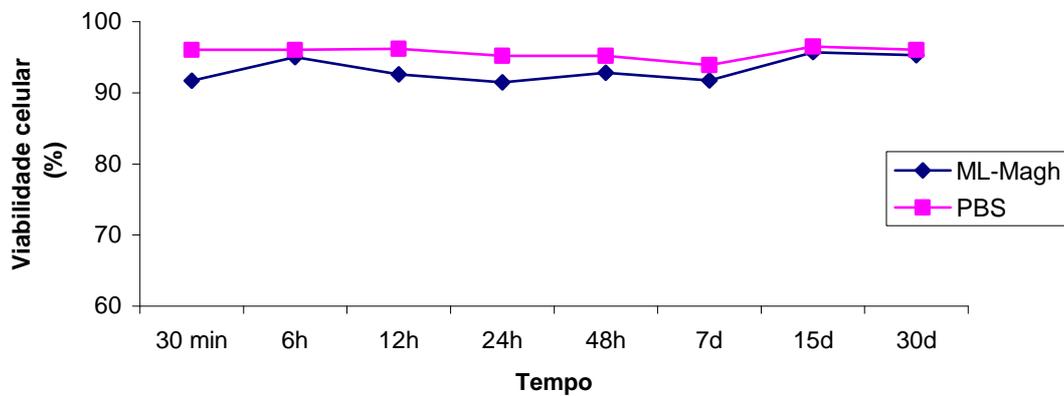
Alterações clínicas e comportamentais, tais como diarreia, hemorragia, vômito, atividade motora diminuída, atonia, surgimento de manchas ou queda de pêlo, ou mesmo óbito, não ocorreram nos animais após tratamento com ML-Magh.



**Figura 3:** Peso corporal médio (g) dos camundongos ao longo do período experimental. O peso inicial foi calculado no dia do tratamento dos animais com ML-Magh, quando tinham três meses de idade. Semanalmente, os grupos foram pesados até o período máximo de exposição à amostra, que foi de 30 dias.

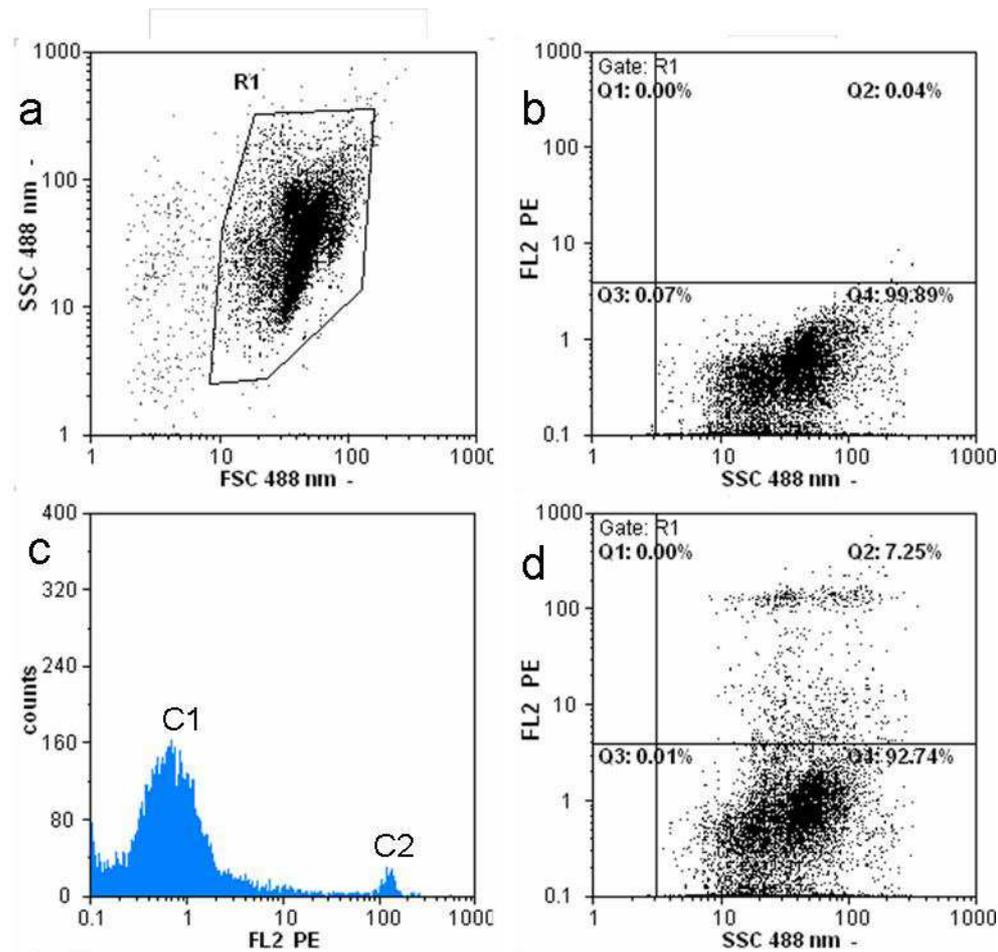
#### 4.4 Avaliação da citotoxicidade em células peritoneais – teste de viabilidade celular com Nigrosina e citometria de fluxo utilizando Iodeto de Propídio

Os resultados do teste de viabilidade celular utilizando o corante Nigrosina e análise de células ao microscópio de luz revelaram que o tratamento, por via intraperitoneal, com ML-Magh, não alterou a frequência de células vivas no peritônio (**Figura 4**). Os valores de viabilidade celular mantiveram-se acima de 90% em todos os grupos observados (**Figura 4**).



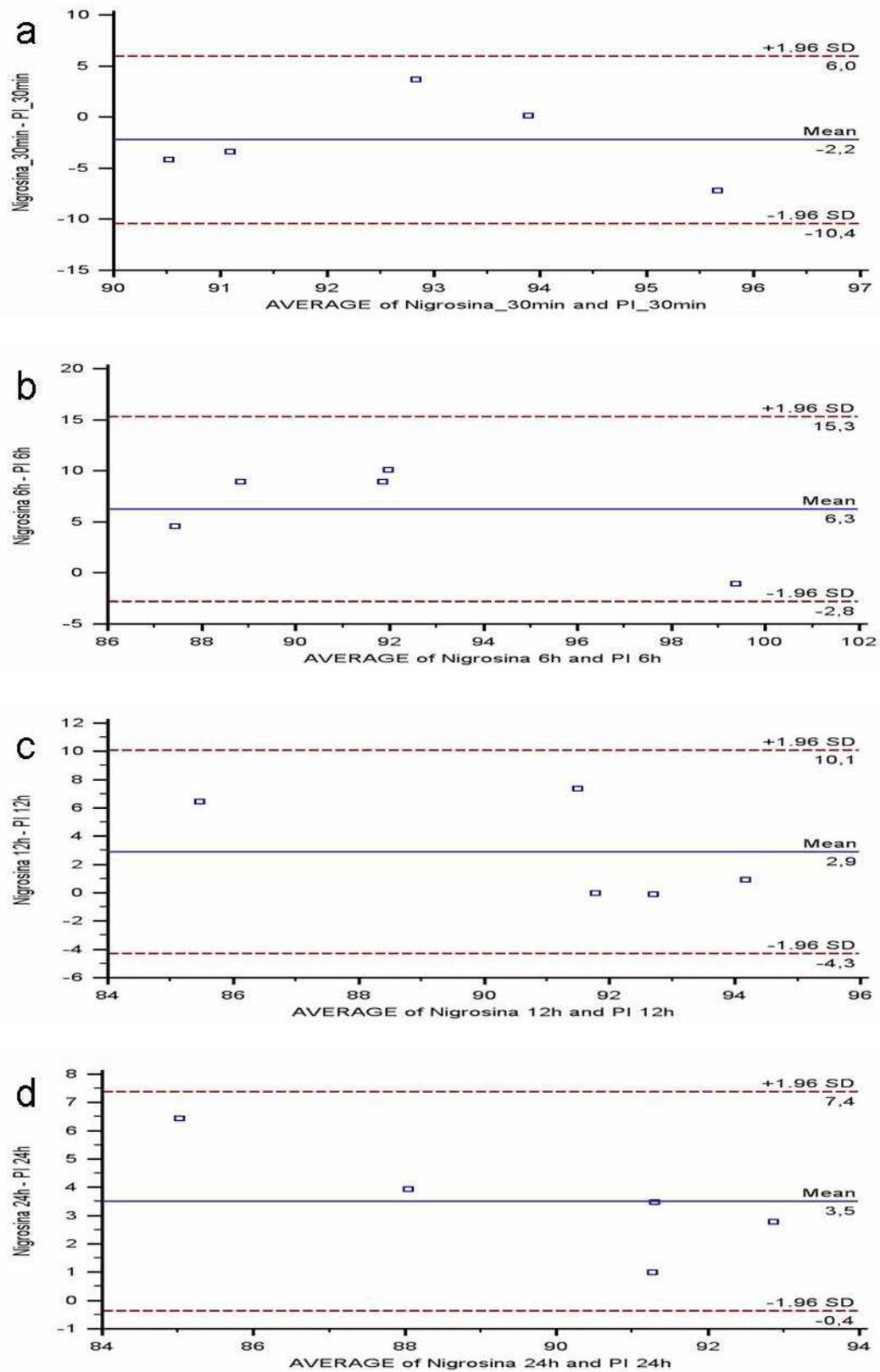
**Figura 4:** Efeito da administração intraperitoneal de ML-Magh sobre a viabilidade das células peritoneais de camundongos em função do tempo de tratamento (30 min - 30 dias).

Os resultados do teste de viabilidade celular utilizando o corante Iodeto de Propídio (PI) e análise automatizada por citometria de fluxo também revelaram que o tratamento com ML-Magh, por via intraperitoneal, não alterou significativamente a frequência de células vivas no peritônio (ver representação ilustrativa na **Figura 5**).

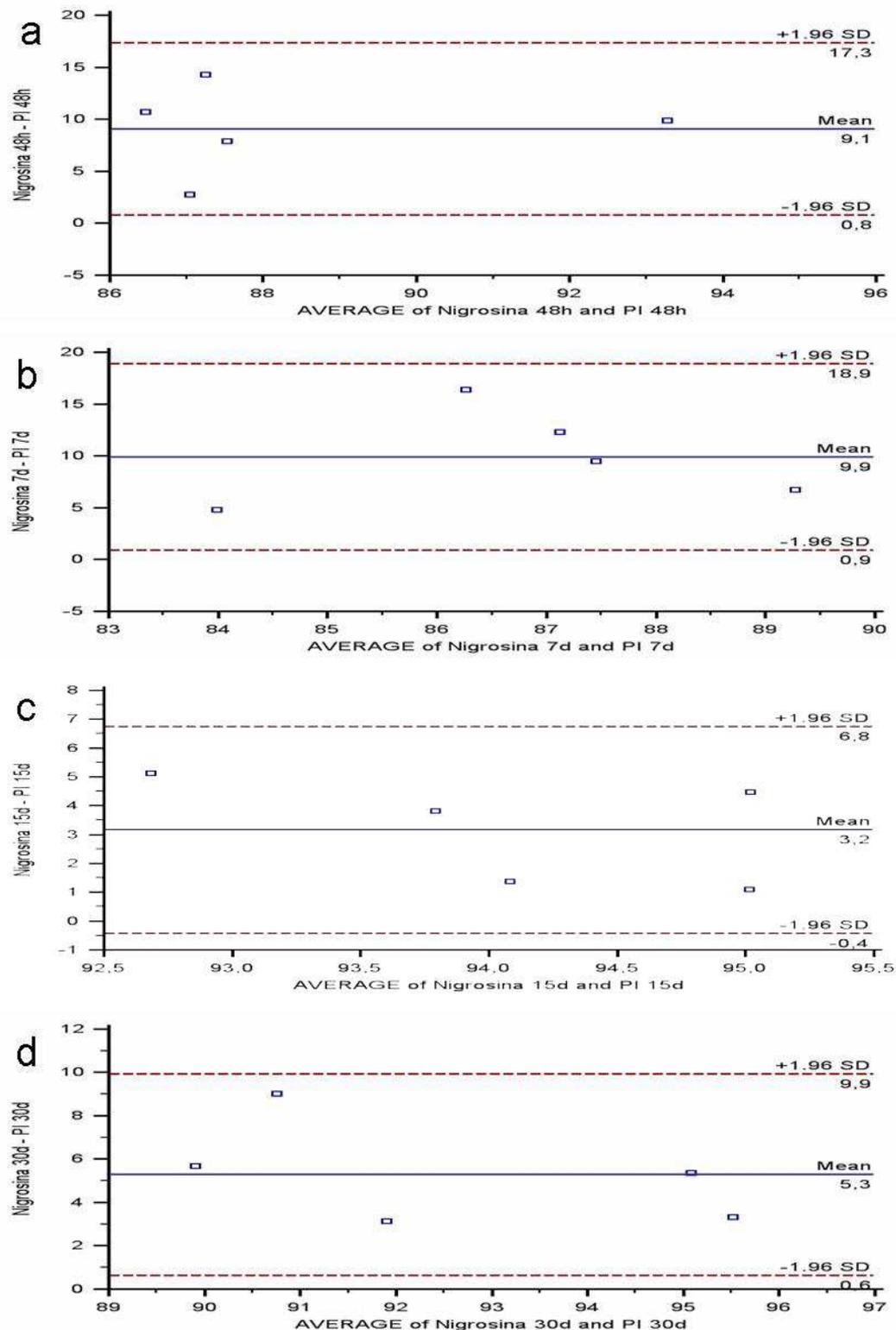


**Figura 5:** Representação gráfica mostrando o efeito da administração intraperitoneal de ML-Magh sobre a viabilidade das células peritoneais de camundongos 15 dias após o tratamento. (a) células peritoneais de camundongos observadas em citometria de fluxo em relação aos parâmetros FSC e SSC. O *gate* R1 delimita esta população; (b) células peritoneais (*gate* R1) não tratadas com iodeto de propídio (observar ausência (apenas 0,04% de autofluorescência) de células detectadas no canal FL2); (c) representação gráfica em histograma das células peritoneais incubadas com iodeto de propídio (o pico maior (C1) representa as células vivas; C2 corresponde às mortas); (d) representação gráfica em *dot plot* das células peritoneais (*gate* R1) incubadas com iodeto de propídio (7,25% de células mortas).

A avaliação da concordância dos dois métodos utilizados para verificar a viabilidade celular foi realizada segundo o modelo de Bland & Altman (Bland e Altman, 1999), que revelou haver concordância entre as técnicas utilizadas (**Figuras 6 e 7**).



**Figura 6:** Representações gráficas, segundo modelo de Bland & Altman, da comparação de métodos de medidas de viabilidade celular peritoneal de camundongos tratados com ML-Magh: (a) 30 minutos após o tratamento; (b) 6 horas após o tratamento; (c) 12 horas após o tratamento; (d) 24 horas após o tratamento.

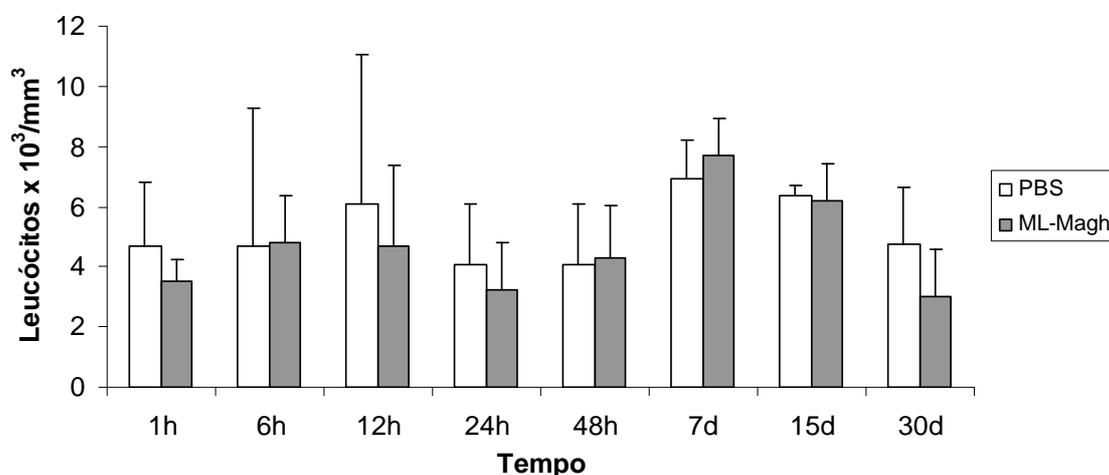


**Figura 7:** Representações gráficas, segundo modelo de Bland & Altman, da comparação de métodos de medidas de viabilidade celular peritoneal de camundongos tratados com ML-Magh: (a) 48 horas após o tratamento; (b) 7 dias após o tratamento; (c) 15 dias após o tratamento; (d) 30 dias após o tratamento.

#### 4.5 Avaliação da contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos

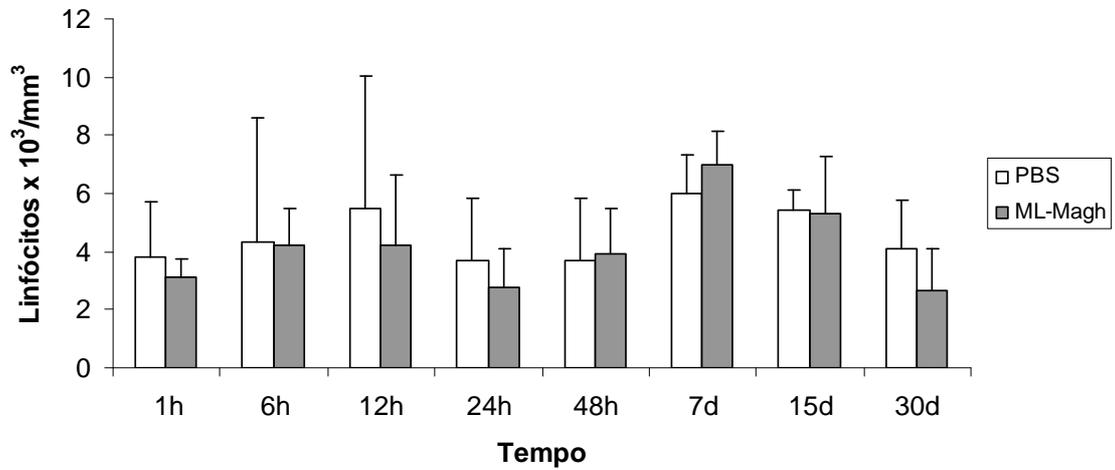
Os possíveis efeitos pró-inflamatórios induzidos em camundongos pelo tratamento com a amostra ML-Magh foram verificados a partir da contagem de leucócitos do sangue periférico dos animais.

A contagem global de leucócitos (**Figura 8**) não apresentou variações estatisticamente significativas nos diferentes tempos de tratamento com ML-Magh, quando comparada aos dados do controle.

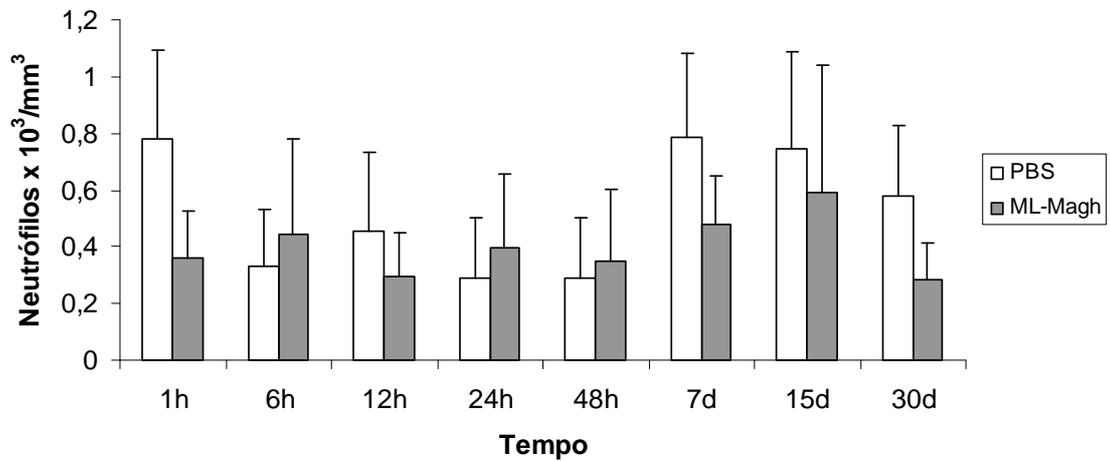


**Figura 8:** Efeito da administração de ML-Magh sobre a contagem global de leucócitos sanguíneos de camundongos em função do tempo de tratamento. Médias  $\pm$  desvio-padrão.

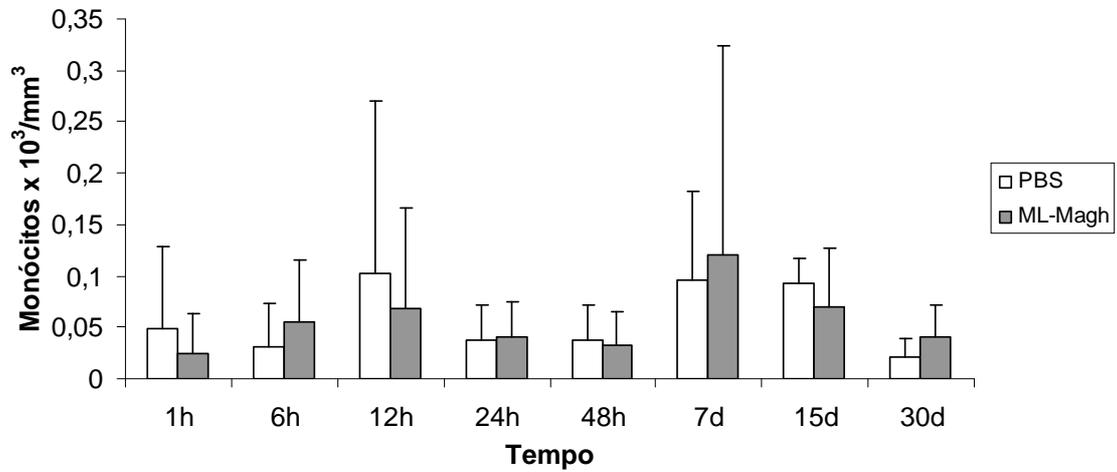
As contagens diferenciais de leucócitos sanguíneos – linfócitos (**Figura 9**), neutrófilos (**Figura 10**), monócitos (**Figura 11**), eosinófilos (**Figura 12**) e basófilos (**Figura 13**) – não revelaram alterações significativas em camundongos tratados com ML-Magh, quando comparadas ao controle. Apenas a população de eosinófilos sofreu aumento significativo em relação ao controle 1h após o tratamento (**Figura 12**).



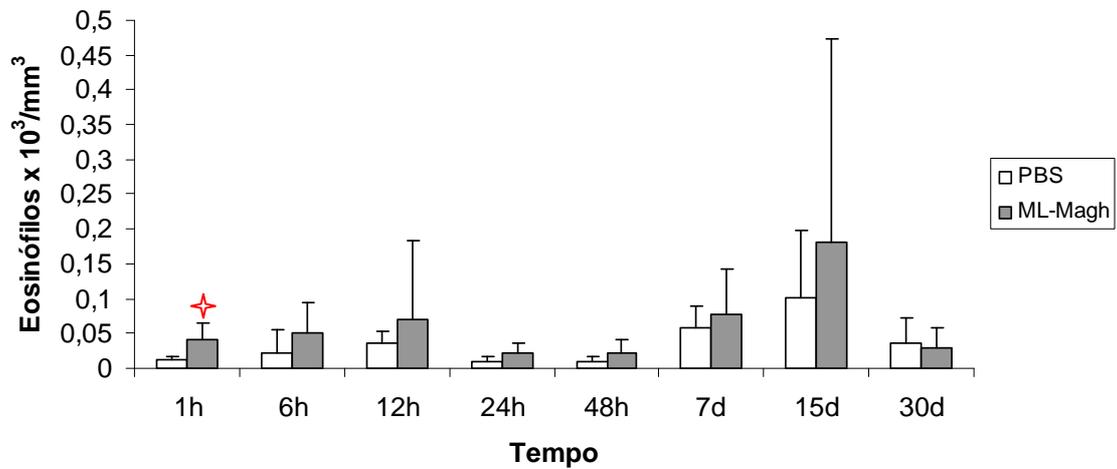
**Figura 9:** Efeito da administração de ML-Magh sobre a contagem de linfócitos sanguíneos de camundongos em função do tempo de tratamento. Médias  $\pm$  desvio-padrão.



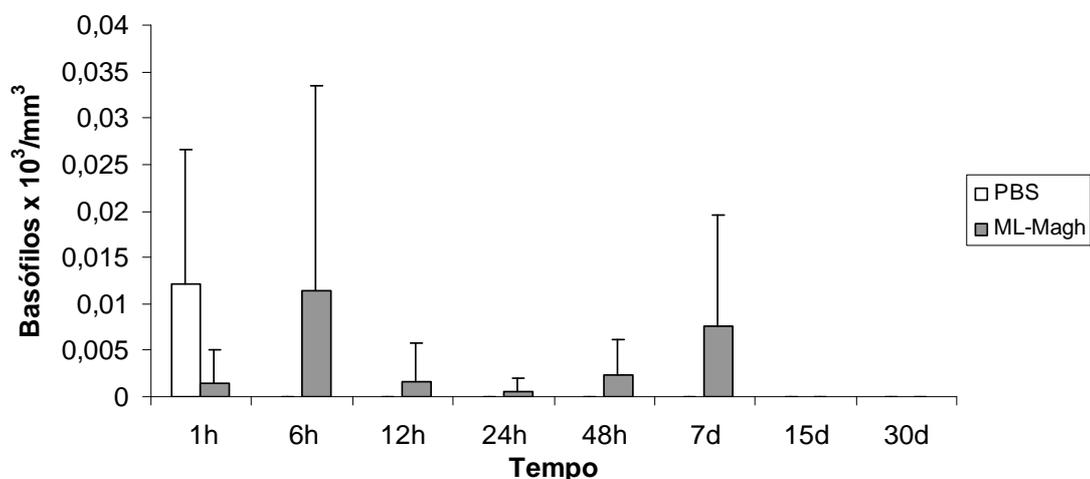
**Figura 10:** Efeito da administração de ML-Magh sobre a contagem de neutrófilos sanguíneos de camundongos em função do tempo de tratamento. Médias  $\pm$  desvio-padrão.



**Figura 11:** Efeito da administração de ML-Magh sobre a contagem de monócitos sanguíneos de camundongos em função do tempo de tratamento. Médias  $\pm$  desvio-padrão.



**Figura 12:** Efeito da administração de ML-Magh sobre a contagem de eosinófilos sanguíneos de camundongos em função do tempo de tratamento. ✦ – indica diferença significativa em relação ao controle ( $p=0,017$ ). Médias  $\pm$  desvio-padrão.



**Figura 13:** Efeito da administração de ML-Magh sobre a contagem de basófilos sanguíneos de camundongos em função do tempo de tratamento. Médias  $\pm$  desvio-padrão.

#### 4.6 Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade em eritrócitos da medula óssea – teste de micronúcleo e índice de eritrócitos policromáticos

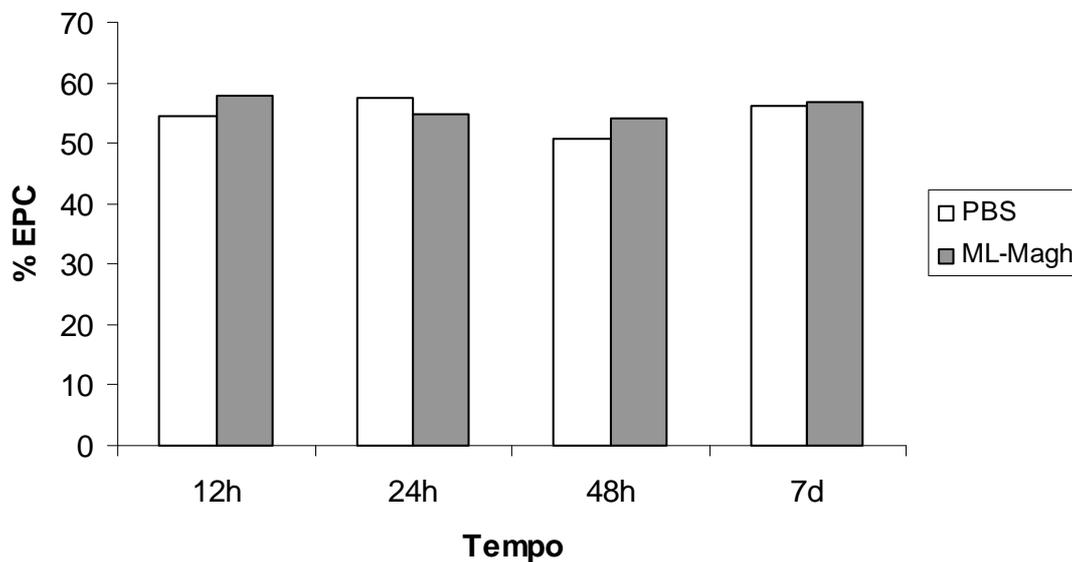
Os possíveis efeitos genotóxicos induzidos em camundongos pelo tratamento com a amostra ML-Magh foram avaliados a partir da contagem de eritrócitos micronucleados na medula óssea dos animais. A frequência de MN encontrados em EPC e ENC não foi significativamente diferente da verificada no controle nos diferentes tempos após tratamento com ML-Magh. Os valores médios de MN a cada 2000 eritrócitos analisados (EPC e ENC) não chegaram a dois para os grupos que receberam tratamento com a amostra ML-Magh (**Tabela 3**). No grupo controle positivo, tratado com ciclofosfamida 24h antes da coleta, foi verificado aumento significativo no número de MN em EPC, em média 33 MN/ 2000 EPC (**Tabela 3**).

Os possíveis efeitos citotóxicos induzidos por ML-Magh em camundongos tratados com esta amostra foram avaliados a partir da análise do índice de EPC (%EPC) em eritrócitos da medula óssea dos animais. Nos diferentes tempos após o tratamento, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e controles, e a %EPC apresentou valores médios entre 53 e 58% nos grupos tratados com ML-Magh (**Figura 14**).

**Tabela 3:** Efeito do tratamento com ML-Magh sobre a frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) da medula óssea de camundongos

Tempo após o tratamento	Grupo	MN - EPC <sup>a</sup>	MN - ENC <sup>a</sup>
12h	PBS	2,3 ± 1,5	1,3 ± 0,6
	ML-Magh	1,7 ± 1,6	1,3 ± 1,2
24h	PBS	2 ± 1	0,7 ± 0,6
	ML-Magh	0,8 ± 0,8	0,5 ± 0,8
48h	PBS	1,3 ± 2,3	2,3 ± 1,2
	ML-Magh	0,8 ± 0,8	1,2 ± 1
7d	PBS	1,3 ± 1,2	0,7 ± 1,2
	ML-Magh	0,7 ± 1,2	0,8 ± 0,4
Controle Positivo (CPA)		33,2 ± 14,8*	1,7 ± 1,5

<sup>a</sup> Médias ± desvio-padrão; CPA= ciclofosfamida, 50mg/Kg, administrada 24h antes da coleta, o controle positivo da técnica. \* estatisticamente diferente dos demais grupos, inclusive do controle tratado com tampão fosfato (PBS).



**Figura 14:** Efeito do tratamento com ML-Magh sobre o índice de eritrócitos policromáticos (%EPC) na medula óssea de camundongos. PBS = controle tratado com tampão fosfato.

## 4.7 Avaliação Histológica

A fim de avaliar a ocorrência de alterações histológicas induzidas por ML-Magh, foram estudados os pulmões, fígado e baço de animais tratados com a amostra. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE), que permite a visualização de diversos aspectos teciduais, sobretudo de estruturas como núcleo e citoplasma, e também foram submetidos à coloração pelo método de Perls associado ao vermelho rápido nuclear, que permite a visualização de agregados de ferro (tanto endógeno como proveniente de NPM), que adquirem uma cor marrom dourada ou azul brilhante.

### 4.7.1 Pulmões

Os cortes histológicos de pulmões de animais controle apresentaram parênquima esponjoso com alvéolos de contorno regular e septos interalveolares delgados, rede de capilares de calibre normal contendo hemácias, além de vasos sanguíneos e bronquíolos de aspecto normal e pleura (serosa que envolve o pulmão) íntegra. Não foram observados agregados de coloração marrom ou azul. Raríssimos infiltrados inflamatórios foram observados próximos a bronquíolos ou vasos. (**Figura 15**)

De maneira geral, animais tratados com ML-Magh não apresentaram alterações pulmonares histopatológicas nos diversos tempos de tratamento avaliados, e aspectos relacionados à biodistribuição das NPM não puderam ser satisfatoriamente conclusivos uma vez que foram observados pouquíssimos agregados de coloração marrom ou azul nos cortes analisados, que seriam sugestivos de agregados de NPM dos magnetolipossomas. Uma hora após o tratamento com ML-Magh foi observada a presença de agregados de coloração marrom (HE) e azul (Perls), que podem ser provenientes do acúmulo de nanopartículas ricas em ferro, e por isso evidenciadas pelos corantes, em locais próximos a vasos e bronquíolos (**Figura 16 a-d**). Seis horas após o tratamento não foram observadas quaisquer alterações nos pulmões, e 12h após foram observados pequenos infiltrados inflamatórios associados à presença de agregados de coloração marrom ou azul, sugestivos de serem NPM (**Figura 16 e, f**). No entanto, nem todos os animais do grupo apresentaram comportamento semelhante frente ao tratamento, e houve indivíduo do grupo 12h que não apresentou qualquer agregado de coloração marrom ou azul nos pulmões. Após 24h do tratamento, não foram observados agregados de coloração marrom ou azul sugestivos de serem NPM e o tecido pulmonar apresentou aspecto normal, com raríssimos infiltrados inflamatórios e um leve espessamento

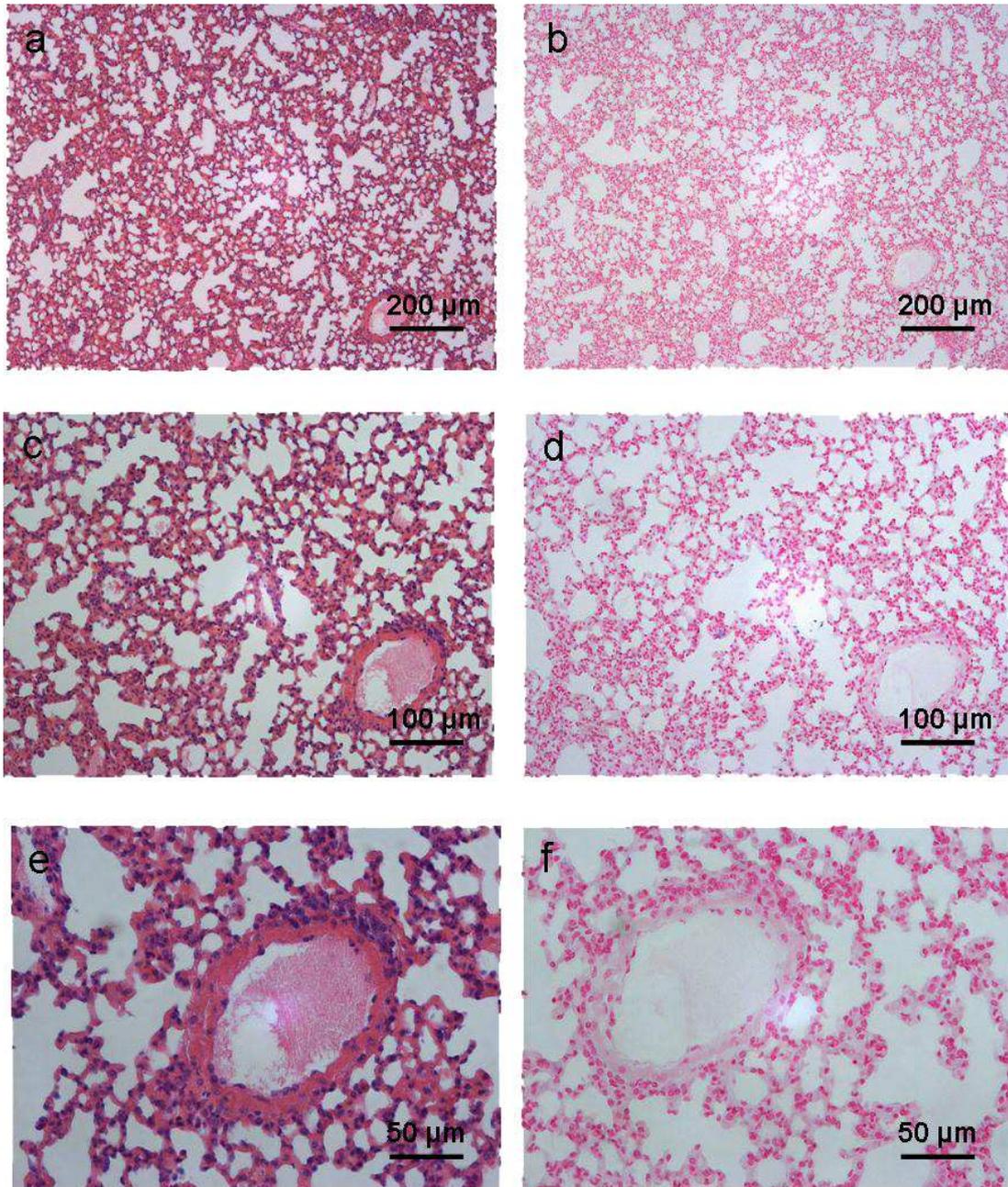
dos septos interalveolares em alguns animais. Quarenta e oito horas após o tratamento os animais apresentavam agregados marrons ou azuis próximos a vasos e associados a leves processos inflamatórios. Tempos mais longos decorridos após o tratamento (7, 15 e 30 dias) evidenciaram ausência de alterações histopatológicas, apenas pequenos e raros infiltrados linfocitários e ausência de agregados marrons ou azuis nos pulmões dos animais (**Figura 17**).

#### 4.7.2 Fígado

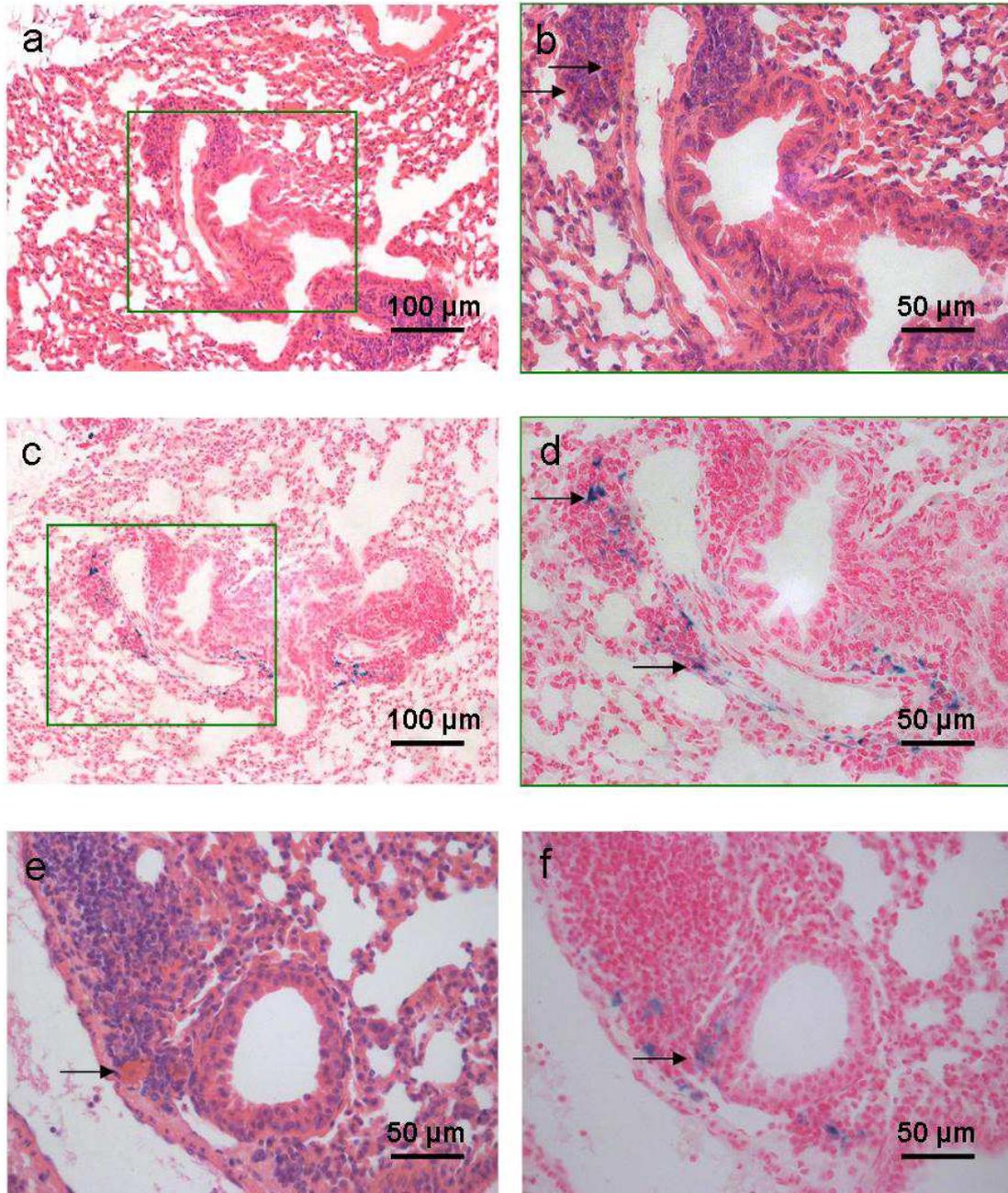
Os cortes histológicos do fígado apresentaram-se dentro dos padrões normais tanto em animais do grupo controle (**Figura 18 a, b**), como em animais tratados com ML-Magh (**Figura 18 c-f**), uma vez que na análise ao microscópio de luz apresentaram parênquima bem preservado, com células hepáticas morfológicamente regulares constituindo lóbulos hepáticos organizados, que apresentaram espaços porta limpos ou com raras ocorrências de acúmulo de tecido linfóide ao redor (**Figura 18 d**), sem a presença de agregados de coloração marrom ou azul associados. Os sinusóides hepáticos também não apresentaram alterações e as células de Kupffer (de núcleo grande e nucléolo evidente) não apareceram em quantidade aumentada em animais tratados. A cápsula de tecido conjuntivo do tecido hepático apresentou-se íntegra e delgada.

#### 4.7.3 Baço

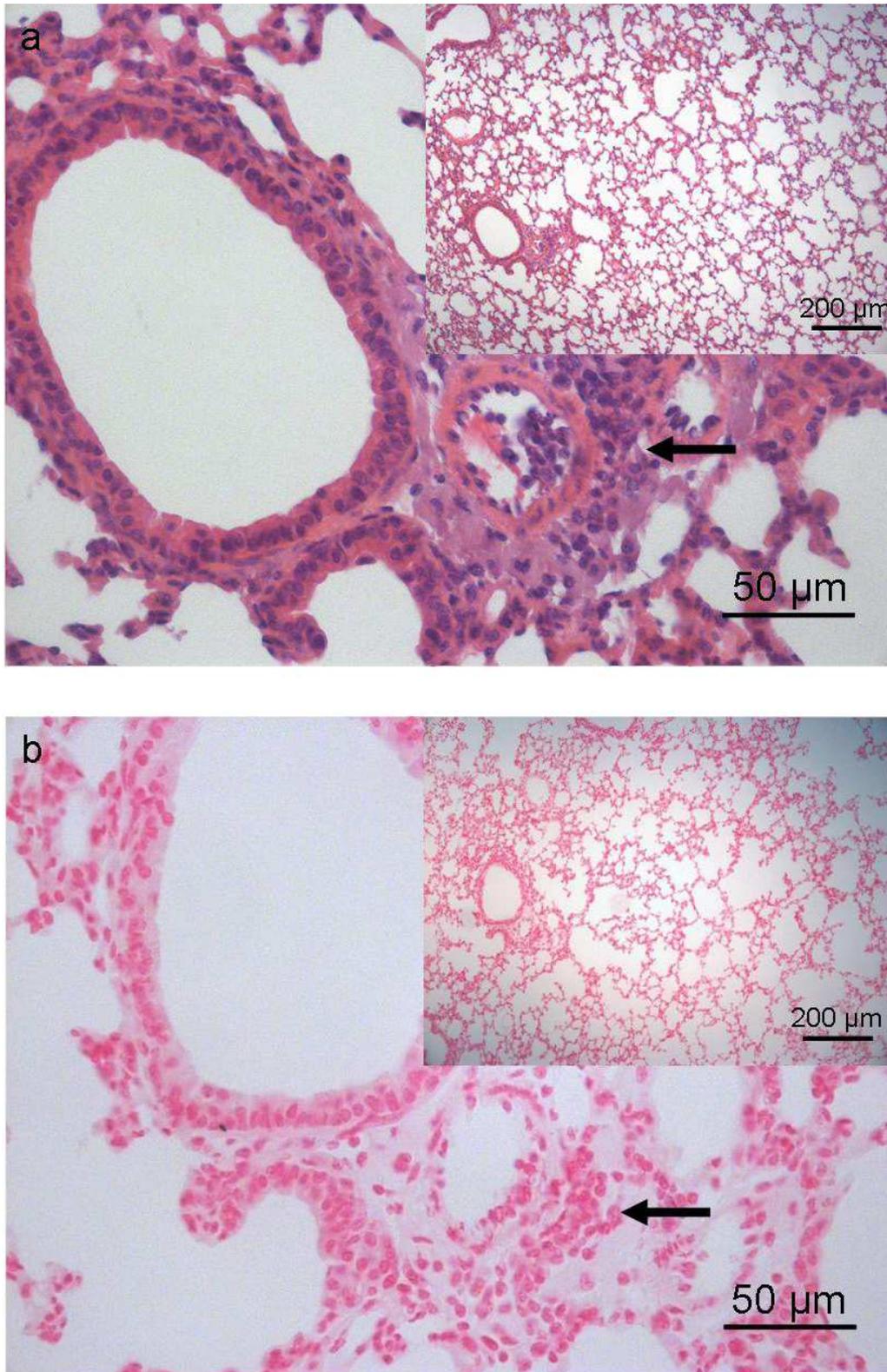
Os cortes do baço de animais controle apresentaram-se histologicamente normais, com cápsula de conjuntivo denso íntegra e polpa esplênica apresentando as regiões de polpa branca (constituída de tecido linfóide) e polpa vermelha (rica em sangue) bem diferenciadas. A presença de agregados marrons e azuis foi verificada tanto em animais controle (**Figura 19**) como em animais tratados com ML-Magh (**Figuras 20 e 21**) e a quantidade desses agregados praticamente não variou ao longo do tempo de tratamento, tendo sido comparável aos controles nos tempos de 1h, 6h (**Figura 20 a, b**) e 12h. A presença de agregados de coloração marrom ou azul foi considerada aumentada apenas no baço de animais avaliados 24h após o tratamento (**Figura 21**), e os grupos de 48h (**Figura 20 c, d**) e 7 dias já apresentavam quantidades similares aos do controle, o que foi completamente verificado 15 dias (**Figura 20 e, f**) e 30 dias após o tratamento.



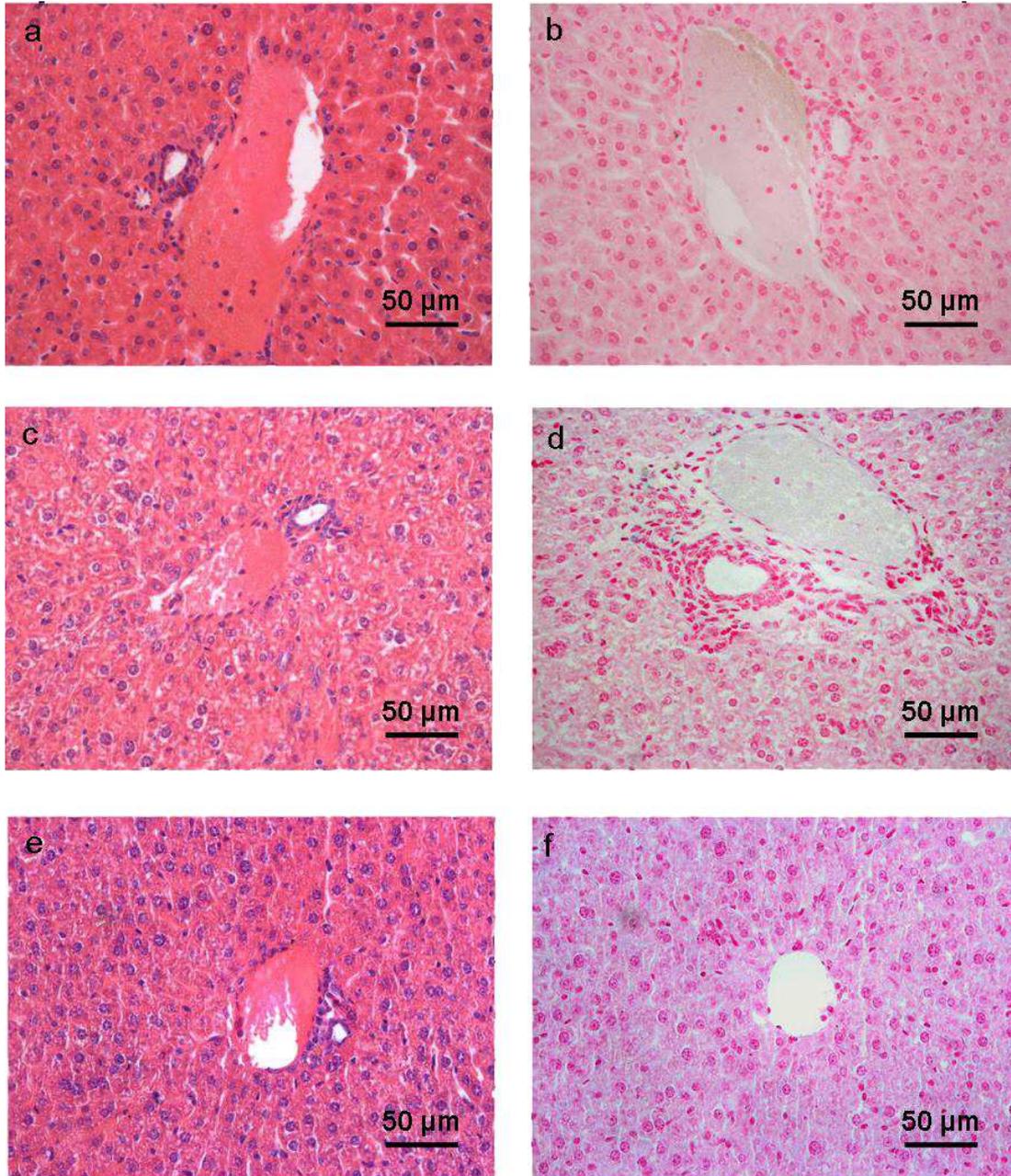
**Figura 15:** Fotomicrografias de pulmões de camundongo representativas do grupo controle. Fotomicrografias indicadas pelas letras a, c, e: coloração por método HE; letras b, d, f: coloração por método de Perls.



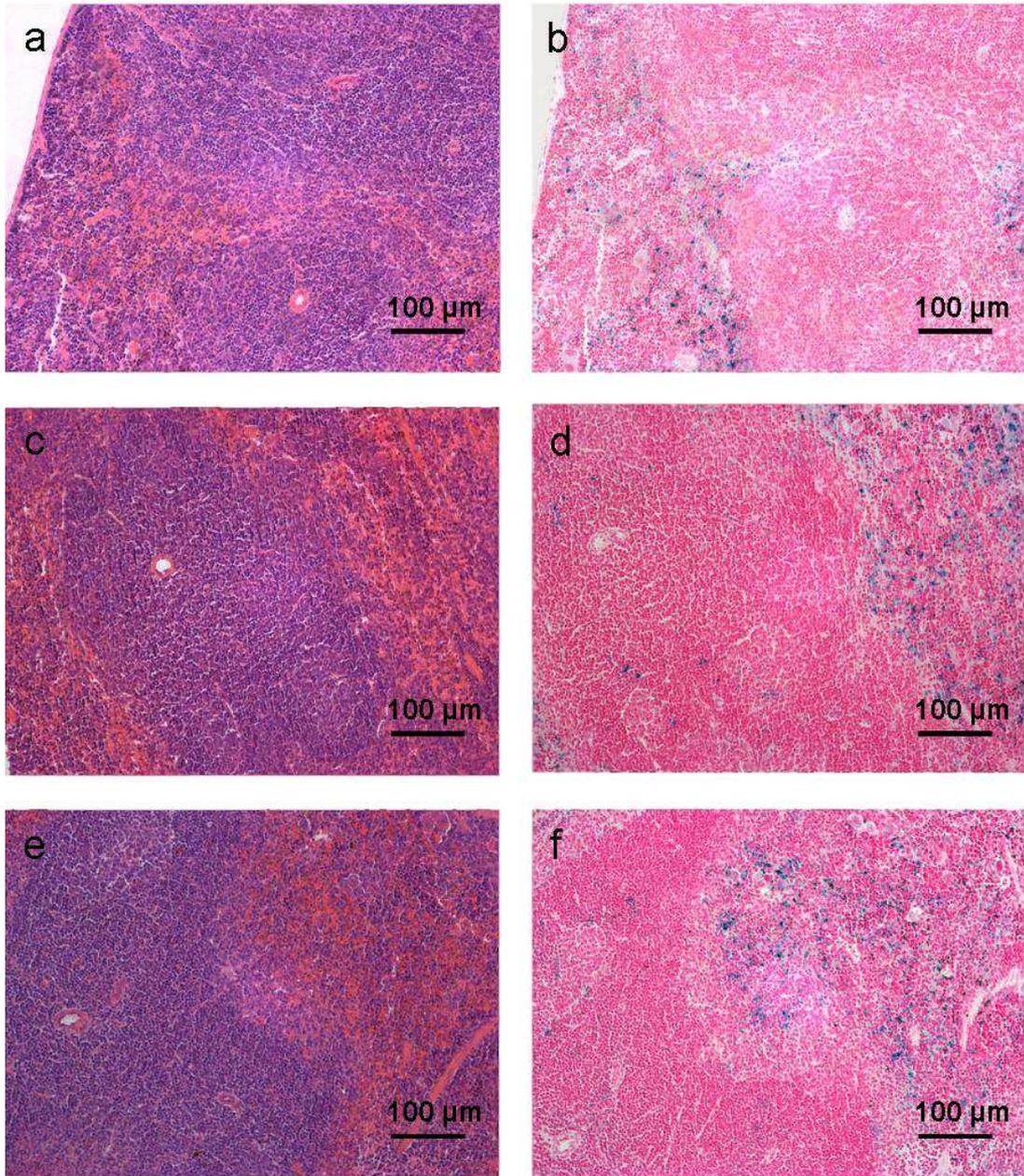
**Figura 16:** Fotomicrografias de pulmões de camundongos tratados com ML-Magh. (a – d) 1 hora após o tratamento. (e, f) 12 horas após o tratamento. Figuras b e d correspondem a aumentos maiores das regiões delimitadas pelos quadros verdes em a e c, respectivamente, para mostrar mais detalhes. As setas indicam NPM de magnetolipossomas aglomeradas. Fotomicrografias indicadas pelas letras a, b, e: coloração por método HE; letras c, d, f: coloração por método de Perls.



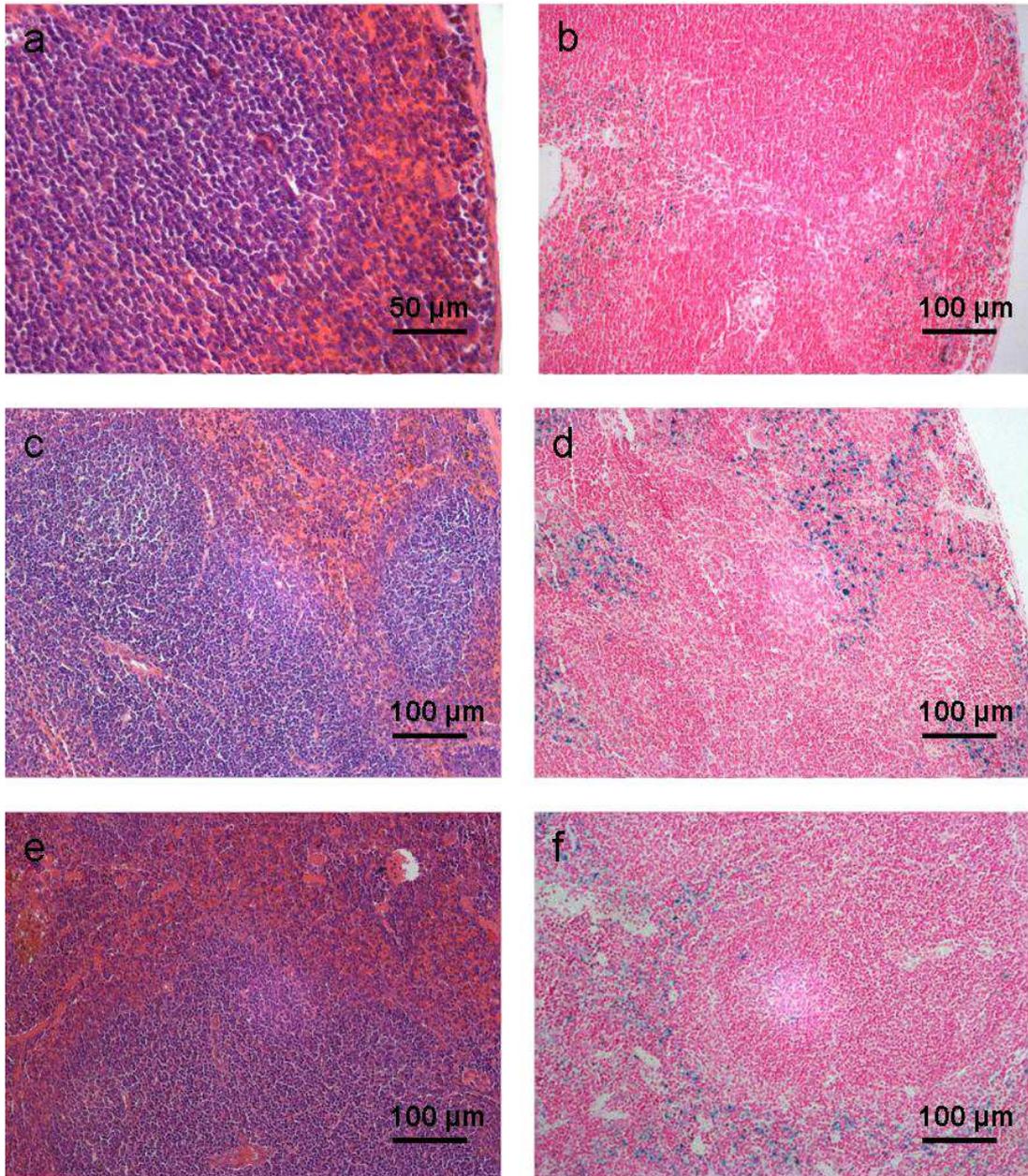
**Figura 17:** Fotomicrografias de pulmões de camundongo tratado com ML-Magh, 15 dias após o tratamento. (a) coloração por método HE; (b) coloração por método de Perls. Setas apontam infiltrados inflamatórios e ausência de NPM de magnetolipossomas aglomeradas.



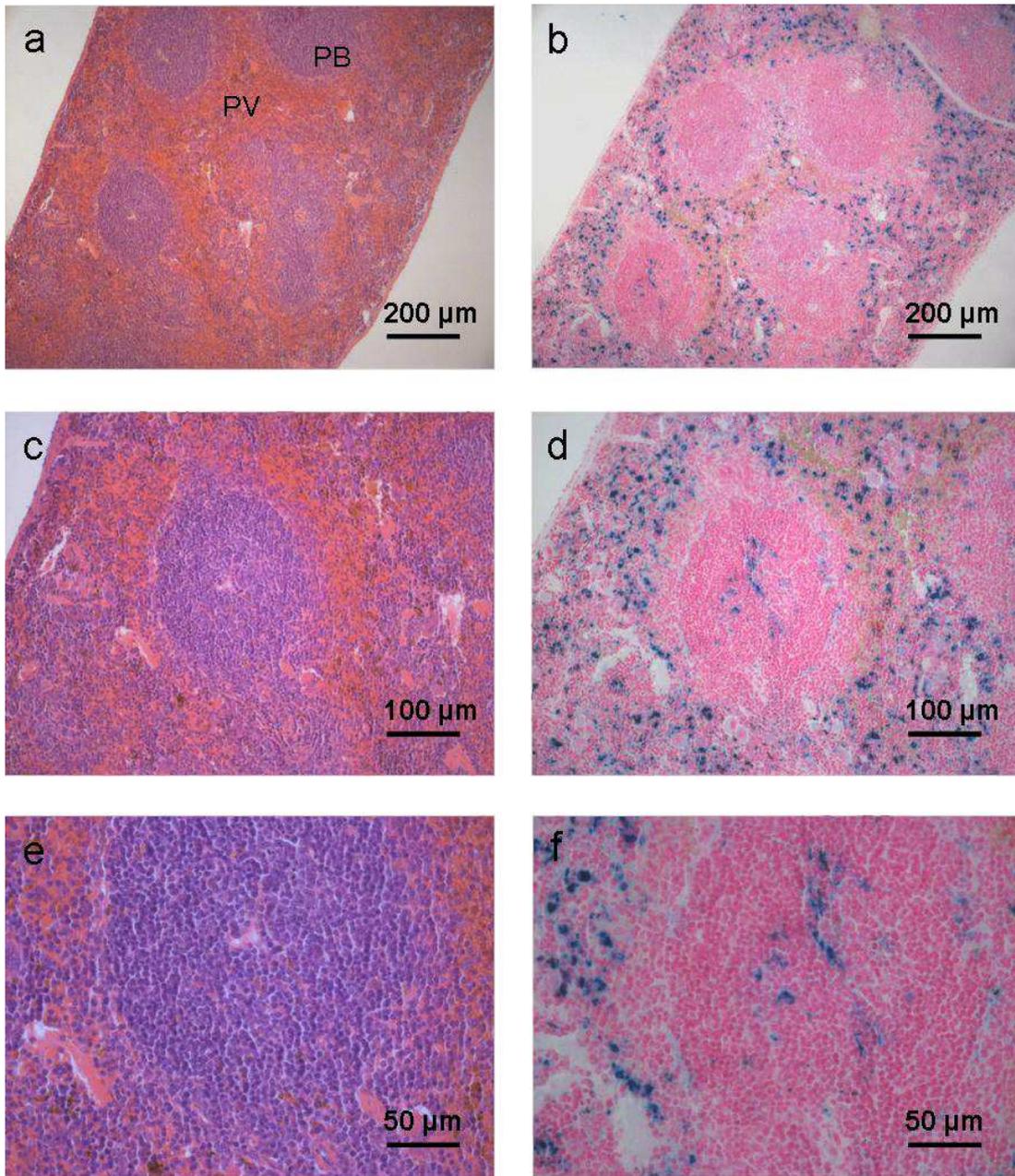
**Figura 18:** Fotomicrografias de fígado de animal controle (a, b) e tratados com ML-Magh (c, d) 1 hora após o tratamento; (e, f) 7 dias após o tratamento. Fotomicrografias indicadas pelas letras a, c, e: coloração por método HE; letras b, d, f: coloração por método de Perls.



**Figura 19:** Fotomicrografias de baço de camundongo representativas do grupo controle. Notar pontos marrons/ azuis (evidenciados por conterem ferro) dispersos pelo tecido. Fotomicrografias indicadas pelas letras a, c, e: coloração por método HE; letras b, d, f: coloração por método de Perls.



**Figura 20:** Fotomicrografias de baço de camundongos tratados com ML-Magh. (a, b) 6 horas após o tratamento; (c, d) 48 horas após o tratamento; (e, f) 15 dias após o tratamento. Notar pontos marrons/ azuis dispersos pelo tecido, evidenciando presença de ferro, porém em quantidade semelhante ao controle. Fotomicrografias indicadas pelas letras a, c, e: coloração por método HE; letras b, d, f: coloração por método de Perls.



**Figura 21:** Fotomicrografias de baço de camundongo tratado com ML-Magh, 24 horas após o tratamento. Notar a grande quantidade de pontos marrons/ azuis dispersos pelo tecido, evidenciando presença de ferro, sugestivo de ser proveniente de NPM de magnetolipossomas aglomeradas. (a) Indicação das regiões de polpa branca (PB) e polpa vermelha (PV) do baço. Fotomicrografias indicadas pelas letras a, c, e: coloração por método HE; letras b, d, f: coloração por método de Perls.

#### 4.8 Ensaios Bioquímicos

Os valores bioquímicos médios dosados a partir do plasma sanguíneo dos camundongos tratados com ML-Magh estão apresentados na **Tabela 4**. Quando comparados ao controle, não houve alterações dos parâmetros em animais tratados, tendo sido verificadas diferenças estatisticamente significativas em apenas quatro situações: aumento de uréia 48h após o tratamento e alterações nos níveis de fosfatase alcalina (FA), que aumentou 48h após o tratamento, diminuiu após 15 dias e voltou a aumentar após 30 dias. Os valores de creatinina e alanina aminotransferase (ALT) não foram alterados pelo tratamento com ML-Magh em nenhum dos momentos avaliados.

**Tabela 4:** Efeito do tratamento com ML-Magh sobre alguns parâmetros bioquímicos de camundongos.

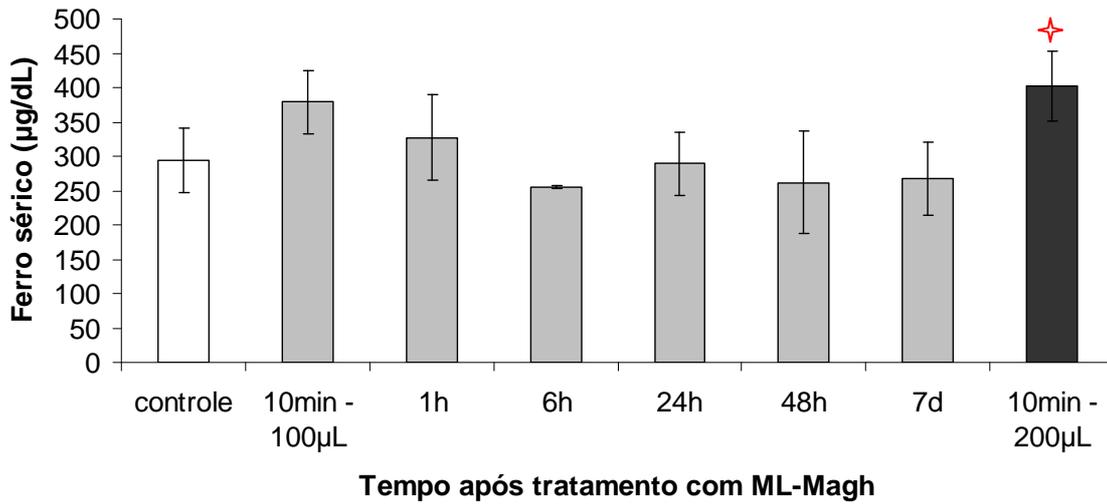
Parâmetros bioquímicos <sup>a</sup>		Tempo após o tratamento							
		1h	6h	12h	24h	48h	7d	15d	30d
Uréia (mg/dL)	PBS	59,33 ± 11,1	64 ± 13	63,33 ± 15	52 ± 3,6	51,66 ± 2	63,66 ± 12,5	50,66 ± 27,3	62,33 ± 7,5
	ML-Magh	56 ± 11,4	60,33 ± 12,8	64,66 ± 17,5	48,83 ± 4,5	60,83 ± 6,7 *	54,33 ± 7,6	64,5 ± 8	72,33 ± 10
Creatinina (mg/dL)	PBS	0,3 ± 0	0,3 ± 0	0,26 ± 0	0,3 ± 0	0,46 ± 0,3	0,3 ± 0	0,3 ± 0	0,23 ± 0
	ML-Magh	0,3 ± 0	0,28 ± 0	0,31 ± 0	0,25 ± 0	0,4 ± 6	0,28 ± 0	0,35 ± 0	0,25 ± 0
ALT (U/L)	PBS	42,66 ± 5,5	75,33 ± 46,8	55,33 ± 19	50,33 ± 6,3	70 ± 23,5	62,66 ± 21,7	71,66 ± 16,2	ai
	ML-Magh	35,5 ± 4,4	43,66 ± 6,5	41,83 ± 8,1	39,16 ± 10	52,83 ± 32,6	235,5 ± 286,5	51,83 ± 14,6	ai
FA (U/L)	PBS	0 ± 0	0,66 ± 1,1	1 ± 1	0,33 ± 0,5	1,33 ± 0,5	0,33 ± 0,5	4,66 ± 0,5	7,33 ± 3
	ML-Magh	0,6 ± 0,8	1 ± 1,5	1 ± 1	0,33 ± 0,8	3,83 ± 2,3 *	0,83 ± 0,7	1,66 ± 0,8 *	13,5 ± 3,9 *

<sup>a</sup> Médias ± desvio-padrão; ALT – Alanina aminotransferase; FA – Fosfatase alcalina; ai – amostra insuficiente de plasma para realização do teste; \* – indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05).

#### 4.9 Medidas do Ferro Sérico

Os níveis de ferro sérico não variaram significativamente em função do tempo decorrido após a administração de 100 µL da amostra ML-Magh (**Figura 22**). Entretanto, níveis significativamente elevados de ferro, em relação ao controle, foram observados 10 minutos após a administração de 200 µL de ML-Magh em um grupo de animais, evidenciando um efeito dose-resposta (**Figura 22**). O grupo controle utilizado neste estudo

apresentou valor médio de ferro sérico de 294  $\mu\text{g/dL}$ , e este foi o valor utilizado para comparar as variações na quantidade de ferro dos animais tratados com ML-Magh em diferentes tempos. Ainda que não tenham sido estatisticamente significativas as variações ao longo do tempo, foi observado um aumento dos níveis de ferro 10 minutos após o tratamento, que decresceram sucessivamente nos demais tempos (**Figura 22**).



**Figura 22:** Níveis de ferro sérico dosados no soro de camundongos após diferentes tempos de tratamento com ML-Magh. ✦ – indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ); note que a dose neste grupo foi de 200  $\mu\text{L}$  de ML-Magh, para os demais grupos, 100  $\mu\text{L}$  de ML-Magh.

## **5. DISCUSSÃO**

Neste trabalho foram investigados efeitos biológicos de uma amostra de magnetolipossomas à base de nanopartículas de maghemita (ML-Magh) por meio de diversos testes de biocompatibilidade. Amostras baseadas em magnetolipossomas apresentam enorme potencial para aplicações biomédicas, o que motivou a realização deste estudo.

### **5.1 Considerações sobre a amostra ML-Magh**

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

O diâmetro é um parâmetro tão importante que revelou em uma série de experimentos toxicológicos que partículas de poli-tetra-flúor-etileno (PTFE) com tamanho de 20 nm foram letais quando inaladas, enquanto as PTFE de 130 nm não produziram qualquer efeito prejudicial no ar respirado (Service, 2003).

Partículas magnéticas à base de maghemita recobertas com citrato constituintes de um fluido magnético (FMCi) apresentaram diâmetro modal de 10 nm (Brugin, 2007). A escolha destas partículas magnéticas para o desenvolvimento da amostra ML-Magh foi feita por diversas razões, várias delas relacionadas ao tamanho das NPM. Partículas muito pequenas, com diâmetro inferior a 4 - 7 nm, podem perder a capacidade de responder ao campo magnético de frequência alternada e conseqüentemente não permitir a elevação da temperatura no local de aplicação, impedindo seu emprego na magnetohipertermia (Ma et al., 2004). NPM com diâmetros na faixa 8 - 15 nm, quando constituídas da mesma composição química e com a mesma cobertura, apresentaram menor toxicidade do que as menores que 8 nm ou maiores do que 15 nm (Lacava, informação pessoal).

Os lipossomas furtivos que encapsularam as NPM do FMCi apresentaram diâmetro modal de 124 nm, portanto muitas vezes maior do que o das NPM que os constituem. Ainda assim, este tamanho muito menor que dos menores capilares do organismo, na faixa de 5 - 6  $\mu$ m (Muller e Keck, 2004), é adequado para aplicações biomédicas, conforme verificado em comparação de lipossomas com 120 nm a outros de tamanhos variados (Romberg et al., 2007). Cabe destacar também que ML-Magh apresenta baixo índice de polidispersão (apenas 0,319), o que permite inferir que é uma amostra com distribuição unimodal de partículas.

O tamanho pode representar uma estratégia de seletividade para atingir apenas o tecido tumoral. As nanopartículas podem ser capazes de penetrar tumores devido à natureza

descontínua ou até mesmo avariada de sua microvasculatura, que tipicamente apresenta poros de 100 a 1000 nm de diâmetro (Hugues, 2005). A microvasculatura de tecidos saudáveis varia de acordo com o tipo de tecido, mas em sua maioria há junções intercelulares justas, de menos de 10 nm. Dessa forma, partículas menores que os poros presentes na vasculatura tumoral e maiores do que os poros de tecidos saudáveis apresentam, provavelmente, tamanhos muito adequados para tratar o câncer (Hugues, 2005).

A carga da superfície das partículas é outro parâmetro que influencia de maneira significativa o comportamento da amostra, interferindo principalmente na estabilidade da suspensão e no tempo de circulação em sistemas vivos. Tem sido demonstrado que partículas neutras ou de carga negativa permanecem mais tempo na circulação e a sua composição e características de superfície têm influência no seu padrão de distribuição, sobretudo devido à ação do sistema fagocitário mononuclear (Lemke et al., 2004). O potencial de carga de superfície (potencial zeta) da amostra ML-Magh revelou que a carga é negativa, pois foi de -24,4 mV, valor próximo ao de outro sistema nanoparticulado que apresentou excelente estabilidade (Santos et al., 2006). O potencial zeta é dado em função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Por ser um indicador útil da carga efetiva nas partículas, esse dado pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões coloidais. Quanto maior o valor absoluto do potencial zeta mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem e essa força supera a tendência natural à agregação (Schaffazick et al., 2003; Instrutécnica, 2007). Esta é, portanto, outra característica interessante da amostra ML-Magh.

A constituição química do núcleo de magnetolipossomas, ou seja, a parte que lhes confere propriedades magnéticas, é um fator importante na determinação da biocompatibilidade de amostras à base de NPM, pois dependendo de sua natureza podem exibir comportamentos significativamente diferentes. Em muitas amostras investigadas, o composto utilizado é a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ou a sua forma oxidada, a maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), que por estar nesta forma, parece ser mais promissora em aplicações biomédicas, uma vez que a possibilidade de desencadear processos oxidativos no organismo é menor (Chatterjee, Haik e Chen, 2003; Tartaj, 2003; Gupta e Gupta, 2005). Amostras de composições diversas exibem comportamentos também variados. Fluidos contendo nanopartículas à base de ferrita de manganês induziram morte, diarreia, genotoxicidade e inflamação severa em camundongos após o tratamento (Lacava et al., 1999a), enquanto NPM à base de ferrita de cobalto (Kückelhaus, 2003), ou de maghemita (Brugin, 2007), ambas recobertas por citrato,

mostraram um leve e temporário efeito inflamatório, sem letalidade aos animais. Neste estudo, ML-Magh não mostrou qualquer efeito prejudicial ao organismo, nas condições experimentais testadas.

A nanotecnologia tem desempenhado papel de destaque na área farmacêutica, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de sistemas coloidais poliméricos, como as suspensões de nanopartículas ou de magnetolipossomas, que buscam maior eficácia dos fármacos pelo aumento de especificidade e redução de toxicidade, assim como o desenvolvimento de liberação modificada. Estes sistemas, entretanto, podem apresentar instabilidade físico-química, caracterizada pela possibilidade de aglomeração das partículas, degradação de polímeros e outras substâncias presentes, contaminação microbiológica e perda da substância ativa encapsulada, durante o armazenamento (Schaffazick et al., 2003).

Os fluidos magnéticos constituídos apenas por NPM recobertas com substâncias biocompatíveis, como citrato e polifosfato, que são abundantes em sistemas vivos, conseguem exibir características desejáveis de biocompatibilidade e estabilidade, o que é atribuído principalmente a estas coberturas. A utilização de uma camada lipossomal associada ao PEG envolvendo as NPM tem potencial de conferir biocompatibilidade e estabilidade ainda maiores que as verificadas para amostras de fluidos magnéticos convencionais, uma vez que sistemas lipossomais acarretam baixo reconhecimento pelo sistema fagocítico mononuclear, e, em condições adequadas, não se aglomeram nem precipitam rapidamente. Desde a primeira descrição dos lipossomas, mais de 40 anos atrás (Bangham, Standish e Watkins, 1965), seu uso em sistemas de entrega de drogas a células ou tecidos específicos tem recebido considerável e merecida atenção.

## **5.2 Considerações sobre a avaliação morfológica das linhagens de células ductais de glândula submandibular humana (HSG) e mesangiais humanas (CM) após tratamento com ML-Magh**

A determinação da biocompatibilidade/ toxicidade de amostras baseadas em nanopartículas depende da realização de um conjunto de testes biológicos procedidos tanto *in vitro* como *in vivo*, e a avaliação da morfologia de linhagens celulares cultivadas na presença de substâncias-teste consiste em uma etapa importante, ainda que preliminar, na determinação de efeitos induzidos por materiais nanoparticulados.

Ao microscópio de luz não foram encontradas alterações morfológicas evidentes em células HSG e CM expostas durante 24h à amostra ML-Magh, o que é um resultado

interessante no que tange ao uso deste material em aplicações biomédicas. Na análise não foi observada a interiorização de magnetolipossomas pelas células, o que pode refletir uma excelente dispersão das partículas em suspensão e ainda uma boa estabilidade de ML-Magh, que não apresentou tendência a precipitar em meio de cultura, tendo sido verificados apenas alguns pontos de coloração marrom entre as células visualizadas, sugestivos de serem magnetolipossomas aglomerados. As observações descritas deverão ser confirmadas, em estudos futuros, por análises ao microscópio eletrônico de transmissão, que além de permitir visualização ultra-estrutural das células, evidencia a interiorização de materiais nanoestruturados, ainda que não estejam aglomerados (Saldanha, 2007).

Possíveis alterações morfológicas induzidas por substâncias colocadas em contato com culturas celulares podem ser tão sutis que se tornam imperceptíveis ao microscópio de luz. Amostra baseada em polímeros de albumina magnéticos induziu danos ao DNA e apoptose em linhagens HSG e CM (verificados por ensaios de viabilidade e teste do cometa) (Saldanha, 2007), contudo, alterações morfológicas indicativas desses processos não se confirmaram ao microscópio de luz, o que é plausível devido ao fato de que as células em fase tardia de apoptose se desprendem das lamínulas, ficam suspensas no meio de cultura e, subseqüentemente, são perdidas nas diversas lavagens necessárias no decorrer da preparação das células para a microscopia de luz (Saldanha, 2007). Por esta razão, resultados *in vitro* sugerindo biocompatibilidade devem ser confirmados por testes *in vivo*.

### **5.3 Considerações sobre os animais tratados com ML-Magh**

Os camundongos utilizados neste estudo foram monitorados diariamente com relação à morbidade e mortalidade. Considerando que efeitos nocivos diversos podem ser observados devido ao uso de substâncias exógenas, observações foram feitas ao longo deste trabalho, incluindo o monitoramento do peso corporal (ganho de peso durante período de tratamento) e a ocorrência de letalidade pós-tratamento. Casos de morbidade (atividade motora diminuída, atonia, surgimento de manchas ou queda de pêlo, pêlos eriçados) não ocorreram. Após administração de ML-Magh, as observações clínicas demonstraram que o tratamento não causou alterações tais como diarreia, hemorragia e vômito. O ganho de peso corporal foi semelhante nos grupos controle e tratado, durante todo o período avaliado, e o tratamento com ML-Magh não causou a morte de nenhum animal.

#### **5.4 Considerações sobre a avaliação da citotoxicidade em células peritoneais – teste de viabilidade celular com Nigrosina (microscopia de luz) e com Iodeto de Propídio (citometria de fluxo)**

A avaliação da viabilidade celular peritoneal após tratamento com substâncias baseadas em NPM é uma ferramenta útil para verificar a ocorrência de toxicidade *in vivo*. Os macrófagos constituem a maioria das células do peritônio e atuam prontamente na resposta a agentes estranhos na cavidade abdominal (Neuhaus e Watson, 2004). Macrófagos são capazes de fagocitar NPM (Lacava et al., 1999b; Guedes, 2005) e o ferro presente nas amostras pode catalisar reações que geram radicais livres, que por sua vez podem causar danos às membranas e ao DNA das células (Emerit, Beaumont, Trivin, 2001), acarretando em morte celular, que resultaria em uma baixa viabilidade após tratamento com NPM. Tal fato foi verificado após administração de NPM de magnetita recobertas com ácido poliaspártico, que são reconhecidas pelo sistema fagocítico mononuclear e acarretaram até 30% de morte celular cinco minutos e sete dias após tratamento intraperitoneal (Sadeghiani, 2004). Camundongos tratados com fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas com carboximetildextrana também sofreram diminuição significativa temporária (15 minutos - 48 horas) da viabilidade dos macrófagos peritoneais (Guedes et al., 2005).

Em trabalho prévio foi mostrado que a viabilidade celular peritoneal de camundongos não alterou quando os animais foram tratados com fluido magnético composto por nanopartículas de maghemita recobertas com citrato (Brugin, 2007), e o mesmo foi observado com a amostra ML-Magh, que contém as mesmas NPM de maghemita recobertas com citrato, porém incluídas em lipossomas e associadas ao PEG. Esse revestimento extra das NPM contidas na amostra ML-Magh garante que seja necessário maior tempo para que sejam reconhecidas pelo sistema fagocítico mononuclear, confere maior estabilidade e dificulta a perda da cobertura, o que favorece a não ocorrência de danos tóxicos que poderiam causar morte celular.

A não toxicidade de ML-Magh para as células peritoneais foi evidenciada, tanto pelo ensaio com Nigrosina e contagem em microscopia de luz, como pelo ensaio utilizando Iodeto de Propídio e citometria de fluxo. A determinação de viabilidade de células utilizando corantes vitais e um microscópio de luz para contagem manual em câmara de Neubauer é comumente utilizada (Sadeghiani, 2004; Guedes, 2005; Brugin, 2007; Portilho-Corrêa, 2007), embora a técnica apresente a limitação de consumir muito tempo do pesquisador. O citômetro de fluxo realiza a análise individual de um número significativo de células e a contagem se dá

de forma automática e muito rápida, por meio de um sistema baseado em um feixe de luz (laser) direcionado a um meio líquido que contém micropartículas (p. ex.: células) em suspensão e que passam em fluxo pelo aparelho; a combinação das detecções de dispersão de luz e de fluorescência permite as análises quantitativas e qualitativas realizadas pelo aparelho (Jaroszeski e Radcliff, 1999). Os testes de viabilidade podem ser baseados na capacidade das células viáveis de excluir o corante, enquanto as inviáveis não o fazem (p.ex.: nigrosina), ou no rompimento da integridade da membrana, que possibilita a penetração de um corante ao qual a célula normalmente é impermeável (p.ex.: azul de tripan). A técnica utilizada em citometria de fluxo consiste em mecanismo semelhante: o iodeto de propídio penetra em células inviáveis devido ao rompimento da membrana celular, e por ser um corante fluorescente, é excitado pelo laser de comprimento de onda de 488 nm (laser azul) e emite uma fluorescência na faixa de 560 - 580 nm, que é detectada pelo canal FL2.

O modelo de Bland & Altman (Bland e Altman, 1999), empregado para evidenciar a concordância entre os dois métodos utilizados na avaliação da viabilidade celular peritoneal, mostrou que as metodologias apresentam resultados muito semelhantes e são, portanto, intercambiáveis. Para que o nível de concordância entre os dados obtidos a partir dos métodos utilizados seja considerado satisfatório, a amplitude entre os limites de concordância, ainda que arbitrariamente determinada, deve ser pequena (Bruton, Conway e Holgate, 2000; Martelli Filho, 2005). A representação gráfica mostra (**Figuras 6 e 7**) que as linhas centrais dos gráficos, que correspondem à diferença média entre as duas séries de medidas em cada tempo, apresentaram valores que não se distanciaram do zero (variaram de -2,2 a 9,9), demonstrando um elevado grau de concordância (se houvesse perfeita concordância entre as medidas, a diferença seria igual a zero). Os pontos (pequenos quadrados) plotados nos gráficos representam as diferenças de cada par de medidas, e como os mesmos se distanciam pouco da linha central, fica evidente a concordância entre as técnicas. Devem ser consideradas também as linhas superior e inferior (tracejadas) dos gráficos, que correspondem às variações existentes nas observações efetuadas, e que em nenhum dos tempos foi considerada muito ampla, posto que os valores encontrados, que chegaram a 18,9 (sete dias após o tratamento), não são significativos em se tratando da porcentagem de células vivas/ mortas.

### **5.5 Considerações sobre a contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos**

A realização de análise citométrica por meio da contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico tem se mostrado um instrumento importante na verificação de

indução de processos inflamatórios ou alérgicos por materiais compostos por NPM (Kückelhaus, 2003; Barbosa, 2004; Sadeghiani, 2004; Brugin, 2007; Portilho-Corrêa, 2007).

O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por numerosos estímulos, tal como a administração de drogas. As várias classes de leucócitos desempenham um papel essencial na inflamação, e cada tipo celular é capaz de realizar atividades bastante específicas em relação à resposta desencadeada pelo organismo. As células avaliadas podem ser classificadas em polimorfonucleares ou granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (linfócitos e monócitos) (Gilman et al., 2001; Rang et al., 2004).

A inflamação aguda é a resposta imediata e inicial a um agente agressor. Uma vez que dois componentes defensivos principais – os anticorpos e leucócitos – são normalmente transportados na corrente sanguínea, é previsível e esperado que fenômenos vasculares desempenhem um papel de destaque na inflamação aguda. Os leucócitos migram ao local ou área inflamada dos tecidos danificados, sendo os granulócitos os primeiros tipos de células a aparecer (revisto por Gilroy et al., 2004), correspondendo, no início, predominantemente a neutrófilos que aderem ao endotélio por meio de moléculas de adesão, migram através do endotélio e atingem a região da agressão sob a influência de agentes quimiotáticos. Assim, após administração de substâncias nanoestruturadas, têm sido observadas variações significativas nas populações leucocitárias, em geral representativas de processo inflamatório brando e temporário e que ocorre de maneira tempo e dose-dependentes (Brugin, 2007; Portilho-Corrêa, 2007).

Neste estudo, a amostra ML-Magh não induziu diferença significativa nas populações de leucócitos quando comparadas ao controle, evidenciando ausência de processo inflamatório induzido de uma hora a trinta dias após o tratamento. Foi verificado aumento estatisticamente significativo de eosinófilos apenas em uma hora após administração de ML-Magh, o que possivelmente não está relacionado à resposta inflamatória, mas que denota um processo alérgico imediato e que não volta a se manifestar em tempos mais longos de exposição aos magnetolipossomas. Eosinófilos são células que fagocitam e eliminam complexos de antígenos com anticorpos que aparecem em casos de alergia. Esses granulócitos são atraídos para as áreas de inflamação alérgica pela histamina produzida principalmente por basófilos e mastócitos (Junqueira e Carneiro, 1999). Há evidências de que os eosinófilos produzem moléculas que inativam leucotrienos e histamina, assim modulando a inflamação. Tanto nas parasitoses como nos casos de alergia, o número de eosinófilos no sangue aumenta (eosinofilia) (Junqueira e Carneiro, 1999). A constatação de que outras populações

leucocitárias não se alteraram em relação ao controle demonstra que a eosinofilia verificada é temporária e pode ter sido essencial em evitar uma resposta exacerbada do organismo diante da administração de ML-Magh.

### **5.6 Considerações sobre a avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade em eritrócitos da medula óssea – teste de micronúcleo e índice de eritrócitos policromáticos**

O teste de micronúcleo consiste em uma técnica muito útil na identificação de substâncias que causam danos citogenéticos (clastogênicos ou aneugênicos), permitindo determinar seu potencial genotóxico. Inicialmente foi desenvolvido para a realização de triagens para identificação de substâncias químicas que são capazes de causar dano ao material genético em nível cromossômico (Schmid, 1975), mas seu uso foi ampliado e ele serve também para monitorar populações expostas a agentes com potencial danoso ao DNA e ainda para avaliar a genotoxicidade de drogas (Krishna e Hayashi, 2000; Norppa, 2003). Neste caso, a substância-teste é administrada a animais em esquema de tratamento sub-agudo e seu efeito é mensurado pela contagem da frequência de eritrócitos micronucleados em esfregaços da medula óssea (Schmid, 1975; Krishna e Hayashi, 2000; Norppa, 2003).

Os MN podem ser constituídos de fragmento cromossômico ou cromossomo inteiro que permanece no citoplasma da célula, e no caso de eritrócitos, permanece mesmo após o núcleo principal da célula ser expelido no processo de maturação (Schmid, 1975). Agentes genotóxicos exercem sua ação sobre todas as células do organismo e a verificação da ocorrência de MN em eritrócitos é um fenômeno que facilita sua identificação e quantificação, uma vez que essa célula é normalmente anucleada (revisto por Krishna e Hayashi, 2000).

A proporção de EPC em relação ao total de eritrócitos normalmente é de 50% (Schmid, 1975) e um desvio significativo nesta proporção indica efeito citotóxico do tratamento. Se um agente é capaz de interferir na proliferação celular na medula óssea, reduzindo a produção de eritrócitos novos, pode-se concluir que tal substância causa mielotoxicidade.

Testes de MN e verificação do índice de EPC são considerados confiáveis e têm sido procedidos com frequência em estudos que verificam efeitos genotóxicos e citotóxicos em animais tratados com materiais baseados em NPM (Freitas et al., 2002; Garcia et al., 2002; Kückelhaus, 2003; Barbosa, 2004; Sadeghiani, 2004; Brugin, 2007; Portilho-Corrêa, 2007).

Neste estudo, foi possível demonstrar ausência de indução de danos genotóxicos por ML-Magh, uma vez que a quantidade de MN a cada 2000 EPC analisados não chegou, em média, a dois. O controle positivo empregado demonstrou a confiabilidade da técnica, pois os animais expostos à ciclofosfamida sofreram significativo aumento na frequência de MN em EPC. Em relação à %EPC, foram verificados valores médios entre 53 e 58% nos grupos tratados com ML-Magh, demonstrando que a amostra não induz citotoxicidade.

### **5.7 Considerações sobre a histologia dos pulmões, fígado e baço**

A escolha em avaliar pulmões, fígado e baço neste estudo foi feita com base no fato de que estes são órgãos de intenso metabolismo ou acúmulo de tecido linfóide, o que permite supor que são essenciais na metabolização e resposta imune aos magnetolipossomas da amostra ML-Magh. Além disso, estudos anteriores revelam que estes órgãos tendem a acumular NPM, em variados tempos após sua administração (Barbosa, 2004; Sadeghiani, 2004; Brugin, 2007; Portilho-Corrêa, 2007).

Os pulmões são altamente vascularizados e com características muito peculiares em relação à sua circulação, exercendo papel importante na hemodinâmica do organismo, auxiliando, por exemplo, na adaptação a mudanças de volume e fluxo sanguíneo. Apresentam também funções metabólicas e esse conjunto de características expressa a importância em avaliar a histopatologia pulmonar após administração intravenosa de ML-Magh. Os resultados mostram que magnetolipossomas tendem a formar poucos agregados nos pulmões, o que pode ser decorrente de sua estabilidade e de uma biodistribuição adequada, além do baixo reconhecimento pelas células fagocitárias deste tecido, que não desenvolveu processos inflamatórios em nenhum momento após administração de ML-Magh, uma vez que os pequenos infiltrados linfocitários observados foram também visualizados nos animais pertencentes ao grupo controle. É provável que essas regiões de tecido linfático façam parte do conjunto conhecido como MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, ou Tecido Linfóide Associado à Mucosa), o qual participa da resposta imunitária do organismo.

O fígado, órgão de intenso metabolismo do organismo, participa não só da biotransformação como também de processos de síntese e armazenamento de diversas substâncias, o que denota seu importante papel e a necessidade em avaliar possíveis alterações em face da administração de magnetolipossomas, o que foi verificado histologicamente neste trabalho. O tecido hepático apresentou-se dentro dos padrões normais nos variados tempos

decorridos após tratamento com ML-Magh e não foram verificados agregados de partículas em nenhum momento.

O baço é um local de intenso acúmulo de tecido linfóide e devido à sua riqueza em células fagocitárias e ao contato íntimo entre o sangue e essas células, representa um importante órgão de defesa do organismo (Junqueira e Carneiro, 1999), além de participar de processos de hematopoiese e hemocaterese. A presença aumentada de agregados de coloração marrom ou azul nos tecidos investigados neste trabalho denota quantidade aumentada de ferro, provavelmente proveniente da amostra ML-Magh administrada. O baço normalmente apresenta esses agregados devido à grande quantidade de ferro do sangue que circula pelo tecido. A quantidade de agregados marrons/ azuis foi considerada aumentada apenas no baço de animais avaliados em 24h, o que pode significar que a amostra está presente em maior concentração neste órgão um dia após o tratamento. Agregados de coloração marrom/ azul apareceram em quantidades similares aos do controle nos demais tempos.

Materiais particulados exógenos podem desencadear injúrias teciduais por meio de um ou mais mecanismos, como pela geração de espécies reativas de oxigênio, danos ao DNA, inflamação, fagocitose pelo sistema fagocítico mononuclear, levando ao acúmulo de material em órgãos como fígado, baço e linfonodos e conseqüente disfunção tecidual (Nel et al., 2006). O estudo de fluido magnético à base de NPM de maghemita recobertas com citrato, após administração em camundongos, ainda que com elevado grau de biocompatibilidade, revelou que o citrato não foi capaz de estabilizar adequadamente as nanopartículas, uma vez que aglomerados foram visualizados ao microscópio de luz nos tecidos pulmonar, hepático, esplênico e renal, indicando que houve perda, no mínimo parcial, da cobertura das NPM, ocasionando sua aglomeração e deposição nos tecidos (Brugin, 2007). É frequente verificar a ocorrência (dose-dependente) de aglomerados de NPM em tecidos como pulmões, fígado e baço de camundongos tratados com diferentes amostras de fluidos magnéticos (Barbosa, 2004; Sadeghiani, 2004; Brugin, 2007; Portilho-Corrêa, 2007), mas este não é um resultado desejável uma vez que o acúmulo de nanopartículas pode desencadear as referidas injúrias teciduais. Quando as NPM de maghemita recobertas com citrato foram condicionadas em lipossomas e associadas ao PEG, dando origem à amostra ML-Magh, características relacionadas à sua estabilidade e capacidade de reconhecimento pelo sistema fagocítico mononuclear foram alteradas, possivelmente melhoradas, resultando em raros achados de aglomerados de nanopartículas nos tecidos analisados, evidenciando boa dispersão das partículas após administração *in vivo*, sem ocorrência de precipitação nos tecidos ou mesmo de intensa fagocitose, o que poderia gerar uma resposta inflamatória indesejada.

Magnetolipossomas contendo NPM de ferrita de cobalto e associadas ao PEG não são rapidamente fagocitadas, por isso permaneceram por mais tempo na circulação quando comparadas a amostras muito semelhantes, como a que não continha PEG e que pôde ser visualizada ao microscópio de luz no parênquima de diversos tecidos, 24h após administração em camundongos (Kückelhaus et al., 2004). Especula-se que ML-Magh distribui-se amplamente pelos tecidos, não se acumulando preferencialmente nos órgãos avaliados. Análises em microscopia eletrônica de transmissão e ainda de ressonância magnética devem ser realizadas a fim de se afirmar de maneira mais conclusiva sobre como os lipossomas de ML-Magh penetram nas células e também sobre como se biodistribuem pelo organismo.

Se as partículas provenientes de ML-Magh (que possivelmente infiltraram em diversos tecidos, ainda que isso não tenha sido visualizado ao microscópio de luz) tivessem potencial para desencadear uma resposta inflamatória, os leucócitos deveriam migrar do sangue ao local ou área inflamada dos tecidos danificados, o que teria resultado em alterações nas contagens global e diferencial de leucócitos, fenômeno não observado neste estudo. Conforme já discutido, os leucócitos migram sob influência de agentes quimiotáticos, e durante a quimiotaxia e a fagocitose, leucócitos ativados podem liberar metabólitos tóxicos e proteases para o meio extracelular e causar lesão tecidual (Cotran et al., 2000). A geração de injúrias ainda que não-infecciosas, nos tecidos, inicia uma resposta inflamatória e alguns sinais, tais como a liberação de citocinas, conduzem ao recrutamento de leucócitos ao local dos danos (Hussain et al., 2003). Infiltrados inflamatórios muito pequenos e na maioria das vezes não associado à presença de nanopartículas foram verificados em alguns cortes histológicos neste estudo, no entanto tais achados definitivamente não foram significativos, tornando possível afirmar que a amostra ML-Magh não induz alterações ou danos teciduais em pulmões, fígado e baço.

## **5.8 Considerações sobre os ensaios bioquímicos**

A depuração de substâncias exógenas administradas no organismo, como fármacos, ocorre, comumente, por via hepática (metabolismo e/ ou excreção na bile) e/ ou renal, sendo comum que a droga inalterada ou seus metabólitos estejam presentes na urina. Em consequência, substâncias tóxicas ao organismo podem causar danos ao fígado e aos rins, o que pode ser monitorado por meio de uma série de exames bioquímicos indicativos do normal funcionamento destes órgãos.

O perfil enzimático hepático foi demonstrado pelos valores séricos de alanina aminotransferase e fosfatase alcalina, que permaneceram, de maneira geral, dentro dos limites normais quando comparados ao controle, indicando que os animais não apresentaram danos hepatobiliares, o que foi confirmado pela ausência de lesões quando o perfil histológico hepático de animais tratados com ML-Magh foi avaliado ao microscópio de luz. Este resultado associado aos resultados normais de alanina aminotransferase em todos os tempos após o tratamento e de fosfatase alcalina nos tempos de 1h, 6h, 12h, 24h e 7 dias, permite inferir que o aumento de fosfatase alcalina sérica em 48h e 30 dias tenha sido provocado por outros fatores, como por exemplo, um breve desequilíbrio mineral. Uma diminuição significativa de fosfatase alcalina ocorreu 15 dias após o tratamento, mas observando os resultados, percebe-se que isso ocorreu devido a um aumento expressivo de fosfatase alcalina nos animais do grupo controle, mais uma vez demonstrando que a variação desse parâmetro pode ser decorrente de outros fatores que não a administração de ML-Magh, que, portanto, não causou alterações hepáticas nos animais.

Em relação aos exames indicativos da função renal, a uréia sérica apresentou-se dentro de valores normais quando comparados ao controle. Apesar de ter havido aumento significativo 48h após administração de ML-Magh, o aumento da uréia não foi concomitante a um aumento significativo de creatinina neste mesmo tempo, e isso deveria ter sido observado caso houvesse comprometimento renal dos animais. Possivelmente, essa foi uma elevação fisiológica e de origem pré-renal, que pode ter decorrido, por exemplo, de uma maior ingestão protéica pelo grupo de animais tratados no período (Kaneko, Harvey e Bruss, 1997). Não houve alterações nos valores séricos de creatinina em relação aos animais do grupo controle em nenhum momento. Diferentemente da uréia, a creatinina não está associada à alimentação do animal; é filtrada e não reabsorvida pelos rins e seus níveis séricos constituem um bom indicativo da função renal. As dosagens de uréia e creatinina séricas, indicadas no controle da função renal, evidenciam que a amostra ML-Magh não causa danos aos rins.

## **5.9 Considerações sobre os níveis séricos de ferro**

O ferro é essencial para a maioria dos organismos vivos pois participa de numerosos processos vitais, desde os processos oxidativos celulares ao transporte de oxigênio para os tecidos. É transportado no sangue pela transferrina e armazenado nos tecidos quando ligado à ferritina. Sua homeostasia é regulada, não pela excreção, mas principalmente pela absorção. A

deficiência de ferro é mais comum que o aumento, e pode ocorrer em conseqüência de suprimento inadequado, aumento da demanda, perda sangüínea ou a combinação destes fatores. O aumento pode se dar em alguns estados patológicos, como cirrose e anemia sideroblástica, estando associado a muitos dos danos observados.

A amostra ML-Magh é constituída por lipossomas contendo nanopartículas de maghemita e sua administração representa um suprimento férrico ao organismo tratado. O excesso desse mineral poderia acarretar estresse oxidativo nas células pela formação excessiva de radicais hidroxilas e superóxido, provocando danos à membrana celular, proteínas e DNA (revisto por Puntarulo, 2005). A determinação do ferro sérico de animais tratados com ML-Magh teve como principal objetivo avaliar se o ferro presente na amostra seria capaz de elevar os níveis séricos deste elemento, que pudesse ser relacionado a processos danosos eventualmente observados em outros testes. Conforme esperado, já que os ensaios biológicos mostraram que ML-Magh não causa citotoxicidade, genotoxicidade, alterações leucométricas nem danos teciduais, o organismo dos animais tratados não sofreu alterações significativas do ferro sérico após o tratamento com 100  $\mu$ L da amostra.

A literatura indica que o valor de referência do ferro sérico para camundongos é em média de 335  $\mu$ g/dL (Kaneko, Harvey e Bruss, 1997), revelando que os animais utilizados neste estudo apresentaram, de maneira geral, níveis séricos inferiores, mesmo após o tratamento com ML-Magh. Para atender à recomendação de que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência (Labtest, 2007), um grupo de animais (n=10) foi empregado para a medição do ferro sérico, tendo sido obtido o valor médio de 294  $\mu$ g/dL, que foi utilizado para comparar as variações na quantidade de ferro dos animais tratados com ML-Magh em diferentes tempos. Foi verificado ainda que o kit utilizado reage com o ferro presente na amostra, o que pode explicar que em tempos de tratamento mais curtos, como 10 minutos e 1 hora, tenha sido verificado aumento do ferro sérico, ainda que não significativo. O nível sérico de ferro aumentou significativamente apenas quando foi administrado o dobro (200  $\mu$ L) da dose usual em um grupo de animais que foi avaliado 10 minutos após essa aplicação, revelando que a amostra está presente na circulação sangüínea e que o ferro proveniente dela pôde ser revelado pelo exame.

O leve aumento dos níveis de ferro, observado em 10 minutos e 1 hora após administração de ML-Magh, permite especular que a amostra está presente na circulação neste momento inicial. Como os níveis séricos de ferro diminuem 6h, 48h e 7 dias após o tratamento, é ainda possível especular que a partir de 6h a amostra penetre em tecidos do organismo, voltando a circular no sangue 24h após o tratamento (leve aumento de ferro, não

significativo). Ainda que as variações de ferro ao longo do tempo não tenham sido significativas, permitem inferir que a amostra ML-Magh circula por um tempo relativamente longo (presença de PEG) pelo organismo, entrando e saindo de tecidos, o que é desejável, uma vez que não causa danos, conforme demonstrado pelos testes realizados neste estudo.

Nanopartículas de óxido de ferro não são consideradas tóxicas e podem eventualmente ser quebradas para formar hemoglobina do sangue (Gupta e Gupta, 2005). É levada em consideração a hipótese de que, após a dissociação do ferro do complexo nanoestruturado que o contém, as partículas exógenas entrem na reserva de ferro endógeno do organismo (Lemke et al., 2004). Sendo assim, os magnetolipossomas de ML-Magh apresentam características interessantes para aplicações *in vivo*. Pode-se ainda citar que a presença das NPM de maghemita confere à amostra uma outra característica interessante, que é o superparamagnetismo, que permite que as partículas respondam magneticamente quando na presença de um campo magnético, mas não retenham esse magnetismo após a remoção do campo, o que explica sua preferência em aplicações biomédicas (Berry e Curtis, 2003; Tartaj et al., 2003; Gupta e Gupta, 2005).

### **5.10 Considerações finais e perspectivas**

Em estudo realizado com NPM à base de maghemita e recobertas com ácido glutâmico, Yan e colaboradores (2005) estudaram células de hepatocarcinoma humano (SMMC-7721) tratadas *in vitro* com variadas doses da referida amostra e submetidas a 60 minutos de campo eletromagnético de frequência alternada (200 kHz). As alterações morfológicas gerais foram avaliadas, mostrando células com características de apoptose (mudança de forma, diminuição de tamanho) e aumento de células necróticas e de fragmentos celulares (sem forma ou bordas bem delimitadas). Somente com observações por MET foi possível constatar as alterações celulares típicas da apoptose: condensação da cromatina, fragmentação nuclear, retração celular, além do grande número de NPM internalizadas nas células tumorais e em organelas (nucléolo e lisossomo).

Testes *in vivo* utilizando camundongos da linhagem BALB/C transplantados com células de hepatocarcinoma humano (SMMC-7721), tratados com diversas doses de NPM à base de maghemita recobertas com ácido glutâmico, e submetidos ao campo magnético para realização da magnetohipertermia mostraram que a diminuição tumoral ocorreu de maneira dose-dependente (Yan et al., 2005). A análise histológica realizada por Yan e colaboradores (2005) revelou o acúmulo de NPM no estroma tumoral e o desaparecimento de células em

locais adjacentes a este acúmulo, além de uma área necrótica ao redor. O estudo considerou que a magnetohipertermia foi capaz de destruir células tumorais sem afetar o tecido normal.

Estes resultados sugerem perspectivas interessantes de estudos futuros com a amostra ML-Magh, cujo tratamento *in vitro* não revelou qualquer alteração morfológica em duas linhagens celulares (CM e HSG). É possível que a avaliação das células por MET revele resultados que o microscópio de luz não foi capaz de mostrar, e ainda, que a associação do tratamento com a utilização de um campo magnético de frequência alternada desencadeie morte celular, evidenciando seu potencial para aplicações na terapia contra o câncer por meio da magnetohipertermia. Testes *in vivo* com animais portadores de tumor também consistem em perspectiva interessante na busca por evidenciar o potencial de ML-Magh na área terapêutica.

Os mecanismos pelos quais as NPM entram nas células também não foram ainda esclarecidos (Yan et al., 2005). Especula-se que as partículas sejam modificadas por ligantes especiais e interiorizadas por meio de receptores, ou que células fagocitárias capturem-nas, ou ainda que possam atravessar a membrana celular por transporte passivo devido ao seu diâmetro pequeno (Yan et al., 2005). Experimentos que investiguem o mecanismo de ação dos magnetolipossomas consistem em excelente perspectiva de continuidade dos trabalhos com ML-Magh.

Durante a fase experimental deste estudo, uma amostra semelhante à ML-Magh, cuja única diferença consistiu na associação de um agente fotossensibilizante aos magnetolipossomas, a zinco-ftalocianina, foi utilizada em um teste-piloto de viabilidade de células peritoneais. A amostra, denominada ML-Magh-ZnF, foi utilizada no seguinte esquema de tratamento: dois grupos de animais (n=3-5) foram divididos em (1) animais tratados via IP com 100µL de ML-Magh-ZnF e avaliados quanto à viabilidade celular (testes com Nigrosina e Iodeto de Propídio) após 24h; (2) animais tratados via IP com 100µL de ML-Magh-ZnF e após 30 minutos, expostos a um sistema laser (BWF Light Source-Tech®) com emissão de luz de comprimento de onda de 670 nm acoplado a uma fibra ótica que opera a uma potência de 80 mW, durante 15 minutos e avaliados após 24h, conforme grupo 1. Os tratamentos foram concomitantes aos dos grupos controle (PBS) e tratado apenas com ML-Magh, que foram avaliados 24h após tratamentos (conforme já descrito), a fim de que os resultados pudessem ser comparados. A viabilidade celular após estes tratamentos não sofreu alteração (foi superior a 95%), revelando a necessidade de desenvolvimento aprimorado de uma metodologia para realização de testes cujo objetivo é o emprego da terapia fotodinâmica em modelos animais. Vários fatores podem ter contribuído para que as células não morressem

após o esquema de tratamento realizado, cuja dose de luz total correspondeu a aproximadamente  $360 \text{ J/cm}^2$ . Sabe-se que o tecido normal pode não acumular substancialmente a droga, e neste caso os efeitos iniciais da TFD requerem doses de luz muito mais altas ( $450 \text{ J/cm}^2$ ) para causar morte celular (Heinrich Walt et al., 2006). No caso da realização da TFD em ratos portadores de tumores ginecológicos (células SC 102), doses de laser entre  $100$  e  $300 \text{ J/cm}^2$  foram suficientes para causar necrose tumoral 72h após aplicação da droga e da luz (Heinrich Walt et al., 2006).

O intervalo entre a administração do fotossensibilizador e a exposição à luz é um fator determinante na eficácia da TFD, e pode ser que este intervalo necessite de ajustes na metodologia empregada. Além disso, fracionar as doses do tratamento, ao invés de tratar com dose única, pode ser crucial na destruição das células tumorais em diferentes estágios do ciclo celular, assim como ocorre com os quimioterápicos. A partir da adoção de diferentes estratégias para aplicação da TFD é possível destruir células tumorais diretamente ou eliminar o tumor por meio do ataque à vasculatura local (Dolmans et al., 2002).

Muitos esforços têm sido empregados no desenvolvimento de novos agentes fotossensíveis. É necessária a criação de novos compostos que absorvam luz em comprimentos de onda maiores (o que facilita a penetração da luz no tecido), compostos com alta seletividade tumoral e baixa fotossensibilidade na pele. Com esta finalidade, muitos agentes têm sido desenvolvidos e testados em pesquisas (Dolmans, Fukumura e Jain, 2003). Um fotossensibilizador ideal deve ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficiente, alvo-seletivo e deve apresentar toxicidade mínima ao tecido normal (Ackroyd et al., 2001). A amostra ML-Magh-ZnF, utilizada em testes preliminares neste estudo, contém zinco-ftalocianina em sua formulação, e as ftalocianinas são compostos que apresentam estrutura similar à hematoporfirina, cujos derivados foram um dos primeiros a serem testados em TFD (Simplicio, Maionchi e Hioka, 2002). Alguns estudos têm mostrado que ftalocianinas apresentam menos reações indesejadas de fotossensibilidade na pele em relação a outros agentes (Ackroyd et al., 2001) e esta é uma das vantagens que explica o interesse em investir nos estudos utilizando tal classe de fotossensibilizadores.

A forma de veicular estes agentes fotossensíveis também é de extrema importância. Em estudo que compara a administração de fotossensibilizador na forma aquosa e lipossomal, foi demonstrado que 24h e 72h após administração das duas preparações, a entrega ao local do tumor foi mais eficiente quando se usava a forma lipossomal (Jori, 1990).

Estudos bem delineados que envolvam metodologias que garantam a distribuição seletiva do fotossensibilizador e o emprego adequado de fontes de luz contribuirão para

melhores perspectivas de uso da TFD contra o câncer e outras doenças (Dolmans, Fukumura e Jain, 2003).

A lacuna entre os conceitos introduzidos pela nanomedicina, os dados experimentais publicados e a realidade clínica é enorme. Futuros experimentos laboratoriais e estudos clínicos terão de revelar precisamente o potencial terapêutico e diagnóstico da nanomedicina (Pison et al., 2006).

Os cientistas acreditam que ainda é cedo para garantir a segurança de nanomateriais em relação à avaliação e caracterização toxicológica e que ainda há poucos dados de segurança até o presente momento. São necessárias abordagens mais aprofundadas para caracterizar os importantes aspectos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção desses materiais (Holsapple et al., 2005).

## **6. CONCLUSÃO**

Considerando que a amostra de magnetolipossomas à base de nanopartículas de maghemita (ML-Magh) investigada neste estudo, por meio de testes *in vitro* e *in vivo* em camundongos, (1) apresenta diâmetro médio (124 nm) e carga de superfície (potencial zeta) (-24,4 mV) negativa, e que estes são parâmetros adequados para garantir estabilidade e segurança na sua administração *in vivo*; (2) não induziu alterações morfológicas nas células HSG ou CM aderidas às lamínulas de vidro, evidenciáveis ao microscópio de luz; (3) não afetou a viabilidade de células peritoneais, conforme verificado pelas análises manual com Nigrosina e automatizada por citometria de fluxo e Iodeto de Propídio; (4) não induziu processo inflamatório, o que foi verificado a partir da contagem de leucócitos do sangue periférico dos camundongos; (5) não induziu efeitos genotóxicos nem citotóxicos, conforme verificado pela contagem de eritrócitos micronucleados e a partir da análise do índice de EPC, respectivamente, em células da medula óssea de camundongos; (6) não acarretou alterações histológicas importantes nos pulmões, fígado e baço, tecidos em que uma quantidade irrelevante de agregados de partículas visíveis ao microscópio de luz foi detectada; (7) não induziu alterações nos parâmetros bioquímicos avaliados – ALT, FA, uréia e creatinina – indicando que não causa danos hepáticos e renais; (8) causou variações significativas na dosagem de ferro sérico apenas quando o dobro da concentração da amostra foi usada, pode-se concluir que apresenta biocompatibilidade adequada, segundo o conjunto de experimentos realizados, e pode futuramente servir como uma alternativa para o diagnóstico e tratamento do câncer.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. **The history of photodetection and photodynamic therapy.** *Photochemistry and Photobiology*, v. 74(5), p. 656–669, 2001.

ALVES, O. L. **Nanotecnologia, nanociências e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas uma questão de tempo.** *Parcerias Estratégicas / CGEE* v. 18, p. 23-39, 2004.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Medicamentos: pesquisa clínica.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>>. Acesso em: 05 jan. 2008.

BANAS, B.; LUCKOW, B.; MÖLLER, M.; KLIER, C.; NELSON, P. J.; SCHADDE, E.; BRIGL, M.; HALEVY, D.; HOLTHÖFER, H.; REINHART, B.; SCHLÖNDORFF, D. **Chemokine and Chemokine Receptor Expression in a Novel Human Mesangial Cell Line.** *J Am Soc Nephrol*, v. 10, p. 2314–2322, 1999.

BANERJEE, R. **Liposomes: applications in medicine.** *Journal of Biomaterials applications*, v. 16, p. 03-21, 2001.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.N.; WATKINS, J.C. **Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids.** *J. Mol. Biol.*, v. 13, p. 238, 1965. In: RONGEN, H. A. H.; BULT, A.; van BENNEKOM, W. P. **Liposomes and immunoassays.** *Journal of Immunological Methods*, v. 204, p. 105-133, 1997.

BARBOSA, L. S. **Avaliação in vivo da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico.** Brasília, 2004. 64f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

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

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

BHAVSAR, M. D.; AMJI, M. M. **Gastrointestinal distribution and in vivo gene transfection studies with nanoparticles-in-microsphere oral system (NiMOS).** *Journal of Controlled Release*, v. 119, p. 339-348, 2007.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. **Measuring agreement in method comparison studies.** *Statistical Methods in Medical Research*, v. 8, p. 135-160, 1999.

BOWN, S. G.; ROGOWSKA, A. Z.; WHITELAW, D. E.; LEES, W. R.; LOVAT, L. B.; RIPLEY, P.; JONES, L.; WYLD, P.; GILLAMS, A.; HATFIELD, A. W. R. **Photodynamic therapy for cancer of the pancreas.** *Gut*, v. 50, p. 549–557, 2002.

BRUGIN, A. **Avaliação da biocompatibilidade/ toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss.** Brasília, 2007, 86f. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.

BRUTON, A.; CONWAY, J. H.; HOLGATE, S. T. **Reliability: what is it and how is it measured?** *Physiotherapy*, v. 86(2), p. 94-99, 2000.

CARAGLIA, M.; ADDEO, R.; COSTANZO, R.; MONTELLA, L.; FAIOLA, V.; MARRA, M.; ABBRUZZESE, A.; PALMIERI, G.; BUDILLON, A.; GRILLONE, F.; VENUTA, S.; TAGLIAFERRI, P.; DEL PRETE, S. **Phase II study of temozolomide plus pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of brain metastases from solid tumours.** *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 57, p. 34–39, 2006.

CHATTERJEE, J.; HAIK, Y.; CHEN, C. **Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 257, p 113-118, 2003.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins - patologia estrutural e funcional.** 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1251, 2000.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. **Photodynamic therapy for cancer.** *Nature Reviews Cancer*, v. 3, p. 380-387, 2003.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; KADAMBI, A.; HILL, J. S.; FLORES, K. R.; GERBER, J. N.; WALKER, J. P.; RINKES, I. H. M. B.; JAIN, R. K.; FUKUMURA, D. **Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy.** *Cancer Research*, v. 62, p. 4289–4294, 2002.

DONG, Y.; FENG, S. **In vitro and in vivo evaluation of methoxy polyethylene glycol–poly(lactide) (MPEG–PLA) nanoparticles for small-molecule drug chemotherapy.** *Biomaterials*, v. 28, p. 4154–4160, 2007.

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

FERRARIO, A.; von TIEHL, K. F.; RUCKER, N.; SCHWARZ, M. A.; GILL, P. S.; GOMER, C. J. **Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma.** *Cancer Research*, v. 60, p. 4066–4069, 2000.

FREITAS, M. L. L.; SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; GARCIA, V. A. P.; LACAVA, L. M.; GRISOLIA, 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.

FREITAS, M. L. L.. **Toxicidade de fluido magnético à base e partículas de magnetita recobertas por ácido dodecanóico e álcool etoxilado: alterações genéticas e morfológicas.** Brasília, 2000, 93 f. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.

FREITAS, R. A. Jr. **What is nanomedicine?** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 1, p. 2–9, 2005.

GAO, D.; AGAYAN, R. R.; XU, H.; PHILBERT, M. A.; KOPELMAN, R. **Nanoparticles for two-photon photodynamic therapy in living cells.** *Nano Letters*, v. 6(11), p. 2383–2386, 2006.

GARCIA, V. A. P.; LACAVA, L. M.; KUCKELHAUS, S.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C.; DE CUYPER, M.; LACAVA, Z. G. M. **Magnetoliposomes: evaluation by cytometry and micronucleus test.** *European Cells & Materials Journal*, v. 3, p. 154–155, 2002.

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 10ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.1330–1340, 2001.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. **Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 401–416, 2004.

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

GUEDES, M. H. A. **Desenvolvimento de um novo sistema de magnetohipertermia para tratamento do câncer e seus efeitos em camundongos.** Brasília, 2005, 139f. Tese de Doutorado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.

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

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

HARISINGHANI, M. G.; BARENTSZ, J.; HAHN, P. F.; DESERNO, W. M.; TABATABAEI, S.; VAN DE KAA, C. H.; DE LA ROSETTE, J.; WEISSLEDER, R. **Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer.** *The New England Journal of Medicine*, v. 348, p. 2491-2499, 2003.

HERR, J. K.; SMITH, J. E.; MEDLEY, C. D.; SHANGGUAN, D.; TAN, W. **Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells.** *Analytical Chemistry*, v. 78(9), p. 2918-2924, 2006.

HODENIUS, M.; DE CUYPER, M.; DESENDER, L.; MULLER-SCHULTE, D.; STEIGEL, A.; LUEKEN, H. **Biotinylated Stealth<sup>®</sup> magnetoliposomes** *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 120, p. 75-85, 2002.

HOLSAPPLE, M. P.; FARLAND, W. H.; LANDRY, T. D.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; CARTER, J. M.; WALKER, N. J.; THOMAS, K. V. **Research strategies for safety evaluation of nanomaterials part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs.** *Toxicological Sciences*, v. 88(1), p. 12-17, 2005.

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

HULLMANN, A.; MEYER, M. **Publications and patents in nanotechnology: an overview of previous studies and the state of the art.** *Scientometrics*, v. 58(3), p. 507-527, 2003.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. **Radical causes of cancer.** *Nature Reviews Cancer*, v. 3, p. 276 - 285, 2003.

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, p. 1038-1044, 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(25), p. 6019-6026, 2005.

INSTRUTÉCNICA – Instrumentação técnica para indústria. **Potencial zeta e estabilidade coloidal.** Disponível em: <<http://www.instrutec.com.br/v2/represen/bic/teoriazeta.html>>. Acesso em: 05 out. 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **World Cancer Report.** (eds Stewart, B. W.; Kleihues, P.). 351p. IARC Press, Lyon, 2003. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=6YF9DWHieo8C&vq=World+Cancer+Report>>. Acesso em: 10 dez. 2007.

JAROSZESKI, M. J.; RADCLIFF, G. **Fundamentals of flow cytometry.** *Molecular Biotechnology*, v. 11 (1), p. 37-53, 1999.

JORI G. **Factors controlling the selectivity and efficiency of tumor damage in photodynamic therapy.** *Lasers in Medical Science*, v. 5, p. 115–120, 1990.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.192, 1999.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals.** 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997.

KNEZ, M.; GÖSELE, U. **Viruses show their good side.** *Nature Nanotechnology* v. 1, p. 22, 2006.

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

KÜCKELHAUS, S. A. S. **Avaliação biológica de materiais magnéticos à base de ferrita de cobalto desenvolvidos para tratamento alternativo do câncer.** Brasília, 2003, 133f. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal, Universidade de Brasília.

KÜCKELHAUS, S.; REIS, S. C.; CARNEIRO, M. F.; TEDESCO, A. C.; OLIVEIRA, D. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B.; LACAVAL, Z. G. M. **In vivo investigation of cobalt ferrite-based magnetic fluid and magnetoliposomes using morphological tests.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 272–276, p. 2402–2403, 2004.

LABTEST. Publicações Técnicas. Disponível em: <<http://www.labtest.com.br>>. Acesso em: 03 dez. 2007.

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

LACAVAL, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; LACAVAL, 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, 1999a.

LACAVAL, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MARTINS, E. V.; LACAVAL, L. M.; FREITAS, M. L. L.; GARCIA, V. A. P.; REBULA, 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, 1999b.

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

LAVERTU, M.; MÉTHOT, S.; TRAN-KHANH, N.; BUSCHMANN, M. D. **High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation.** Biomaterials, v. 27, p. 4815–4824, 2006.

LEMKE, A. J.; VON PILSACH, M. I. S.; LÜBBE, A.; BERGEMANN, C.; RIESS, H.; FELIX, R. **MRI after magnetic drug targeting in patients with advanced solid malignant tumors.** Eur Radiol, v. 14, p. 1949–1955, 2004.

MA, M.; WU, Y.; ZHOU, J.; SUN, Y.; ZHANG, Y.; GU, N. **Size dependence of specific power absorption of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles in AC magnetic field.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 268, p. 33–39, 2004.

MARTELLI FILHO, J. A.; MALTAGLIATI, L. A.; TREVISAN, F.; GIL, C. T. L. A. **Novo método estatístico para análise da reprodutibilidade** R Dental Press Ortodon Ortop Facial, v. 10(5), p. 122-129, 2005.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. **Nanociências e Nanotecnologia**. Parcerias Estratégicas / CGEE v. 18, p. 09-21, 2004.

MULLER, R. H.; KECK, C. M. **Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles**. Journal of Biotechnology, v. 113, p. 151–170, 2004.

NEILSEN, O. S.; HORSMAN, M.; OVERGAARD, J. **A future hyperthermia in cancer treatment?** European Journal of Cancer, v. 37, p. 1587–1589, 2001.

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

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

NORPPA, H.; FALCK, G. C. M. **What human micronuclei contain?** Mutagenesis, v. 18(3), p. 221-233, 2003.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. **Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles**. Environmental Health Perspectives, v. 13(7), p.823-839, 2005.

OLIVEIRA, D. M.; LACAVA, Z. G. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. **Zinc phthalocyanine/ magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment**. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 6, p. 2432–2437, 2006.

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

PORTILHO-CORRÊA, F.A. **Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos**. Brasília, 2007, 74f. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.

PUNTARULO, S. **Iron, oxidative stress and human health**. Molecular Aspects of Medicine, v. 26, p. 299–312, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p.789-809, 2004.

RIBEIRO, L.R. **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo**. In: Mutagênese Ambiental (Eds RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.) Editora ULBRA, p. 173-200, 2003.

ROMBERG, B.; OUSSOREN, C.; SNEL, C. J.; HENNINK, W. E.; STORM, G. **Effect of Liposome Characteristics and Dose on the Pharmacokinetics of Liposomes Coated with Poly(amino acid)s**. *Pharmaceutical Research*, v. 24 (12), p. 2394-2401, 2007.

ROTHENBERG, M. L.; CARBONE, D. P.; JOHNSON, D. H. **Improving the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities**. *Nature Reviews Cancer*, v.3, p. 303-309, 2003.

SADEGHIANI, N. **Avaliação in vivo da biocompatibilidade/ toxicidade e biodistribuição de fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico**. Brasília, 2004. 90f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

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

SALDANHA, C. A. **Avaliação in vitro da citotoxicidade e genotoxicidade dos polímeros de albumina magnéticos**. Brasília, 2007, 58f. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal, Universidade de Brasília.

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

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

SCHEU, M.; VEEFKIND, V.; VERBANDT, Y.; MOLINA GALAN, E.; ABSALOM, R.; FORSTER, W. **Mapping nanotechnology patents: The EPO approach**. *World Patent Information*, v. 28, p. 204–211, 2006.

SCHMID, W. **The micronucleus test.** Mutation Research, v. 31, p. 9-15, 1975.

SENGUPTA, S.; EAVARONE, D.; CAPILA, I.; ZHAO, G.; WATSON, N.; KIZILTEPE, T.; SASISEKHARAN, R. **Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system.** Nature, v. 436, p. 568-572, 2005.

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

SESTIER, C.; LACAVA, Z. G. M.; LACAVA, L. M.; DA SILVA, M. F.; AZEVEDO, R. B.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P. C.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; SABOLOVIC, D. **In vitro toxicity of magnetic fluids evaluated for macrophage cell lines.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 252, p. 403-405, 2002.

SHIRASUNA, K.; SATO, M.; MIYAZAKI, T. **A Neoplastic Epithelial Duct Cell Line Established from an Irradiated Human Salivary Gland.** Cancer, v. 48, p. 745-752, 1981.

SILVA, C. G. **Nanotecnologia: o desafio nacional.** Parcerias Estratégicas / CGEE v. 18, p. 05-08, 2004.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. **Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos.** Química Nova, v. 25(5), p. 801-807, 2002.

STEINKAMP, J. A.; LEHNERT, B. E.; LEHNERT, N. M. **Discrimination of damage/dead cells by propidium iodide uptake in immunofluorescently labeled populations analyzed by phase-sensitive flow cytometry.** Journal of Immunological Methods, v. 226, p. 59 -70, 1999.

TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S. GONZÁLEZ-CARREÑO, T; SERNA, C. J. **The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine.** Journal Physic D: Applied Physic, v. 36, p. R182-R197, 2003.

TOMA, H. E. **Ética e humanismo em nanotecnologia.** Parcerias Estratégicas / CGEE v. 18, p. 87-97, 2004.

WALT, H.; NAP, M.; DORWARD, A. M.; LEERS, M. P. G.; TENNENT, B. J.; VARGA, Z.; STALLMACH, T.; BJÖRKLUND, V.; BEAMER, W. G. **Early apoptotic responses in transgenic mouse mammary carcinoma for photodynamic therapy.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 3, p. 227-233, 2006.

YAN, S.; ZHANG, D.; GU, N.; ZHENG, J.; DING, A.; WANG, Z.; XING, B.; MA, M.; ZHANG, Y. **Therapeutic effect of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles combined with magnetic fluid hyperthermia on cultured liver cancer cells and xenograft liver cancers.** Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 5, p. 1185-1192, 2005.

YUN, Y.; DONG, Z.; SHANOV, V.; HEINEMAN, W. R.; HALSALL, H. B.; BHATTACHARYA, A.; CONFORTI, L.; NARAYAN, R. K.; BALL, W. S.; SCHULZ, M. J. **Nanotube electrodes and biosensors.** Nanotoday, v. 2(6), p. 30-37, 2007.

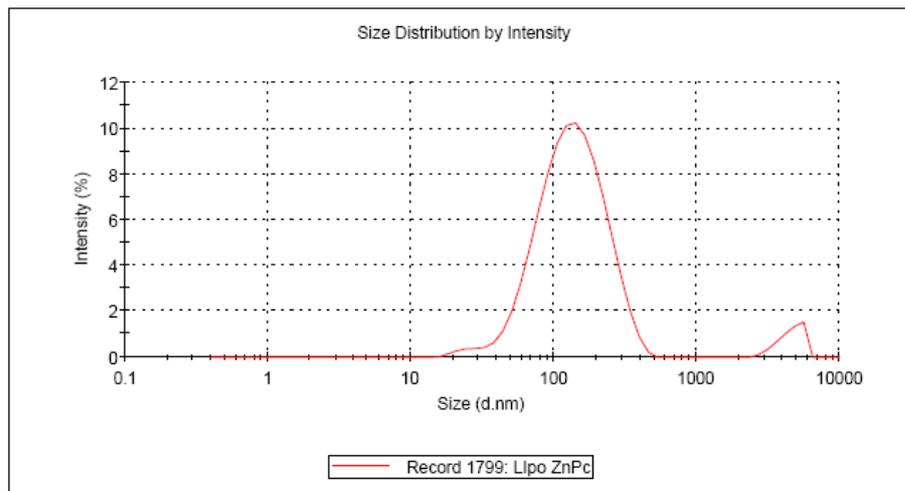


**Anexo 1:** Representações gráficas mostrando medidas (A) de tamanho das partículas (lipossomas) e (B) do potencial de carga da superfície (potencial zeta).

### (A) Size Distribution Report by Intensity

#### Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
<b>Z-Average (d.nm):</b> 124	<b>Peak 1:</b> 147	94,9	75,7
<b>Pdi:</b> 0,319	<b>Peak 2:</b> 4570	5,1	843
<b>Intercept:</b> 0,904	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00



### (B) Zeta Potential Report

#### Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> -24,4	<b>Peak 1:</b> -24,4	100,0	19,3
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 19,3	<b>Peak 2:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 1,72	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00

