

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

**AVALIAÇÃO DA BIOCMPATIBILIDADE DA
ANFOTERICINA B EM DUAS FORMULAÇÕES: LIVRE
E ASSOCIADA COM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS**

DANIELLE LIMA GUEDES PEIXOTO

Brasília – DF

2008

DANIELLE LIMA GUEDES PEIXOTO

**AVALIAÇÃO DA BIOCMPATIBILIDADE DA
ANFOTERICINA B EM DUAS FORMULAÇÕES: LIVRE
E ASSOCIADA COM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

**Brasília – DF
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

P379a

Peixoto, Danielle Lima Guedes

Avaliação da biocompatibilidade da Anfotericina B em duas formulações: livre e associada com nanopartículas magnéticas / Danielle Lima Guedes Peixoto. – Brasília, 2008.

114 p. : il.

Tese (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

1. Fluido magnético I. Título

CDU 538.22(043)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus e Nossa Senhora por todas as graças, pelos momentos vividos, oportunidades, por tudo. Obrigada Senhor!

À minha família que eu amo muito. Ao meu esposo, Marcelo, pelo amor, compreensão nos momentos de ausência e companhia durante todo o mestrado, principalmente durante os experimentos nos finais de semana. À minha mãe, Vanes, por todo incentivo e amor. Ao meu pai, Sebastião, meus irmãos Daniel e Renata (obrigada pela ajuda durante a normalização), minha cunhada, Neusa e sobrinho, João Pedro. Aos meus sogros, João e Lourdes. Agradeço por acreditarem em mim. À Dalva, que tem cuidado de mim com tanto carinho.

À minha orientadora, Zulmira Lacava, pela oportunidade, pelos ensinamentos e compreensão.

À Júlia Poubel, minha grande amiga, pelo carinho, ensinamentos e por tudo que passamos juntas. Amo muito você! À Lane, Luciana, Flávia, Adriana, Mary-ann, Camila e Neda, pela ajuda durante os experimentos, pela companhia e amizade. Aos alunos de PIBIC, estagiários e colegas do laboratório de Genética, Arthur, Mila, Carol, Penha, Cassinha e Belim. À Eliza por toda ajuda e carinho. Aos colegas do laboratório de Morfologia, Graziella, Carol, Sasha, Djalma e Patrícia. À Débora e Marcella, por todos os ensinamentos e amizade. Ao André e Luciano, do projeto Pbmicose, pela ajuda.

À Izabel Cristina por ensinar a análise estatística, com tanta paciência e dedicação.

Agradeço a professora Anamélia, Andréa e Júlio por terem cedido a anfotericina B para a realização desse experimento.

Aos professores César Grisólia, Nazaré Klatau e Silviene Fabiana. À professora Giane Paludo e suas alunas Marta e Tatiana pela realização dos exames bioquímicos no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário. À professora Mônica Garcia, pela grande ajuda na análise das lâminas histológicas e aos professores do projeto Pbmicose Ricardo Titze, Sueli, Paulo César, Ricardo Bentes e Anamélia.

Agradeço ao professor Antônio Cláudio Tedesco e seus alunos Andreza e Fernando, por terem sintetizado e gentilmente cedido as amostras durante todo o trabalho.

Ao CNPq, FINATEC, CNANO e Rede de Nanobiomagnetismo (CNPq/MCT), agradeço pelos incentivos que viabilizaram esse trabalho.

RESUMO

Os materiais magnéticos têm despertado crescente interesse na área biomédica. Dentre eles, fluidos magnéticos (FM) ou magnetolipossomas (ML) constituídos a partir de nanopartículas magnéticas (NPM) têm sido propostos como carreadores de drogas, para separação de células, diagnóstico *in vitro* ou *in vivo* e para o tratamento de diversas patologias, entre as quais a Pbmicose, doença com acometimento pulmonar grave. A anfotericina B é um antifúngico útil no tratamento da Pbmicose, mas gera nefrotoxicidade e requer longo período de tratamento, fatores que levam o paciente a interromper o tratamento. NPM recobertas com ácido dimercaptossuccínico (DMSA) tendem a se acumular no pulmão, e foram associadas com a Anfotericina B (FM-AnfoB), para constituir um sistema carreador do fármaco para o pulmão e tratamento da Pbmicose, minimizando os graves efeitos colaterais da Anfotericina B livre (AnfoB). FM-AnfoB apresenta também um sistema de liberação controlada para diminuir o número de injeções administradas no tratamento. Este trabalho teve como objetivo avaliar a bicompatibilidade/toxicidade da amostra FM-AnfoB e compará-la aos da AnfoB. O experimento foi realizado de 12 horas até 80 dias de tratamento com FM-AnfoB, AnfoB e tampão PBS, como controle. As amostras não induziram alterações no peso corpóreo. FM-AnfoB causou menos estresse, mas mudanças comportamentais e morte após 70 dias. A análise citométrica mostrou que ambas amostras induziram pequenas e temporárias alterações nas populações leucocitárias do sangue e do peritônio, mas FM-AnfoB causou leucopenia mais branda que AnfoB. As amostras não causaram alterações nos níveis enzimáticos que indiquem hepato ou nefrotoxicidade. No tratamento de maior duração, AnfoB gerou alterações nos níveis séricos da enzima alanina amino transferase, sugerindo que o tratamento mais longo pode ocasionar danos hepáticos. O teste de exclusão de nigrosina mostrou que a viabilidade das células peritoneais foi pouca afetada pelos tratamentos. O único valor menor que 90% foi visto no tratamento por 80 dias com FM-AnfoB. O teste de micronúcleo mostrou que AnfoB causou genotoxicidade tanto em EPC quanto em ENC, enquanto o mesmo não foi observado com FM-AnfoB e também que só FM-AnfoB causou citotoxicidade nas células da medula óssea, tanto no início quanto no final do experimento. A análise histológica mostrou aglomerados de nanopartículas no fígado, baço e pulmão, ausência de danos no baço, processos inflamatórios mais severos nos rins e fígado pela amostra AnfoB, espessamento maior das paredes alveolares pela amostra FM-AnfoB e direcionamento preferencial das NPM para os pulmões. Os resultados foram particularmente especiais porque mostraram ser plausível a aplicação de até 23 injeções de FM-AnfoB sem efeitos severos. Em conclusão, amostra FM-AnfoB é biocompatível, órgão específica pode ser usado como carreador da anfotericina B, visando o tratamento da Pbmicose diminuindo, em muitas circunstâncias, os efeitos colaterais da anfotericina B livre, evidenciando os benefícios dos fármacos nanoestruturados.

Palavra-Chave: Nanotecnologia, nanotoxicologia, sistema de entrega de droga, nanopartículas magnéticas e Anfotericina B.

ABSTRACT

Magnetic materials present an increasing interest in the biomedical area. Among them, magnetic fluids (FM) and magnetoliposomes (ML) are constituted by magnetic nanoparticles (NPMs) and have been proposed as drug carriers, for cells separation process, *in vitro* and *in vivo* diagnosis, and also for the treatment of several pathologies, such as Paracoccidioidomycosis (PCM), a disease with severe pulmonary injuries. Amphotericin B is a useful drug for the treatment of PCM, but it induces nephrotoxicity and needs a very long time treatment. These facts are responsible for the patient treatment interruption. NPMs coated with dimercaptosuccinic acid (DMSA) tend to accumulate in the lungs. These NPM sample were associated with Amphotericin B (FM-AnfoB) to constitute a drug carrier system to the lungs able to treat PCM with less severe collateral effects than the free Amphotericin B (AnfoB). FM-AnfoB also presents a controlled liberation system that decreases the necessary number of injections administered in the treatment. This work had the aim of evaluating the biocompatibility/toxicity of the sample FM-AnfoB. Further, it also intended to compare the FM-AnfoB and AnfoB effects. Experiments were performed from 12 hours until 80 days after treatment with FM-AnfoB, AnfoB, or PBS, as control. Samples did not induce alterations in the body weight. FM-AnfoB caused less stress, but death after 70 days treatment. Cytometry analysis showed that both samples induced few and temporary alterations in both blood and peritoneum leucocyte populations. However, FM-AnfoB caused slighter leucopeny than AnfoB. Samples did not cause alterations in the blood enzyme levels that could indicate hepatotoxicity or nephrotoxicity. In the longer treatment, AnfoB induced changes in the serum levels of enzyme alanin amino transferase, suggestin that longer treatment may induce hepatic damage. The nigrosin exclusion test showed that the viability of peritoneal cells was slightly affected by the treatments. The only value less than 90% was seen in the 80 days treatment with FM-AnfoB. Micronucleus test showed that AnfoB caused genotoxicity in both polychromatic and normochromatic erythrocytes. However, FM-AnfoB did not present this effect. However FM-AnfoB was the only to induce cytotoxicity to bone marrow cells, at the beginning and at the end of the experiment. Histology analysis showed NPM clusters in the liver, spleen and lungs, no damage to the spleen, more severe inflammatory process in the livers and kidney of AnfoB treated animals, more enlargements of alveolar walls by the FM-AnfoB sample, and also preferential target of NPM to the lungs. Results were particularly special because evidenced that is possible to administrate until 23 injections of FM-AnfoB without severe effects. In conclusion, the FM-AnfoB sample is biocompatible, organ-specific, and may be used as an Amphotericin B carrier. Further it can perform the PCM treatment decreasing the observed colateral effects of the free Amphotericin B, thus evidencing the great potencial of nanostructured drugs.

Key words - Nanotechnology, nanotoxicology, drug delivery system, magnetic nanoparticle, and anphotericin B.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AnfoB	Anfotericina B livre
DMSA	Ácido dimercaptossuccínico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENC	Eritrócitos normocromáticos
EPC	Eritrócitos policromáticos
FA	Fosfatase alcalina
FM	Fluido magnético
FM-AnfoB	FM à base de nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA e associadas à Anfotericina B
GGT	Gama-glutamiltransferase
HVET	Hospital Veterinário da Universidade de Brasília
MALT	Tecido Linfóide Associado à Mucosa
ML	Magnetolipossomas
MN	Micronúcleo
NPM	Nanopartículas magnéticas
PBS	Solução salina tamponada por fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Nanotecnologia	12
1.2 Nanotoxicologia	12
1.3 Sistema de entrega de droga	13
1.4 Paracoccidioidomicose	16
1.5 Anfotericina B	17
2 OBJETIVO	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Amostra	22
3.1.1 Anfotericina B	22
3.1.2 Material magnético	22
3.2 Animais	22
3.3 Tratamentos	23
3.4 Contagem global	24
3.5 Contagem diferencial das células do sangue periférico	25
3.6 Exames bioquímicos	25
3.7 Contagem diferencial das células peritoneais	26
3.8 Viabilidade de Células peritoneais	26
3.9 Ensaio de micronúcleo	27
3.10 Análise Histológica	28
3.11 Análise Estatística	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Análise dos aspectos clínicos e peso corporal dos animais tratados	31
4.2 Análise Citométrica	31
4.2.1 Contagem Global de Leucócitos	31
4.2.2 Neutrófilos	33
4.2.3 Eosinófilos	34
4.2.4 Linfócitos	34

4.2.5 Monócitos	36
4.2.6 Basófilos	37
4.3 Exames bioquímicos	38
4.3.1 Alanina Amino Transferase (ALT/GPT)	38
4.3.2 Fosfatase Alcalina (FA)	39
4.3.3 Gama GT (GGT)	41
4.3.4 Uréia sérica	42
4.3.5 Creatinina sérica	43
4.4 Contagem Diferencial de Células Peritoneais	44
4.4.1 Neutrófilos	44
4.4.2 Eosinófilos	46
4.4.3 Linfócitos	47
4.4.4 Macrófagos	48
4.4.5 Basófilos	50
4.5 Viabilidade de células peritoneais	51
4.6 Ensaio de micronúcleo	53
4.6.1 Avaliação da genotoxicidade de AnfoB e FM-AnfoB	54
4.6.2 Avaliação da citotoxicidade de AnfoB e FM-AnfoB	56
4.7 Análise Histológica	57
4.7.1 Rim	58
4.7.2 Baço	66
4.7.3 Fígado	71
4.7.4 Pulmão	77
5 DISCUSSÃO	82
5.1 Considerações sobre a amostra e o tratamento	83
5.2 Considerações sobre a análise citométrica	85
5.3 Considerações sobre os exames bioquímicos	87
5.4 Considerações sobre a contagem diferencial de células peritoneais	91
5.5 Considerações sobre a viabilidade de células peritoneais	92
5.6 Considerações sobre o ensaio de micronúcleo	93
5.7 Considerações sobre a análise histológica	95

6 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS	100
ANEXOS	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia, muitas vezes descrita como uma revolução tecnológica, combina alto investimento, rápido progresso científico, altas recompensas financeiras [2] e comercialização exponencialmente crescente, tendo assim um impacto significativo na sociedade nas próximas décadas [1]. Permite a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas em escala nanométrica, possibilitando o controle de estruturas a nível molecular pela manipulação átomo por átomo, com habilidade e precisão. O prefixo “nano” significa a bilionésima parte de algo e se refere usualmente a estruturas com tamanho menor que 100nm [2-6]. Nanopartículas estão contidas em produtos cosméticos disponibilizados pelo mercado farmacêutico, estão presentes na composição de diversos produtos de limpeza, na produção de espelhos e paredes exteriores [6]. Podem, na verdade, ser aplicadas nas mais diversas áreas como, informática, engenharia, física, química e biologia.

Apesar da multidisciplinaridade da nanotecnologia, a área de pesquisa com crescimento mais expressivo é a da ciências da vida [2], sendo então conhecida pelo termo nanobiotecnologia [7]. A nanobiotecnologia possibilita múltiplos usos, como os sistemas de entrega de droga, direcionamento específico a uma determinada célula, diagnóstico e tratamento de doenças, sendo desta forma, promissora nas aplicações clínicas [4, 8]. No diagnóstico, poderá prover informações sobre uma determinada doença utilizando biomarcadores eficientes e nos sistemas de entrega de droga, entender os mecanismos de ação de fármacos, permitir a descoberta de novas drogas e direcionar fármacos de maneira eficaz [8].

Dentre os inúmeros materiais nanoestruturados com grande potencial na área biomédica, as nanopartículas magnéticas (NPM) estão sendo testadas como possíveis agentes de contraste de imagem de ressonância magnética (MRI) e como carreadores de drogas [9].

1.2 Nanotoxicologia

Os avanços atuais em nanotecnologia conduziram ao desenvolvimento de um novo campo, a nanomedicina, que inclui aplicações de nanomateriais e nanodispositivos para diagnóstico e como agente terapêutico [10]. Os benefícios potenciais para aplicação clínica de nanomateriais incluem a especificidade de ação, a possibilidade de carreamento de agentes terapêuticos e outras múltiplas funções. É importante frisar que para o entendimento e aplicação clínica dos nanomateriais, estudos de toxicidade e biocompatibilidade são necessários [1].

A aplicação de partículas com diâmetros menores que 100nm incita várias discussões em relação à avaliação toxicológica [11], em especial devido ao fato de que características inerentes às partículas com diâmetros diferentes, porém com a mesma composição, podem também interferir na biocompatibilidade desses materiais. Exemplifica esta observação o trabalho de Bermudez et al. (2004) que avaliou a inalação de partículas de óxido de titânio com diâmetro de 20 nm em roedores, verificando que estas induzem maior impacto nos pulmões dos animais tratados do que quando expostos às partículas de mesma composição e diâmetro em escala micrométrica [12].

Preocupações em relação à segurança do uso de nanopartículas com finalidade terapêutica dão lugar a estudos que permitem determinar a natureza e extensão dos eventos adversos causados por esses materiais. Isso possibilita o desenvolvimento de agentes terapêuticos e medicina individualizada, termo que denota tratamento e prescrição terapêutica específica para cada paciente, também denominado como terapia individualizada [13], sendo uma aplicação nanobiotecnológica para o futuro [8].

1.3 Sistemas de entrega de droga

Nos últimos tempos, a descoberta de novas drogas foi muito importante para a inovação farmacêutica, mas a necessidade de drogas alcançarem o local de ação parecia ser negligenciada. Atualmente, porém, a superação de barreiras biológicas no local de ação da droga e as vias de administração são reconhecidas como desafios crescentes do processo de desenvolvimento de formas farmacêuticas, os quais podem ser vencidos por meio de uma ciência adequada. Neste

sentido, a indústria farmacêutica começou a reconhecer a importância de pesquisas, tendo os interesses agora voltados para busca de soluções de entrega de droga [14].

Em 1965, um filme de ficção científica baseado no livro de Isaac Asimov, *Fantastic Voyage*, descreveu sobre a miniaturização de dispositivos e especificidade de tratamento, uma idéia que se torna aplicável ultimamente [15], visto que a nanobiotecnologia possibilita a utilização de dispositivos em escala nanométrica [8].

Essa tecnologia possibilita o melhoramento dos perfis farmacológicos de muitas classes de moléculas terapêuticas a partir do desenvolvimento de novos e eficientes sistemas de entrega de drogas [16]. Algumas estratégias têm sido desenvolvidas para aperfeiçoar o processo de especificidade de entrega de drogas possibilitando o carreamento para células doentes, reduzindo potenciais efeitos colaterais, aumentando dessa forma, a eficácia terapêutica e melhorando aspectos como baixa solubilidade da droga e instabilidade [17, 18].

Os efeitos colaterais são, às vezes, tão prejudiciais quanto a própria doença que se quer tratar [15] e muitas drogas descobertas no passado não puderam ser utilizadas em pacientes devido aos efeitos secundários severos. Atualmente, o mercado farmacêutico já disponibiliza produtos que utilizam a nanotecnologia a fim de aprimorar a entrega do fármaco para sítios específicos e reduzir os efeitos colaterais. Um exemplo é o Abraxane™, que contém paclitaxel ligado a nanopartículas de albumina em suspensão, e foi aprovado para o tratamento de câncer de mama metastático após tratamento com quimioterapia sem sucesso ou em casos de reincidência [18]. Aliados a essas características favoráveis, essa formulação possibilitou também a superação de problemas de solubilidade do Paclitaxel [8].

A nanobiotecnologia permite a aplicação de vários tipos de materiais nanoestruturados como sistemas de entrega de drogas que além de serem hábeis para carrear para alvos específicos um ou mais agentes terapêuticos capazes de reconhecer estruturas, são também utilizados em diagnósticos por imagem e para o tratamento de várias doenças [19]. Os nanomateriais podem ser funcionalizados com peptídeos, proteínas, ácido nucléico, anticorpos e drogas, aprimorando a entrega para células [16].

Alguns sistemas de entrega de droga incluem os dendrímeros que representam uma classe de polímeros caracterizada por uma estrutura bem definida com alto grau de uniformidade molecular. Possuem muitas possibilidades de aplicações, porém é esperado como uma nova geração de sistema de entrega de droga [20].

Os lipossomas também têm sido utilizados como carreadores de drogas em lugar do sistema convencional de dose que implica na administração de múltiplas doses durante o tratamento a fim de manter a concentração sanguínea do fármaco na faixa terapêutica. Esse tipo convencional de administração, no entanto, possibilita oscilações da concentração, atingindo a faixa subterapêutica e também a faixa tóxica, o que não é desejado para um tratamento eficaz. O sistema de entrega de drogas apresenta vantagens as quais incluem a habilidade de proteger drogas de degradação, carreamento específico da droga para um determinado local, dose terapêutica suficiente para tratamento e redução de efeitos colaterais. O desenvolvimento desses sistemas lipossomais é limitado, entretanto, devido a problemas como baixa eficiência de encapsulação, liberação rápida de drogas solúveis em água na presença de componentes do sangue e baixa estabilidade [18].

Em alguns casos, nanopartículas são mais eficientes como carreadores de drogas que lipossomas por possuírem maior estabilidade [21, 22] e propriedades para controle de liberação mais útil, e por conferir maior segurança e especificidade. Por essas razões muitas drogas são associadas com nanopartículas [18] que podem ser incluídas em polímeros, biodegradáveis ou não, cujo tamanho varia preferencialmente de 10 a 100 nm. [18].

Os polímeros são utilizados amplamente para melhorar a solubilidade na água, diminuir a toxicidade, aumentar a permeabilidade, proteger de possível degradação enzimática ou hidrólise e aumentar a entrega específica de drogas [20]. O método de síntese envolve a dissolução da droga e encapsulação no interior de uma matriz polimérica. De acordo com esse processo podem ser classificados como nanoesferas ou nanocápsulas [22]. Permitem também o controle de liberação de droga em sistemas vivos [18]. Nanocápsulas são sistemas vesiculares na qual a droga é limitada à cavidade, cercada por membrana polimérica enquanto que nanoesferas são sistemas em que a droga está dispersa uniformemente na matriz polimérica [22].

Em particular, as nanopartículas magnéticas (NPM) são boas candidatas como agentes de entrega de droga. Estas podem ser concentradas no local da doença, utilizando um campo magnético externo, dessa forma reduzindo efeitos colaterais e possibilitando eficiência do tratamento [23, 24] para inúmeras patologias, como o câncer e a paracoccidiodomicose.

Para que possam ter finalidade biomédica, as NPM devem ser recobertas com substâncias que as façam estáveis, biodegradáveis, não-tóxicas em meio fisiológico e capaz de se ligarem a moléculas biológicas complexas [25, 26]. Várias amostras têm sido testadas pelo grupo de

pesquisa “Interações biológicas e biomateriais” [27], sendo os resultados os mais variados, tanto em termos de biodistribuição, quanto nos aspectos de biocompatibilidade/toxicidade.

1.4 Paracoccidioidomicose

O fungo *Paracoccidioides brasilienses* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (Pbmicose), a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina [28], sendo o Brasil, a Venezuela e Colômbia, os países de maior incidência da doença [29].

A Pbmicose é caracterizada por ser uma doença de evolução crônica e de padrão granulomatoso [30, 31, 32], que envolve principalmente os pulmões, visto que a infecção inicia-se por inalação do fungo que alcança o epitélio alveolar pulmonar e dissemina a vários órgãos e sistemas [30, 31, 32]. O desenvolvimento da doença está associado principalmente à resistência do hospedeiro e à virulência do fungo [33, 34].

No adulto, a forma clínica predominante é a crônica, mas quando acomete crianças ou adolescentes apresenta-se na forma aguda ou subaguda. Quando não diagnosticada e tratada oportunamente, pode levar a formas disseminadas graves e letais, com rápido e progressivo envolvimento dos pulmões, tegumento, gânglios, baço, fígado e órgãos linfóides do tubo digestivo [29, 35].

O grande fator de risco para aquisição da infecção são as profissões ou atividades relacionadas ao manejo do solo contaminado com o fungo, como por exemplo, atividades agrícolas, terraplanagem, preparo de solo, práticas de jardinagens, transporte de produtos vegetais, entre outros. Em todas as casuísticas, observa-se que a grande maioria dos pacientes exerceu atividade agrícola nas duas primeiras décadas de vida, tendo nessa época provavelmente adquirido a infecção, embora as manifestações clínicas tenham surgido muitos anos depois [29, 35].

A duração do tratamento tem relação com a gravidade da doença e ao tipo de droga utilizada. Usualmente, o tratamento é de longa duração, para permitir o controle das manifestações clínicas da micose e evitar as recaídas. A anfotericina B (1mg/kg/dia) é uma das drogas de escolha para o tratamento de casos graves [35].

1.5 Anfotericina B

Uma das metas mais ambiciosas no estudo de sistemas de entrega de droga é desenvolver uma terapia específica que permitirá concentrações nos locais de instalação das doenças e redução dos efeitos colaterais [36]. Atualmente muitos estudos estão sendo desenvolvidos para aperfeiçoar a entrega da Anfotericina B e reduzir seus efeitos tóxicos.

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico usado no tratamento de infecções micóticas [37]. Embora seja, atualmente, o antifúngico que provoca menor resistência e drjs requerido em casos de micose sistêmica grave, seu uso é limitado devido à alta toxicidade que gera. O mecanismo de ação está baseado na alta afinidade com esteróis de membrana celular [38], ergosterol e colesterol, com os quais forma complexos [39]. Tais complexos formam poros na membrana, permitindo a perda de íons e moléculas pequenas da célula, alterando o equilíbrio iônico e morte celular [40-43].

Apesar da afinidade deste antibiótico ser maior para ergosterol [44], presente na membrana dos fungos, do que para colesterol, os poros são também formados nas células do hospedeiro, o que explica a alta toxicidade da anfotericina B [45]. Essa característica, somada à sua baixa solubilidade em água, limita a aplicação deste medicamento.

A anfotericina B exhibe duas toxicidades principais: toxicidade aguda ou relacionada à infusão, como calafrios e hipotensão, e toxicidade renal crônica freqüente (nefrotoxicidade). Os efeitos colaterais relacionados com o uso são, entre outros, náusea, febre, nefrotoxicidade e dano hepático [38].

A incidência de nefrotoxicidade é alta, variando entre 49% e 65% [46, 47]. É definida, na maioria dos estudos, por duplicação dos níveis de creatinina, associada com vasoconstrição que causa isquemia e por interação direta com a membrana das células epiteliais, causando deficiência tubular [46]. É a causa de hospitalização prolongada e aumenta a mortalidade, especialmente em pacientes com necessidade de hemodiálise [47].

Recentes avanços em tecnologia de entrega de droga têm resultado no desenvolvimento de formulações lipídicas de anfotericina B. Depois de muitas tentativas para reduzir a toxicidade

de anfotericina B usando lipossomas, emulsões e outros sistemas, três formulações lipídicas estão comercialmente disponíveis como Abelcet[®], complexo lipídico, Amphotec[®], dispersão coloidal e Ambisome[®], anfotericina B lipossomal [36]. Essas formulações menos tóxicas podem ser administradas em doses maiores, sendo, portanto, mais efetivas [36]. Porém, o custo do tratamento com anfotericina B lipossomal é muito alto, o que limita seu uso clínico. O modelo mais aceito é a tentativa de aumentar a especificidade e reduzir a atividade tóxica deste agente nas células do hospedeiro [38].

Sistemas eficazes para entrega de droga em um alvo específico podem ser desenvolvidos à base de nanopartículas. Estudos prévios mostraram que nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA tendem a acumular-se no pulmão [48]. Se forem associadas com anfotericina B poderiam representar um sistema ideal para o tratamento da forma crônica da Paracoccidioidomicose que acomete os pulmões. Esta nova formulação de anfotericina B será testada *in vivo* para avaliação da biocompatibilidade e de biodistribuição em vários órgãos de camundongos.

Considerando (1) que o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é agente etiológico da Pbmicose, a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina, (2) que o tratamento é de longa duração e os sérios efeitos colaterais levam ao abandono do tratamento; (3) que as NPM recobertas com DMSA são direcionadas preferencialmente para os pulmões, principal alvo da Pbmicose e que se associadas ao antifúngico Anfotericina B (FM-AnfoB), poderiam ser utilizadas como carreadores do fármaco, (4) que os carreadores concentram o fármaco no local de interesse, minimizando os efeitos colaterais associados com a administração da anfotericina B, (5) que FM-AnfoB pode representar um tratamento mais eficaz da Pbmicose; e ainda (6) que a amostra FM-AnfoB é uma nova formulação nanoestruturada e deve ter seus efeitos conhecidos e comparados aos da AnfoB, o objetivo deste trabalho é avaliar sua biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição que evidenciem seu potencial como sistema entregador de drogas para os pulmões.

Os objetivos deste estudo compreendem:

- Avaliar aspectos clínicos e comportamentais dos animais após o tratamento;
- Avaliar a intensidade e durabilidade de processo inflamatório induzido pelas amostras por meio da citometria total e diferencial do sangue periférico e peritônio;
- Avaliar os efeitos de AnfoB e FM-AnfoB sobre as funções renal e hepática, por meio de exames bioquímicos;
- Avaliar os efeitos de AnfoB e FM-AnfoB sobre a viabilidade de células peritoneais;
- Avaliar o potencial genotóxico e citotóxico das amostras AnfoB e FM-AnfoB sobre as células da medula óssea, por meio do ensaio de micronúcleo;
- Avaliar efeitos nos tecidos, distribuição pelos órgãos fígado, baço, rins e pulmões e direcionamento da FM-AnfoB, por meio da análise histológica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

3.1.1 Anfotericina B

A anfotericina B livre utilizada foi a Anforicin B[®], pó liófilo injetável 50mg, do laboratório Cristália. Foi administrada 2mg/Kg/dia de solução, preparada com anfotericina B em água para injeção estéril, sendo esta utilizada como veículo.

3.1.2 Material magnético

A amostra magnética utilizada denominada FM-AnfoB foi gentilmente cedida pelo Dr. Antônio Cláudio Tedesco do grupo de Fotobiologia e Fotoquímica (FFCLRP/USP). É constituída por nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA e associadas com anfoterina B (Sigma Aldrich). A amostra apresenta um sistema de liberação controlada, para um período de 3 dias de acordo com estudos prévios realizados pelo grupo de Fotobiologia e Fotoquímica da FFCLRP/USP. O diâmetro médio das partículas era de 10nm e a concentração de nanopartículas magnéticas e anfotericina B era respectivamente de $3,4 \times 10^{13}$ nanopartículas/mL e 120µg/100µL. Para haver correspondência com a dose de anfotericina B livre administrada diariamente (2mg/kg/dia), a amostra FM-AnfoB era administrada a cada 3 dias em dose de 6mg/Kg por animal.

3.2 Animais

Os animais utilizados eram camundongos fêmeas da linhagem Swiss, não isogênicos, fornecidos pelo biotério da FFCLRP, USP, Ribeirão Preto, SP. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Genética da UnB, com temperatura controlada (25⁰C) e ciclo claro/escuro com duração de doze horas cada, recebendo ração balanceada e água “ad libitum”, no decorrer do experimento. Os animais permaneceram 10 dias consecutivos no laboratório, antes dos experimentos, para sua adaptação ao novo ambiente.

3.3 Tratamentos

Foram utilizados três grupos de animais que receberam, via intraperitoneal, por 12, 24 horas, 7, 15, 30 ou 80 dias, os seguintes tratamentos:

- 1) Grupo controle (n=3) recebeu 160µL de PBS estéril, diariamente, durante todo o tempo experimental;
- 2) Grupo tratado (n=6) com 160µL de Anforicin B[®] (2mg/kg/dia), diariamente, durante todo o tempo experimental;
- 3) Grupo tratado (n=6) com 160µL da amostra contendo nanopartículas magnéticas e anfotericina B (FM-AnfoB), na concentração de 6mg/kg do fármaco, a cada três dias do tempo experimental.

Para a realização de todo experimento foram utilizados 96 animais. A quantidade de nanopartículas, Anfotericina B e doses administradas em cada grupo e tempo de tratamento estão relacionadas na tabela 1. Cabe ressaltar que o tempo de meia-vida da anfotericina B livre é de 7-15 dias, portanto a concentração da droga no organismo em cada tempo não é cumulativa.

Os animais foram sacrificados 12 e 24 horas, 7, 15, 30 e 80 dias após os tratamentos. Durante os experimentos foram também observados nos animais: aspectos clínicos (ocorrência de diarréia, hemorragia, vômito) e o peso corporal médio foi medido no início e término do tratamento. Os animais foram previamente anestesiados com Éter Etílico – P. A. (Vetec), para

realizar a coleta de sangue por punção cardíaca. Posteriormente, foram sacrificados utilizando a técnica de deslocamento cervical, para completar a coleta dos materiais necessários.

Tabela 1: Detalhamento do tratamento dos animais.

Grupos de Tratamento		Tempos					
		12 horas	24 horas	7 dias	15 dias	30 dias	80 dias
Anforicin B®	AnfoB (µg)	64	64	448	960	1920	5120
	Administrações (doses)	1	1	7	15	30	80
FM-AnfoB	NP ($\times 10^{13}$)	0,54	0,54	1,63	2,72	5,44	14,7
	AnfoB (µg)	192	192	576	960	1920	5184
	Administrações (doses)	1	1	3	5	10	27

(AnfoB – Anfotericina B, NP - Nanopartículas)

3.4 Contagem global

O material de coleta e armazenamento de sangue foi previamente tratado com solução de EDTA, a fim de evitar a coagulação do sangue a ser analisado. Dos animais anestesiados com éter etílico, foram coletados 20µL de sangue do coração que, a seguir, foram colocados em um tubo Eppendorf contendo 380µL de líquido diluidor, Turk. Constituído de ácido acético e azul de metileno a 1% diluídos em água destilada, o líquido diluidor promove a lise das hemácias, facilitando a contagem dos leucócitos. Após homogeneização por 2 minutos, uma alíquota de 10µL foi colocada em câmara de Neubauer, esperando-se 1 minuto para permitir a sedimentação dos leucócitos. A contagem de leucócitos foi realizada em microscópio de luz com objetiva de 40×, quantificando-se todas as células presentes nos quatro retículos externos da câmara de Neubauer. A contagem era realizada em forma de “L”, nas limitações dos quadrados menores de cada retículo, para evitar dupla contagem de leucócitos.

Foi aplicada a seguinte fórmula, para determinar o número de leucócitos totais:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos / mm}^3 = \text{n}^{\circ} \text{ de leucócitos nos 4 retículos} \times 50$$

3.5 Contagem diferencial das células do sangue periférico

O sangue foi obtido por punção cardíaca e colocado em uma lâmina (lavada, seca e identificada) e com o auxílio de outra lâmina inclinada a 45° , a lâmina extensora, foi realizada a distensão da gota.

Após período de 24 horas, necessário para que o material seque, as lâminas foram fixadas em metanol durante cinco minutos, coradas com Wright Giemsa por quatro minutos, lavadas com solução tampão de fosfato por três minutos e, para finalizar, lavadas em água corrente e secas. Para cada animal foram preparadas duas lâminas.

A análise foi realizada em microscópio de luz com objetiva de imersão (100 \times), em teste cego. Em cada lâmina foram contadas 500 células para determinação da frequência das populações de linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

3.6 Exames bioquímicos

Para dosar enzimas e metabólitos, aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado por punção cardíaca, o plasma foi separado e armazenado em tubo próprio para coleta. O material de coleta e armazenamento foi previamente tratado com solução de EDTA.

As amostras foram mantidas a temperatura de 4°C por aproximadamente 3 horas, encaminhadas para o Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (HVET) e investigadas em analisador bioquímico semi-automático modelo BIO-2000 (Bioplus, Brasil), em parceria com a equipe do laboratório de Patologia Clínica. Os testes realizados foram: Alanina Amino Transferase (ALT/GPT), Fosfatase Alcalina (FA), Gama GT (GGT), uréia e creatinina. A tabela 2 indica a metodologia adotada para a realização de cada exame bioquímico.

Tabela 2: Metodologia utilizada para os exames bioquímicos.

Exame bioquímico	Metodologia utilizada
ALT	Metodologia segundo Karmen, otimizada por Henry e colaboradores [49].
FA	Com base nos trabalhos de King e Roy [50].
GGT	Baseado no princípio do método de Szasz modificado [51].
Uréia	Metodologia Ureas-Labtest [52].
Creatinina	Sistema colorimétrico da Labtest [53].

3.7 Contagem diferencial das células peritoneais

Após sacrifício do animal por deslocamento cervical, foi feita uma incisão na região abdominal para expor a cavidade peritoneal. Uma lâmina (limpa, seca e identificada) foi passada delicadamente sobre as vísceras, obtendo-se assim películas finas de material. Para cada animal foram preparadas duas lâminas. Esperou-se a secagem do material, ao ar, por 24 horas e em seguida as lâminas foram fixadas com metanol por 5 minutos, coradas com Wright-Giemsa e lavadas com solução de tampão fosfato.

Foram contadas 500 células por animal para determinação da frequência das populações de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. A análise foi realizada em microscópio de luz (100x), em teste cego.

3.8 Viabilidade de Células peritoneais

Após o sacrifício do animal, 10 mL de tampão PBS pH 7,2 gelado foram injetados no peritônio, onde se realizou movimentos leves a fim de distribuir homogeneamente o tampão por todo o peritônio. Com auxílio de pipeta Pasteur 7 mL do PBS/células peritoneais foram coletados e transferidos para tubo Falcon mantido em recipiente com gelo. O material foi centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante retirado e, após acrescentar 1 mL de PBS gelado, a solução foi homogeneizada. Uma alíquota de 40µL do homogeneizado foi misturada com 160 µL de nigrosina e 10µL dessa solução foram pipetados diretamente em câmara de Neubauer.

A análise foi feita em microscópio de luz com objetiva de 40×, usando-se os quatro retículos laterais da câmara e contando-se as células vivas (brilhantes) e mortas (pretas). O cálculo utilizado foi:

$$\% \text{ células viáveis} = \text{nv} / (\text{nv} + \text{nd}) \times 100$$

nv: quantidade de células vivas

nd: quantidade de células mortas

3.9 Ensaio de micronúcleo

Após o sacrifício dos animais, os fêmures foram extraídos, limpos e a epífise proximal foi cortada para expor o canal da medula. A agulha de uma seringa de insulina, previamente preenchida com 1 mL de soro fetal bovino, foi inserida firmemente em uma das extremidades e seu conteúdo injetado, de modo a retirar a medula óssea para a realização do experimento.

O material medular foi recolhido em um tubo de ensaio e centrifugado, por cinco minutos, a 1000 rpm. O sedimento foi homogeneizado em 30 µL do sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta. Uma gota do material foi instilada sobre uma lâmina (lavada, seca e devidamente identificada) e, com auxílio de uma lâmina extensora inclinada a 45⁰, foi realizada a distensão da gota.

As lâminas contendo material foram secas durante 24 horas e, após esse tempo, foram fixadas em metanol por cinco minutos, coradas com solução previamente preparada de corante Giemsa e tampão fosfato na proporção de 1:14, por oito minutos. As lâminas foram a seguir lavadas em água corrente, para retirar o excesso de corante e secas. Para cada animal foram preparadas duas lâminas.

A análise das lâminas foi realizada em microscopia de luz na objetiva de 100×, perfazendo um total de 4000 células, sendo 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) e 2000 eritrócitos normocromáticos (ENC) por animal, em teste cego. A genotoxicidade é obtida a partir do número de micronúcleos encontrados em EPC e ENC.

Para garantir a eficácia do ensaio, foi utilizado um grupo denominado controle positivo, composto por 6 animais que receberam ciclofosfamida (40mg/Kg/animal), droga potencialmente

clastogênica, via intraperitoneal e 24 horas após a administração da substância o material foi coletado como descrito anteriormente.

Para avaliar a citotoxicidade, o percentual de eritrócitos policromáticos (% EPC) foi obtido a partir dos números de células de EPC e ENC registrados, quando a primeira população de células (EPC ou ENC) atingia a contagem de 2000. O % EPC foi calculado a partir da seguinte fórmula:

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

% EPC: percentual de eritrócitos policromáticos

EPC: Quantidade de eritrócitos policromáticos

ENC: Quantidade de eritrócitos normocromáticos

3.10 Análise Histológica

De cada grupo tratado, os 3 ou 5 primeiros animais tiveram os órgãos coletados para análise histológica. Coletou-se fígado, baço, rins e pulmão. Após serem retirados, estes órgãos foram lavados em solução salina a 0,9%, cortados com bisturi e colocados no fixador Davidson/ácido acético na proporção de 1:9, por 10 horas, a 4°C. Em seguida realizou-se a substituição do fixador pelo álcool 70° e o material foi mantido a 4°C até a etapa seguinte.

Para inclusão em parafina, os órgãos mantidos na solução de álcool 70° passaram por sucessivas fases de desidratação em álcool 80°, 90°, 100° e 100°. Os fragmentos foram diafanizados com uma solução álcool/xileno na proporção de 1:1, seguida de 3 banhos em xileno. Após, foram colocados em 3 banhos de parafina a 56°C e o material foi incluso na parafina com o auxílio de barras metálicas (3x3cm). Todas as etapas, da desidratação até os banhos de parafina tiveram duração de uma hora. Quando a parafina solidificou o material foi retirado das barras.

Os órgãos foram cortados com uso de um micrótomo modelo Leica RM2125RT. Os cortes (semi-seriados) obtidos tinham espessura de 5 µm, e foram colocados em banho-maria a 35°C e coletados com lâminas limpas e identificadas. As lâminas foram mantidas por 24 horas na

estufa a 37⁰C para que o material tivesse perfeita adesão às mesmas. Para finalizar o preparo do material para análise histológica, 3 lâminas de cada órgão foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e as outras 3 coradas com vermelho rápido nuclear associado ao método de Perls. A análise foi realizada em microscopia de luz. Utilizou-se o método comparativo de cruces onde subjetivamente (+) indica pequena, (++) média quantidade e (+++) grande quantidade de aglomerados de nanopartículas. Os cortes foram fotografados utilizando o software Axiophot.

3.11 Análise Estatística

Para verificar diferenças estatisticamente significativas foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey. Foi considerado como significativo quando $p < 0,05$ e verificado se as exigências básicas para ANOVA, a saber, distribuição normal e variância homogênea, foram cumpridas. Nos casos em que essas não foram cumpridas, os resultados foram analisados com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e em seguida com o teste Dunn, todos com significância de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software Minitab 14.

4.1 Análise dos aspectos clínicos e peso corporal dos animais tratados

O peso corporal dos animais foi medido em gramas no primeiro dia antes da administração do tratamento (peso inicial) e também no último dia do tratamento antes do sacrifício dos animais (peso final). Oscilações não significativas no peso corporal dos animais foram observadas durante todo o experimento e entre os tratamentos (Tabela 3).

Não foram observadas alterações clínicas como diarreia, vômito e hemorragia. No entanto, no tratamento de maior duração (80 dias) foram visualizadas mudanças comportamentais e morte nos animais tratados com FM-AnfoB. Três animais apresentaram anormalidades como taquipnéia seguida de tremores no momento da aplicação. Um deles, tratado já há 76 dias, morreu logo após essas alterações. Os outros dois animais estavam em tratamento com FM-AnfoB por 72 dias e foram encontrados mortos após 76 e 77 dias de tratamento.

Tabela 3: Peso corporal (g) dos animais durante o experimento.

Tempos	PBS		AnfoB		FM-AnfoB	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
12 horas	32,6	32,66	33,3	33,5	30,83	30,5
24 horas	34	33,33	33,5	31,83	34,66	31,83
7 dias	32,97	32,33	31,12	31,75	32,06	34,16
15 dias	32,97	33,8	31,12	32,25	32,06	32,16
30 dias	32,97	36,33	31,12	32,83	32,06	31,66
80 dias	32,9	35,66	31,12	32,71	32,06	40,25

* $p < 0,05$

4.2 Análise Citométrica

4.2.1 Contagem Global de Leucócitos

O tratamento com AnfoB induziu leucopenia após 12 horas estatisticamente significativa quando comparado aos resultados dos tratamentos com PBS e FM-AnfoB (Figura 1). Após 24

horas e nos tratamentos com maior duração, 30 e 80 dias, a contagem de leucócitos em todos os tratamentos não diferiu da observada no controle (Figura 1). Entretanto, após 15 dias de tratamento, a figura 1 mostra que, tanto a amostra AnfoB, quanto a FM-AnfoB, reduziram significativamente a contagem de leucócitos totais, quando comparada com o controle.

A única diferença significativa observada entre os tratamentos foi observada no tempo de 12 horas, onde se viu que a amostra AnfoB (anfotericina livre) causa leucopenia.

A análise dos dados do tratamento com AnfoB, ao longo do tempo, mostrou que a contagem de leucócitos em 12 horas foi significativamente menor que após 1, 30 e 80 dias de tratamento. Após 30 dias de tratamento, o grande aumento na contagem de leucócitos fez com que diferísse estatisticamente também dos tempos de 7 e 15 dias (Figura 1).

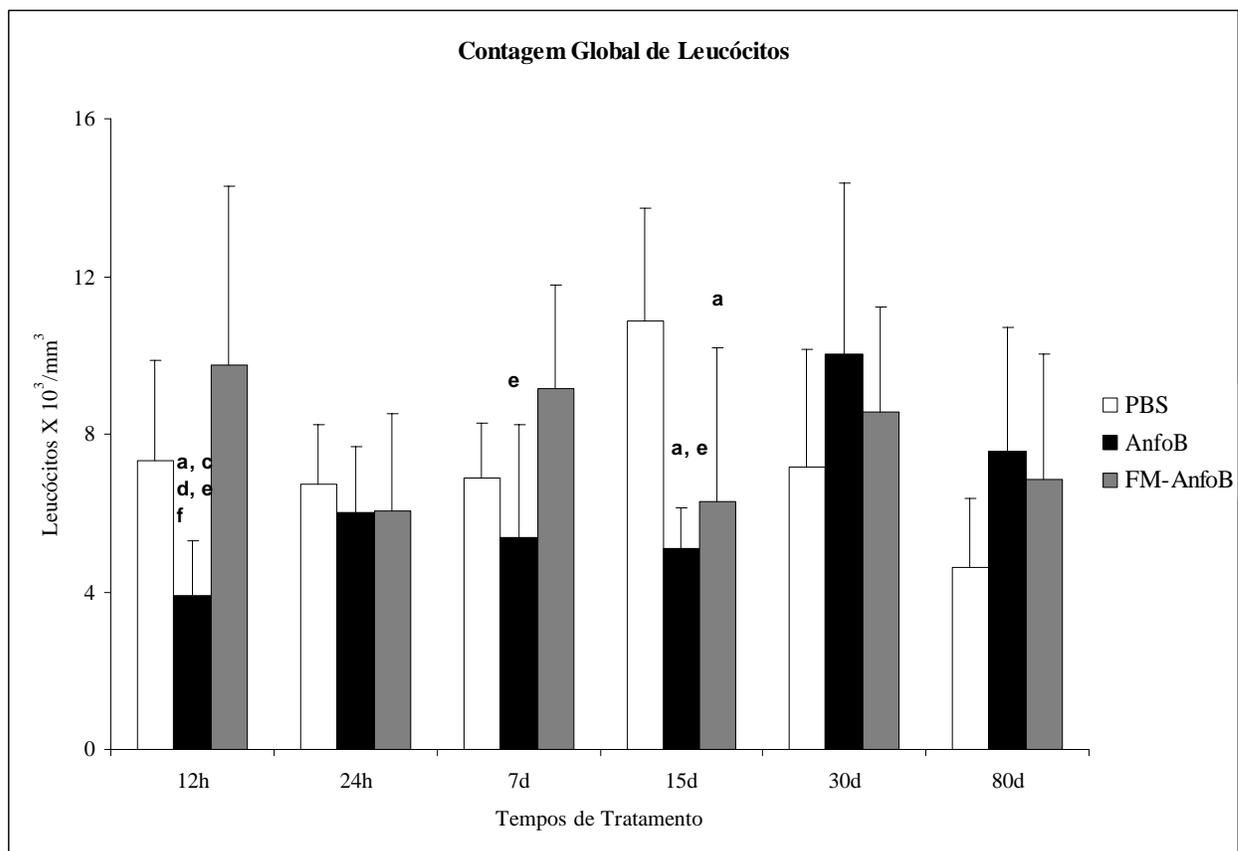


Figura 1: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem global de leucócitos. (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p=0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação a AnfoB, c - diferença em relação FM-AnfoB, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 24h, e - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d, f - diferença em relação ao mesmo tratamento em 80d.

Por outro lado, a análise dos dados do tratamento com FM-AnfoB, ao longo do tempo, permitiu observar que esta amostra não ocasionou alterações significativas nos diferentes tempos de tratamento (Figura 1).

4.2.2 Neutrófilos

Os tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB não induziram qualquer alteração significativa na população de neutrófilos, exceto no tratamento por 7 dias, em que a contagem de neutrófilos foi maior após administrações de FM-AnfoB, quando comparada à do controle (Figura 2).

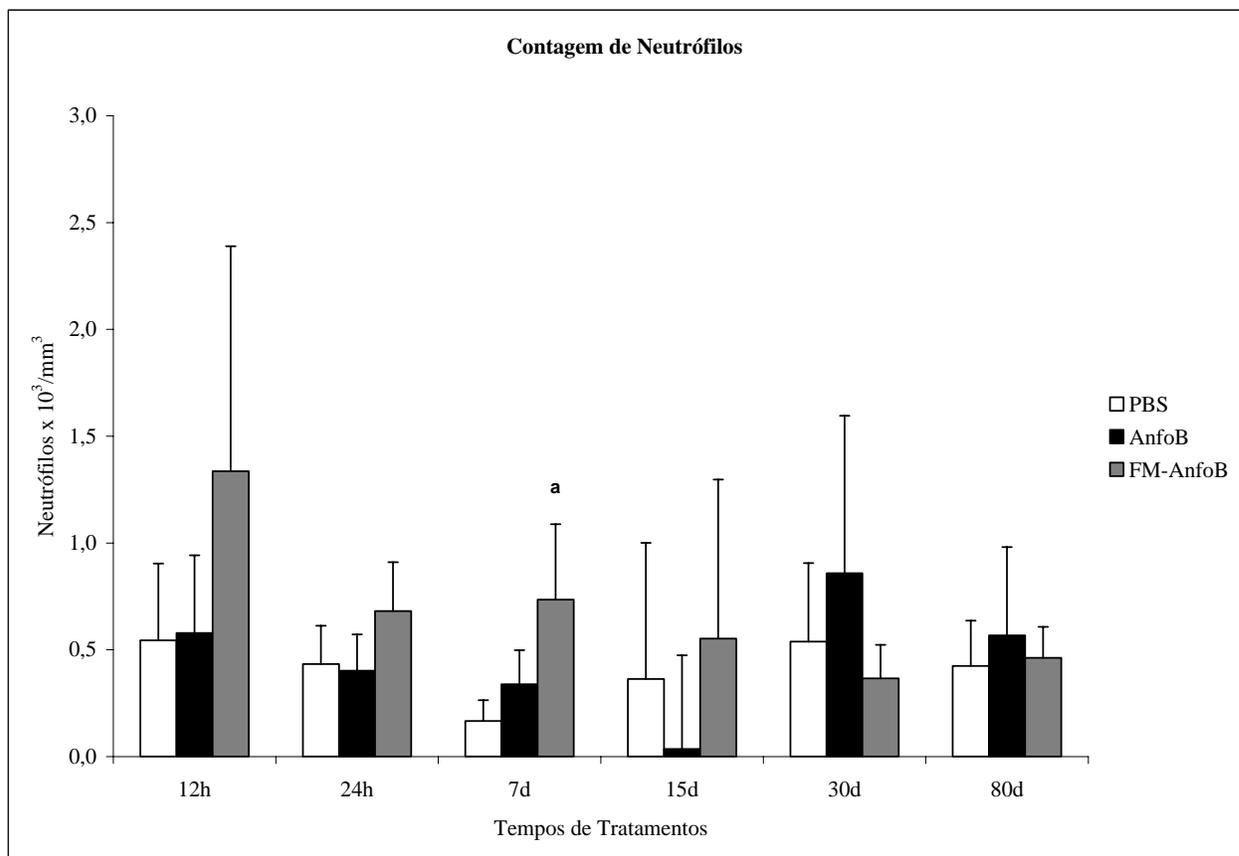


Figura 2: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem de neutrófilos. (PBS – Tampão PBS). a – diferença em relação ao controle p= 0,05.

4.2.3 Eosinófilos

Os tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB não induziram alterações significativas na população de eosinófilos (Figura 3), quando comparados ao controle.

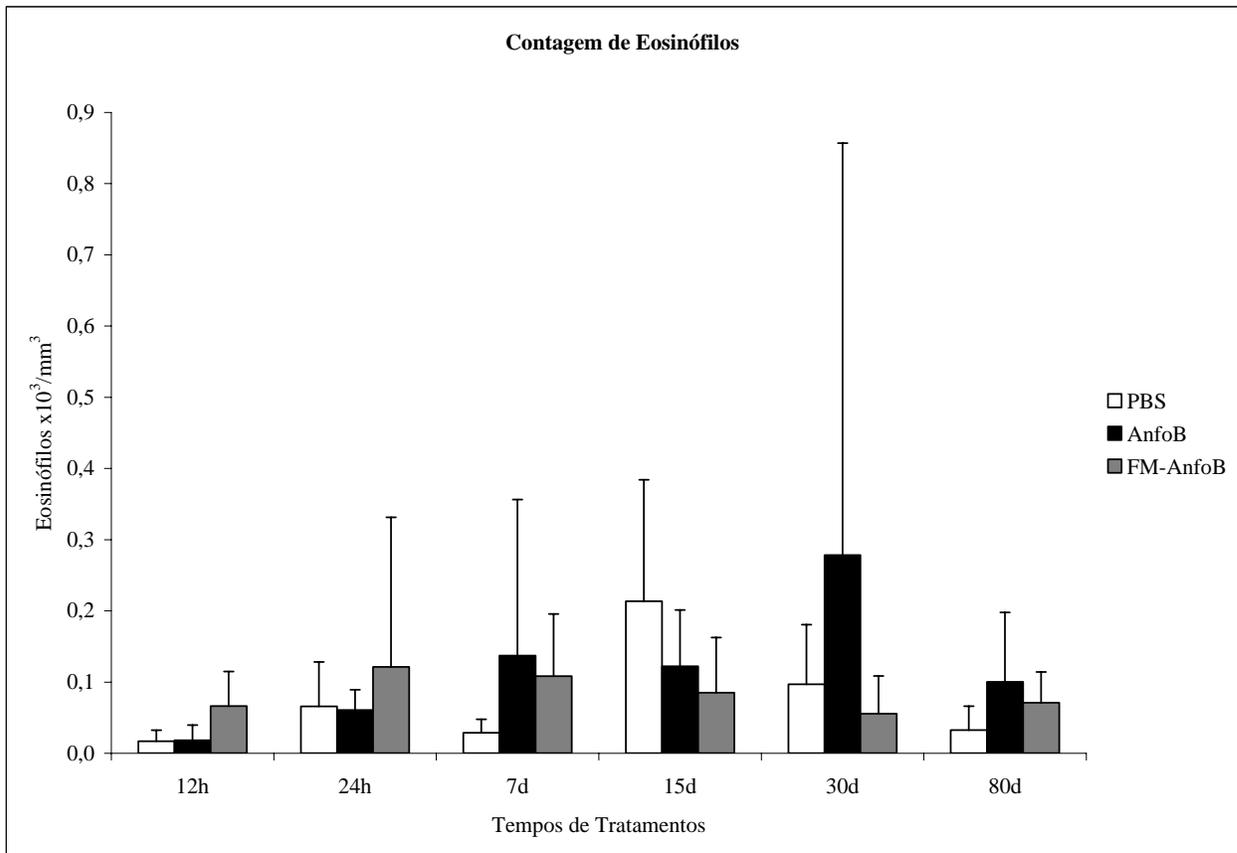


Figura 3: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem de eosinófilos. (PBS – Tampão PBS).

4.2.4 Linfócitos

As amostras AnfoB e FM-AnfoB reduziram significativamente a população de linfócitos apenas após período de 15 dias de tratamento (Figura 4).

A única diferença significativa observada entre os tratamentos com as amostras AnfoB e FM-AnfoB na contagem de linfócitos ocorreu no tempo de 12 horas (Figura 4), como observado na população total de leucócitos (Figura 1).

A análise dos dados do tratamento com AnfoB, em função do tempo, mostrou que a contagem de linfócitos em 12 horas foi significativamente menor que após 30 e 80 dias de tratamento e após 7 e 15 dias a contagem foi menor ao comparar com o tratamento por 30 dias (Figura 4). A mesma análise feita com os dados do tratamento com FM-AnfoB evidenciou que esta amostra não ocasiona alterações significativas nos diferentes tempos de tratamento (Figura 4).

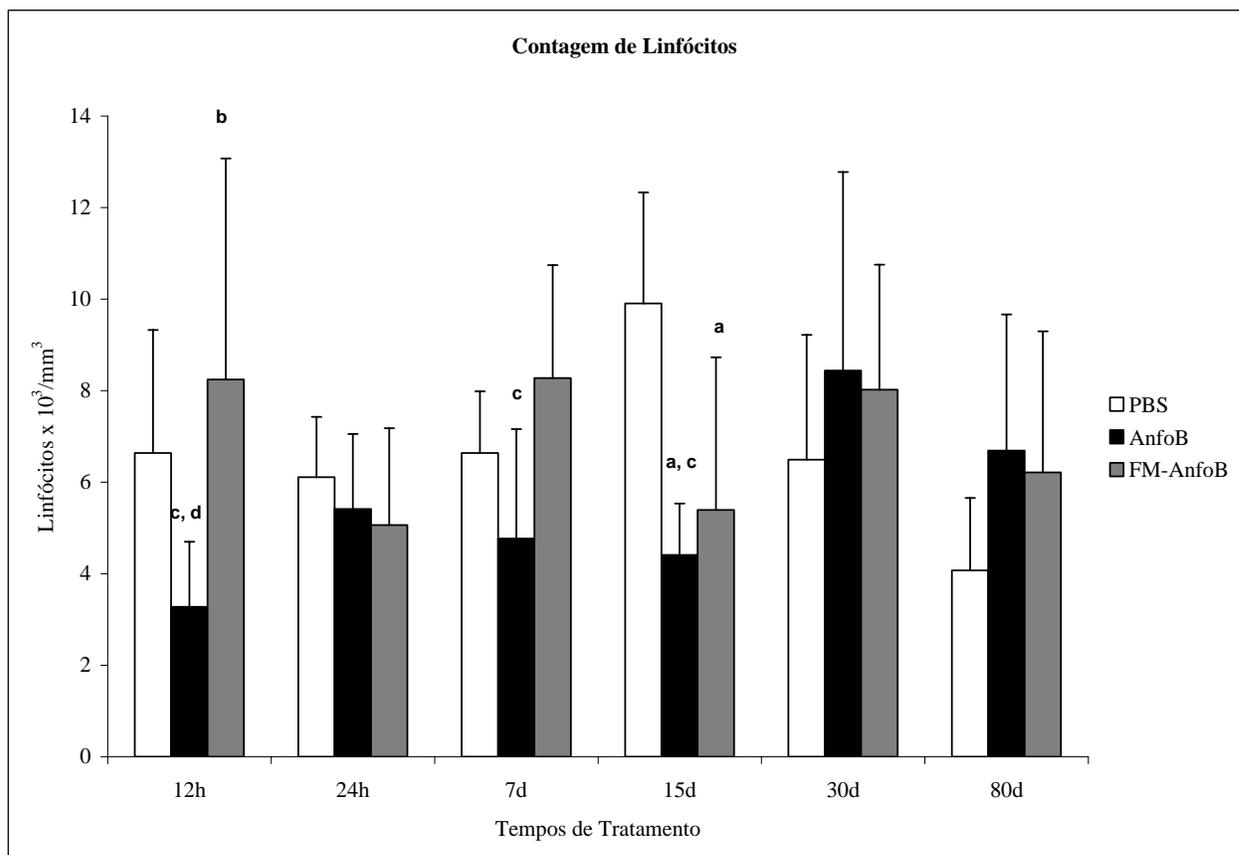


Figura 4: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem de linfócitos. (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p= 0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação a AnfoB, c - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 80d.

4.2.5 Monócitos

A figura 5 mostra que o tratamento por 12 horas com AnfoB induziu uma redução significativa na contagem de monócitos quando comparado ao controle.

Mostra também que a única diferença significativa observada entre os tratamentos com as amostras AnfoB e FM-AnfoB na contagem de monócitos ocorreu no tempo de 12 horas (Figura 5), como observado na população total de leucócitos (Figura 1) ou na população de linfócitos (Figura 4).

A análise dos dados do tratamento com FM-AnfoB em função do tempo mostrou várias diferenças significativas: as populações de monócitos nos tempos de 12, 24 horas e 30 dias eram maiores que a de 7 dias; a de 24 horas era também maior que a de 15 dias.

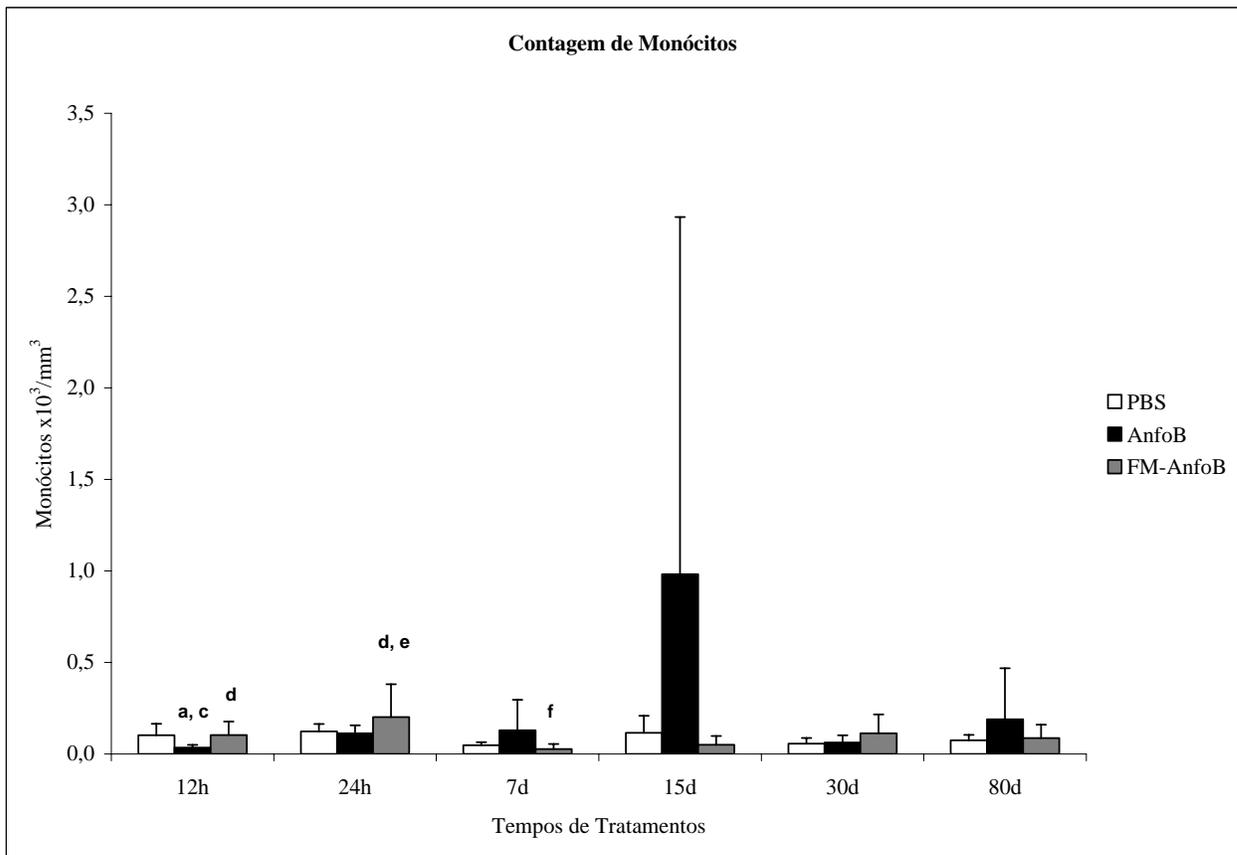


Figura 5: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem de monócitos. (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p= 0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação a AnfoB, c - diferença em relação a FM-AnfoB, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 7d, e - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15d, f - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d.

4.2.6 Basófilos

Os tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB não induziram alterações significativas na população de basófilos (Figura 6), quando comparados ao controle.

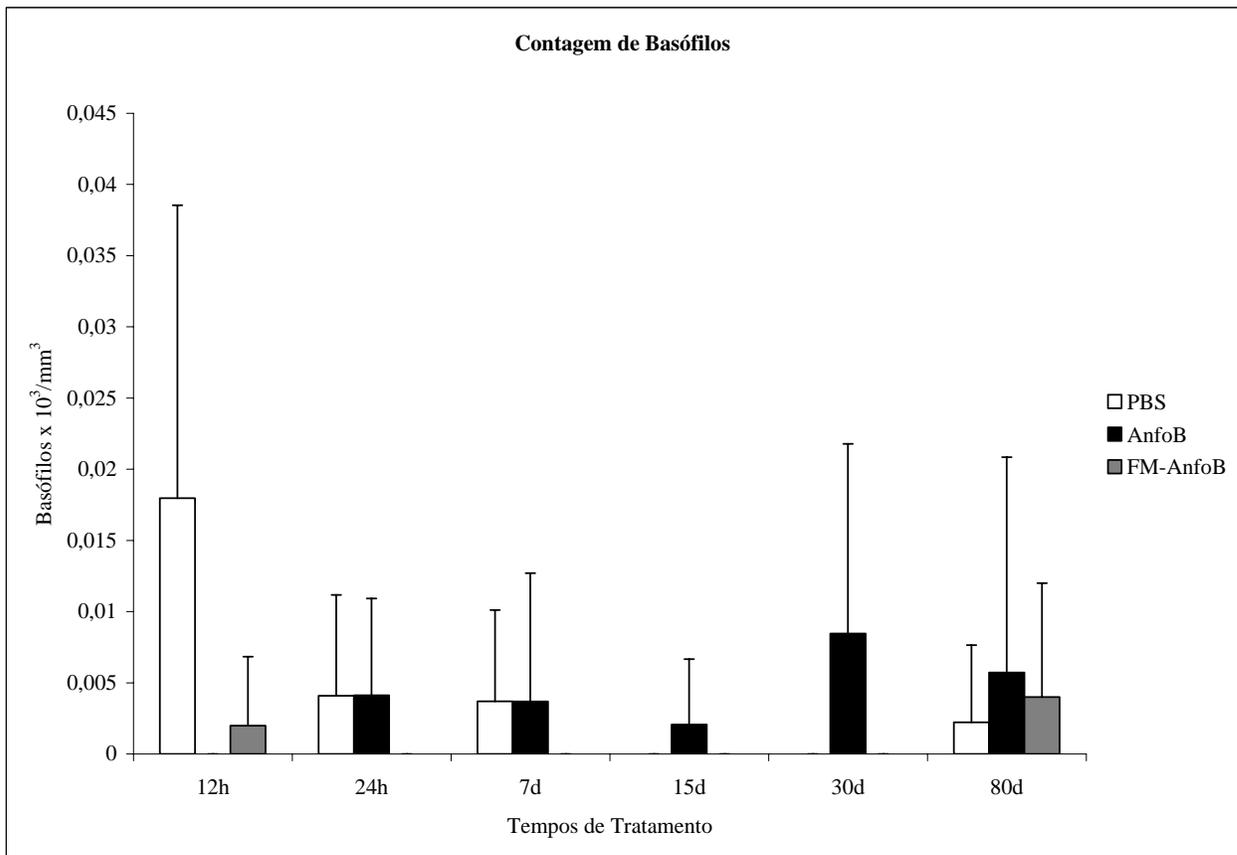


Figura 6: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem de basófilos. (PBS – Tampão PBS).

4.3 Exames bioquímicos

4.3.1 Alanina Amino Transferase (ALT/GPT)

Os tratamentos com as amostras AnfoB e FM-AnfoB não induziram alterações significativas na quantidade de ALT em nenhum dos tempos experimentais, quando comparados ao controle (Figura 7).

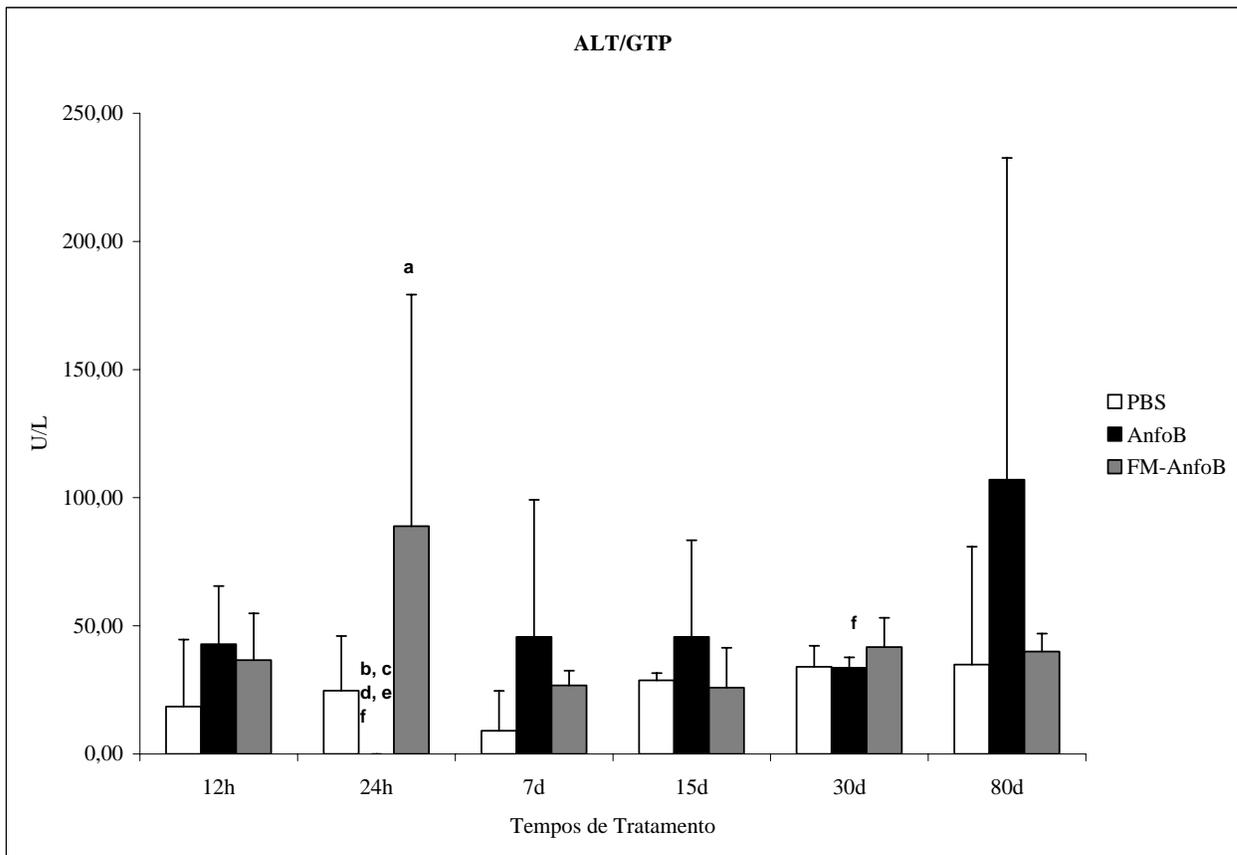


Figura 7: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB em relação a Alanina Amino Transferase (ALT/GPT). (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p= 0,05$): a – diferença em relação a AnfoB, b – diferença em relação ao mesmo tratamento em 12h, c - diferença em relação ao mesmo tratamento em 7d, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15d, e - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d, f - diferença em relação ao mesmo tratamento em 80d.

As duas amostras só mostraram diferenças significativas entre si, com 24 horas de tratamento. Esta foi a única diferença observada em relação aos dados da amostra FM-AnfoB. Por outro lado, a análise dos dados obtidos com a amostra AnfoB mostra que no tempo de 24 horas houve diferenças significativas em relação aos tempos de 12 horas, 7, 15, 30 e 80 dias e também entre os tempos de 30 e 80 dias.

4.3.2 Fosfatase alcalina (FA)

A figura 8 mostra que os tratamentos com as amostras AnfoB e FM-AnfoB não induziram alterações significativas na quantidade de FA em nenhum dos tempos experimentais, quando comparados ao controle. Mostra também que a única diferença significativa entre esses dois tratamentos ocorreu no tempo de 24 horas.

Os dados do tratamento com AnfoB em função do tempo evidencia que em 12 horas, a quantidade de FA observada foi estatisticamente menor que em 1, 7 e 80 dias. Após 24 horas há um aumento notável na quantidade de FA, comparado com todos os outros tempos experimentais, enquanto no tempo de 30 dias ele reduz significativamente também em comparação com todos os outros tempos.

Por sua vez, a análise dos dados do tratamento com a amostra FM-AnfoB também mostra várias alterações significativas: o tempo de 24 horas apareceu aumentado em relação ao de 12 horas e em todo o intervalo de 15 a 80 dias, enquanto a redução observada no tempo de 30 dias é significativa em relação aos dados do intervalo 1-15 dias.

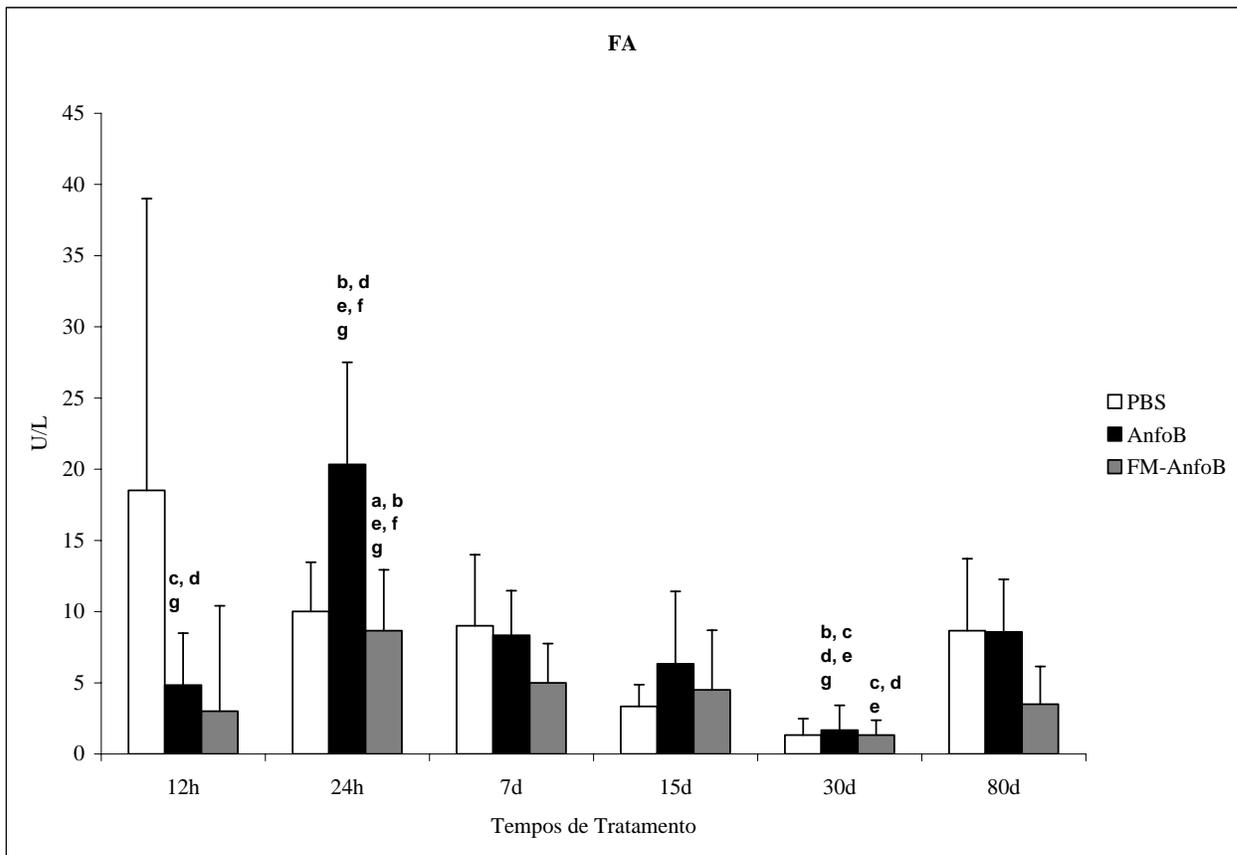


Figura 8: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB em relação a Fosfatase Alcalina (FA). (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p= 0,05$): a – diferença em relação a AnfoB, b – diferença em relação ao mesmo tratamento em 12h, c - diferença em relação ao mesmo tratamento em 1d, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 7d, e - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15d, f - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d, g- diferença em relação ao mesmo tratamento em 80d.

4.3.3 Gama GT (GGT)

Alterações na quantidade de GGT foram observadas durante todo o experimento de tratamento com as amostras AnfoB e FM-AnfoB, porém nenhuma delas foi estatisticamente significativa (Figura 9).

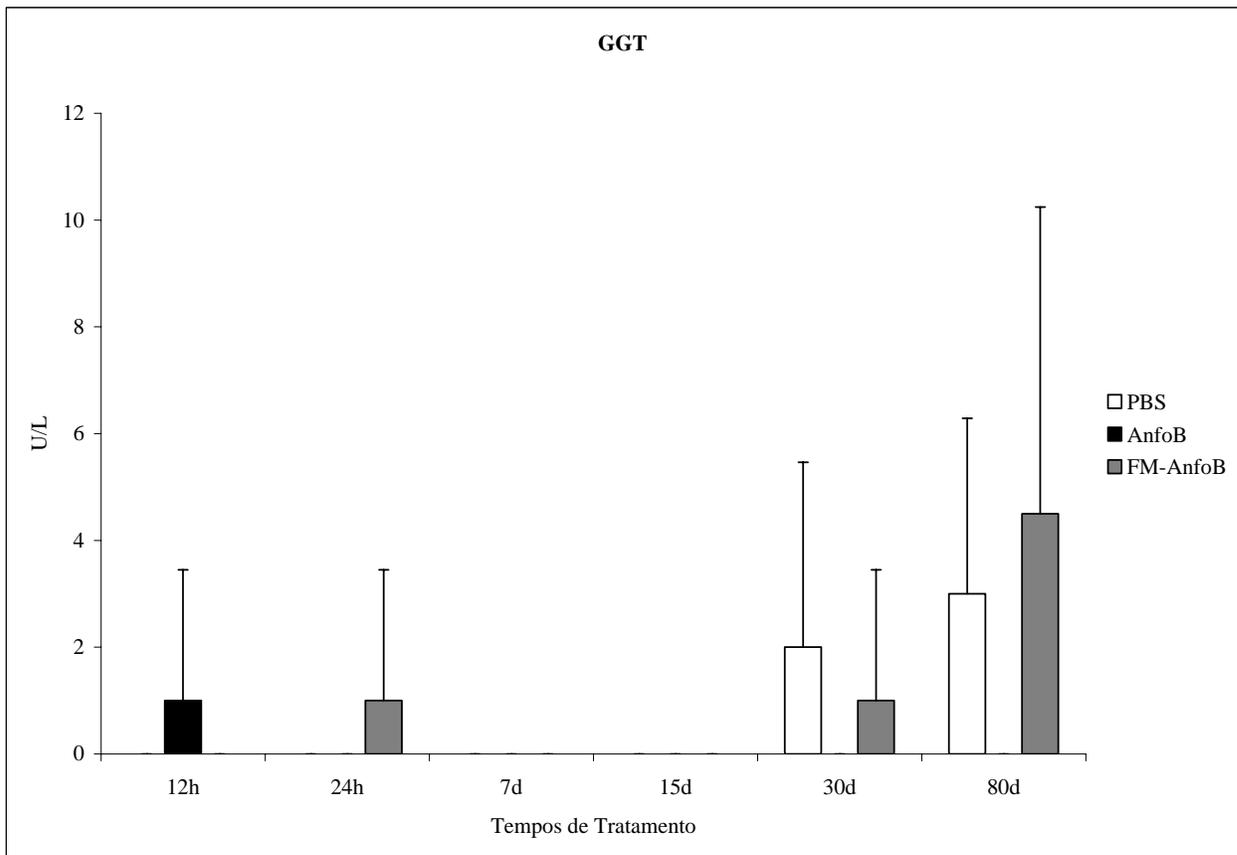


Figura 9: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB em relação a Gama GT (GGT). (PBS – Tampão PBS).

4.3.4 Uréia sérica

De acordo com a figura 10, em 24 horas houve uma redução significativa na quantidade de uréia sérica após o tratamento com FM-AnfoB, quando os dados são comparados aos do controle e esta foi a única alteração significativa observada em relação a uréia sérica.

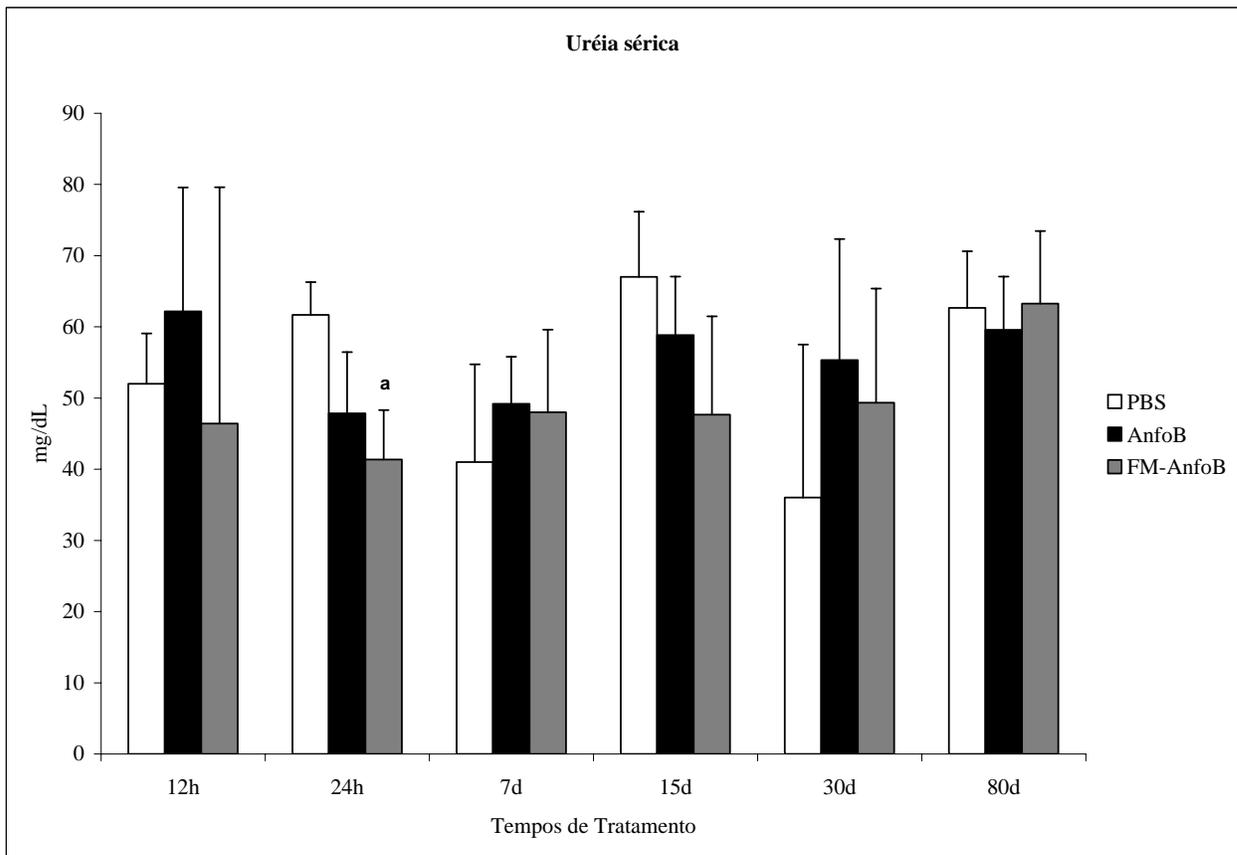


Figura 10: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB em relação a Uréia sérica. (PBS – Tampão PBS). a – diferença em relação a PBS $p=0,05$.

4.3.5 Creatinina sérica

A administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB não produziu qualquer alteração significativa na quantidade de creatinina sérica (Figura 11).

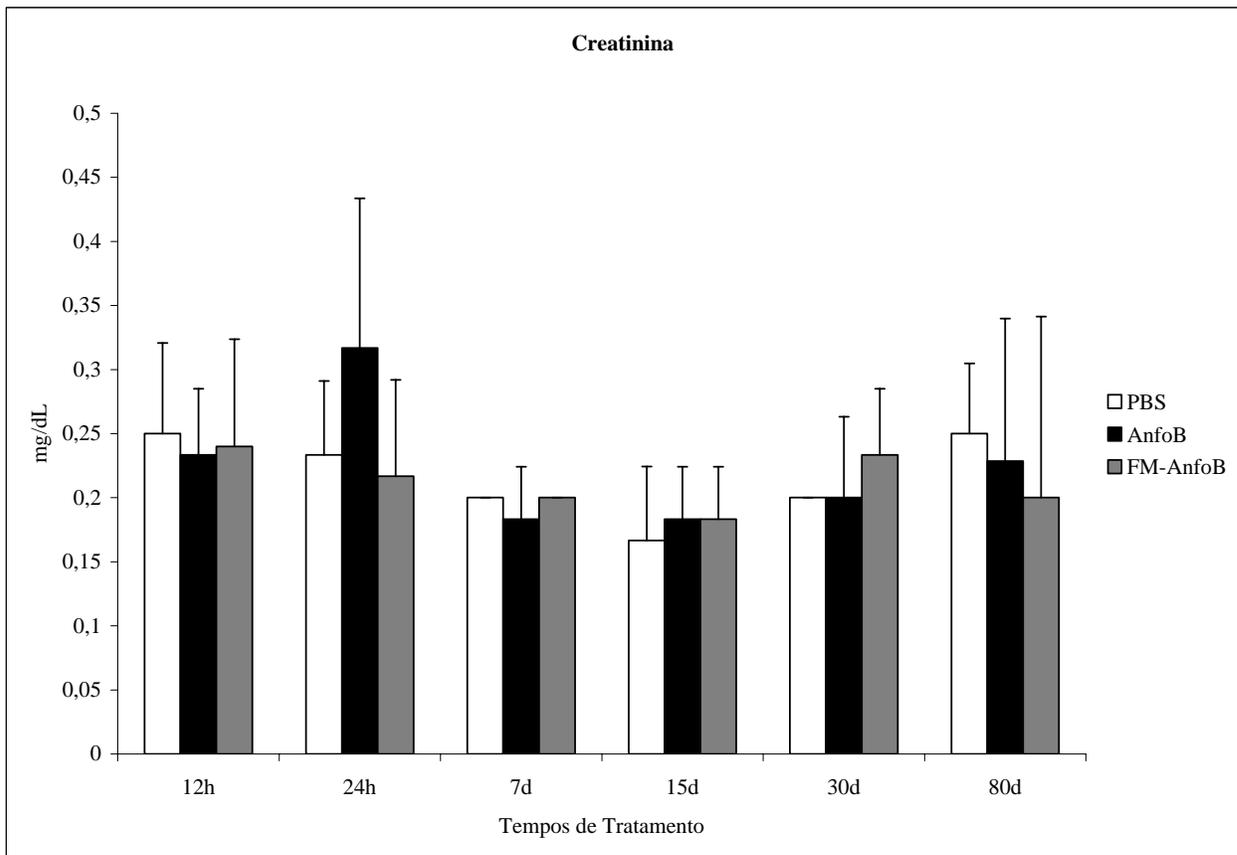


Figura 11: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB em relação a Creatinina sérica. (PBS – Tampão PBS).

4.4 Contagem Diferencial de Células Peritoneais

4.4.1 Neutrófilos

A figura 12 mostra que, quando comparados ao controle, apenas o tratamento com a amostra FM-AnfoB induziu aumentos significativos na contagem de neutrófilos nos tempos de 1, 7 e 30 dias. O tratamento com AnfoB não induziu alterações significativas em relação ao controle.

Diferenças puderam ser observadas entre os resultados das duas amostras: com 24 horas FM-AnfoB induz aumento significativo em relação à amostra AnfoB, enquanto o contrário é observado aos 15 dias de experimento (Figura 12).

Ao analisar as alterações em função do tempo após tratamento com AnfoB é possível observar aumentos significativos na contagem de neutrófilos em 12 horas e 15 dias de tratamento: o de 12 horas é significativo em relação ao tempo de 80 dias e o de 15 dias, o maior de todos é significativo em relação aos tempos de 1, 30 e 80 dias.

De acordo com a figura 12, o tratamento com FM-AnfoB induziu uma contagem de neutrófilos no tempo de 12 e 24 horas significativamente maior comparando com 15, 30 e 80 dias. O tratamento por 7 dias é significativamente maior que 15 dias. Após 30 dias de tratamento a contagem de neutrófilos aumenta, sendo diferente estatisticamente de 15 e 80 dias.

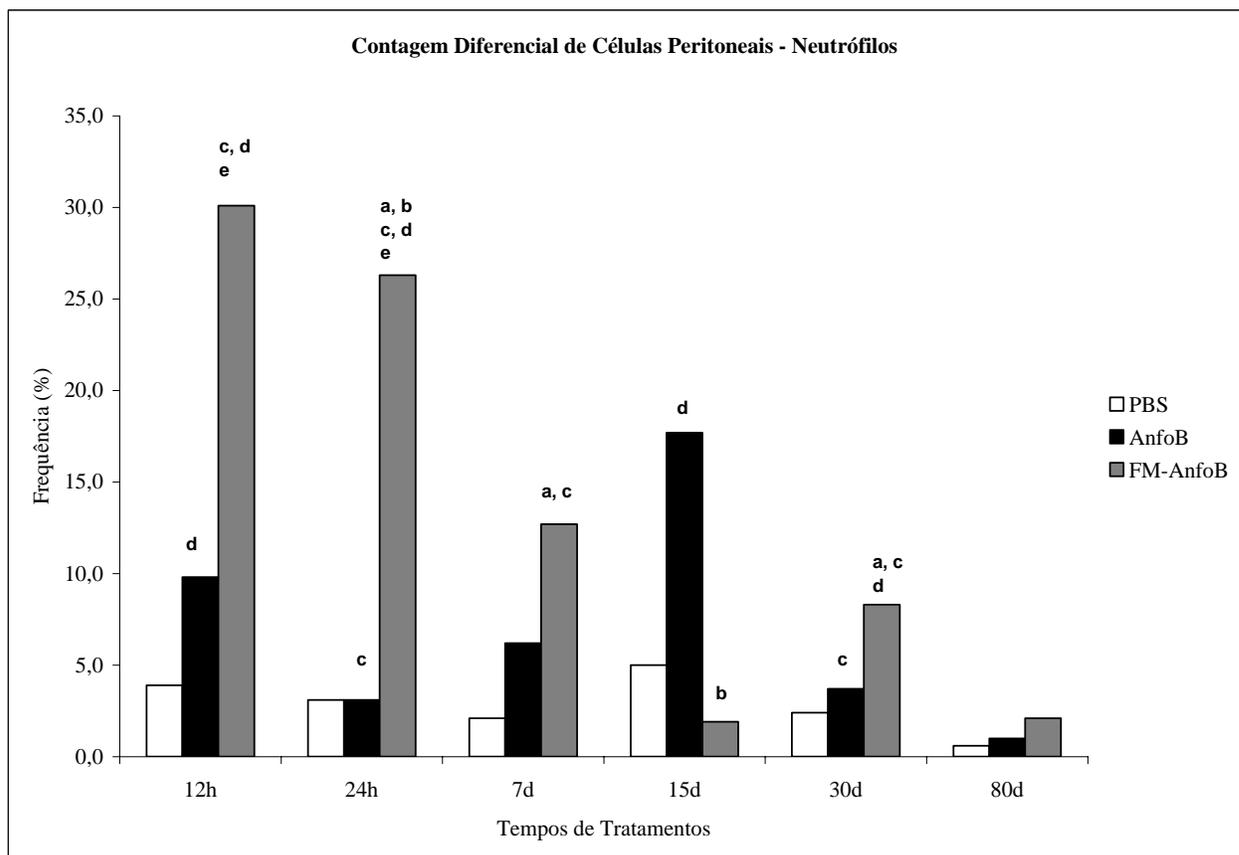


Figura 12: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem de células peritoneais, neutrófilos. (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p= 0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação a AnfoB, c - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15d, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 80d, e - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d.

4.4.2 Eosinófilos

A figura 13 mostra que, em relação à contagem de eosinófilos, apenas a amostra FM-AnfoB induziu aumentos significativos (24 horas e 7 dias) ou diminuição significativa (30 dias), quando comparada com o controle.

Os resultados dos tratamentos com as duas amostras só diferiram no tempo de 24 horas e no de 30 dias. No primeiro tempo, a contagem de eosinófilos foi maior nas administrações de FM-AnfoB e no tempo de 30 dias, ela foi menor do que a induzida por AnfoB (Figura 13).

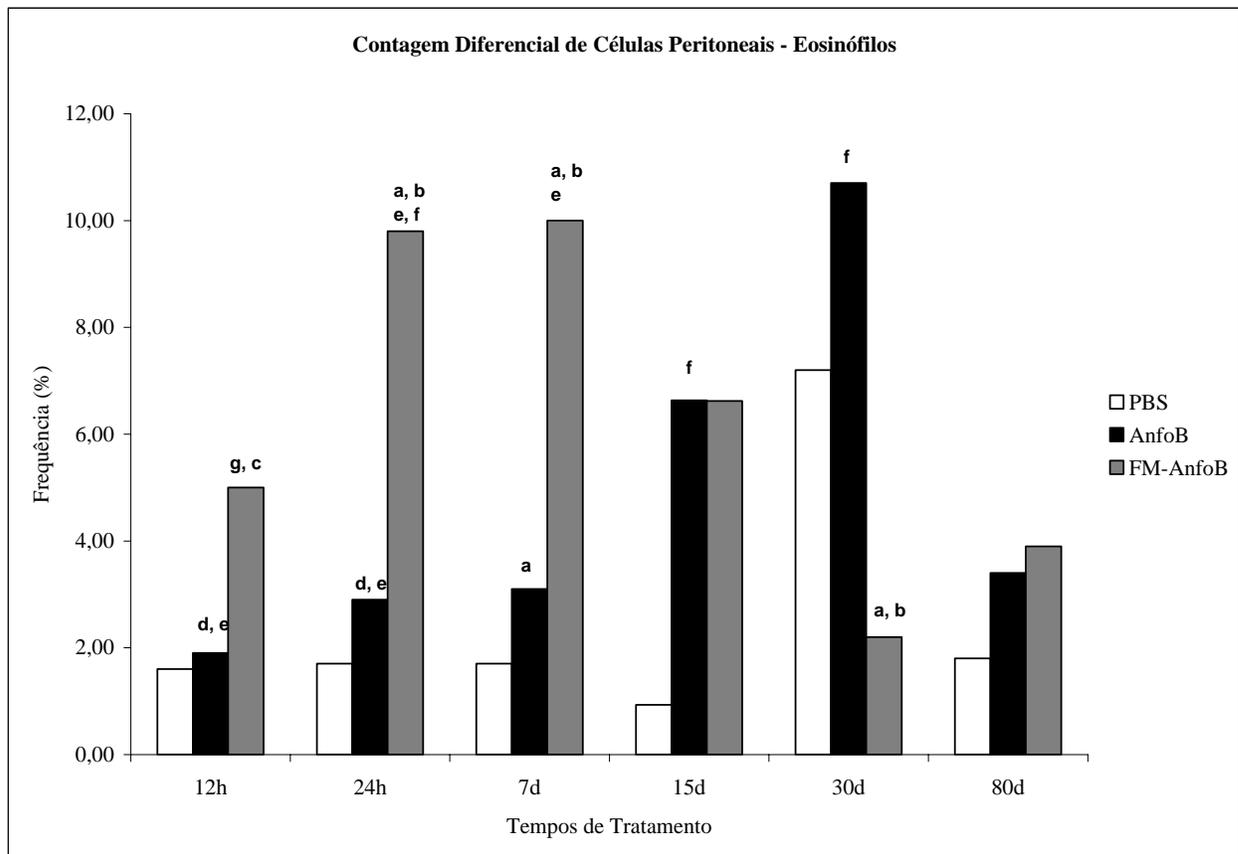


Figura 13: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem de células peritoneais, eosinófilos. (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p= 0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação a AnfoB, c - diferença em relação ao mesmo tratamento em 7d, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15d, e - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d, f - diferença em relação ao mesmo tratamento em 80d, g - diferença em relação ao mesmo tratamento em 24h.

Os dados do tratamento com AnfoB, em função do tempo, mostram um aumento progressivo no intervalo 12 horas-30 dias, de tal forma que a contagem de eosinófilos em 12 e 24 horas tem diferenças estatísticas com os de 15 e 30 dias. A contagem aos 15 e 30 dias, os maiores valores observados, diferem também do valor encontrado aos 80 dias.

Analisados em função do tempo, os resultados do tratamento com FM-AnfoB mostram várias diferenças: no tempo de 12 horas, a contagem de eosinófilos é significativamente menor do que em 24 horas ou 7 dias; os dados de 24 horas são maiores do que em 30 e 80 dias, e os de 7 dias, maiores que os de 30 dias.

4.4.3 Linfócitos

No tratamento dos camundongos com as amostras AnfoB e FM-AnfoB, a única alteração significativa na contagem de linfócitos peritoneais, em relação ao controle, foi observada em 15 dias após tratamento com a amostra FM-AnfoB (Figura 14). Em nenhum dos tempos experimentais foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos com as duas amostras.

Quando analisados em função do tempo, os dados do tratamento com AnfoB mostram que, devido ao aumento de linfócitos após os 15 dias de tratamento, nos tempos de 12 e 24 horas e 7 dias, são observadas diferenças estatísticas com os tempos de 15 e 30 dias. Nos tempos de 12 e 24 horas há ainda diferenças com a contagem em 80 dias.

Diferentemente, as contagens de linfócitos nos grupos tratados com FM-AnfoB não apresentam alterações significativas, quando analisadas em função do tempo de tratamento (Figura 14).

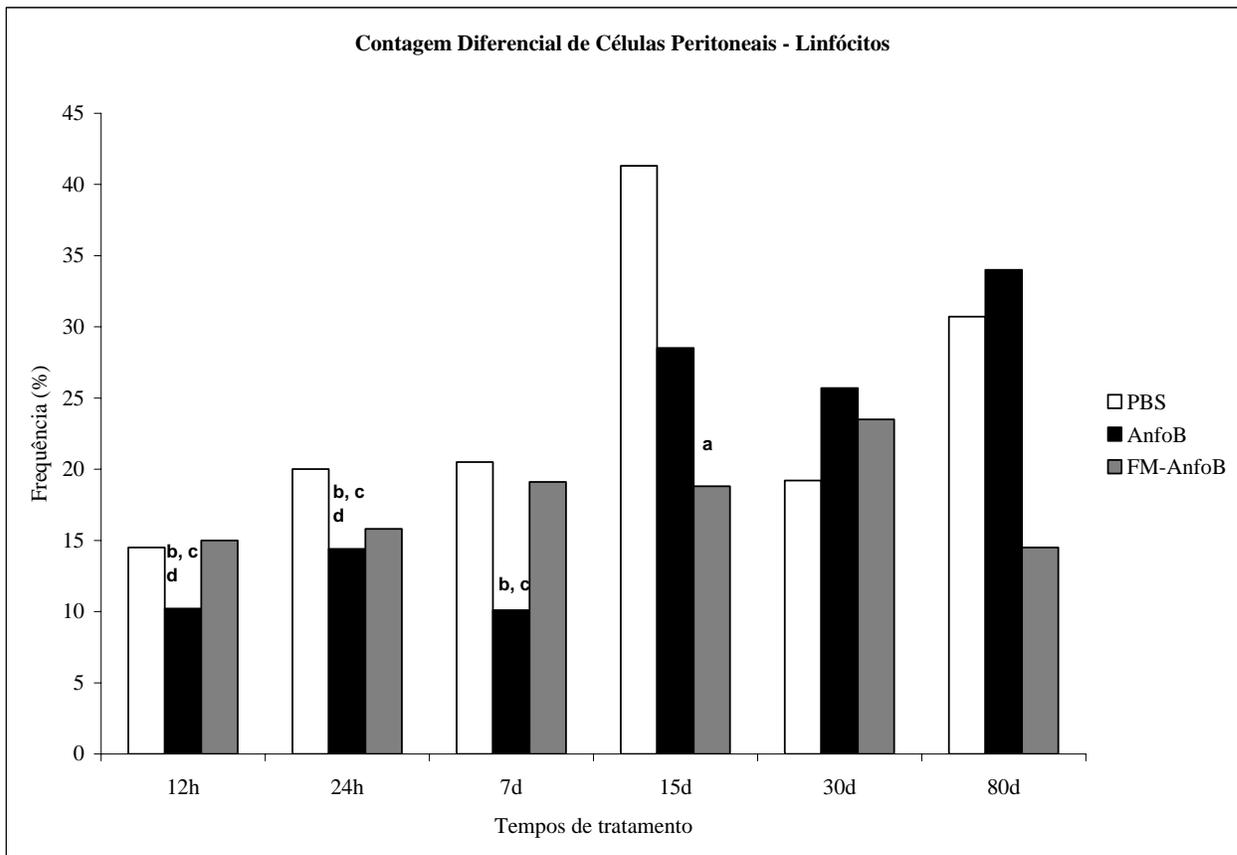


Figura 14: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem de células peritoneais, linfócitos. (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p= 0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação ao mesmo tratamento em 15d, c - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 80d.

4.4.4 Macrófagos

O tratamento com as amostras AnfoB e FM-AnfoB não induziu alterações significativas nas contagens de macrófagos peritoneais, em relação ao controle, em nenhum dos tempos investigados. Entretanto, diferenças significativas nos resultados dos dois tratamentos puderam ser notadas em todos os tempos no intervalo 12 horas – 15 dias de tratamento, sendo que até 7 dias a quantidade de macrófagos nos grupos tratados com FM-AnfoB era sempre menor (Figura 15).

A análise do tratamento com AnfoB ao função do tempo permite observar que no intervalo de 12 horas - 7 dias, as contagens de macrófagos foram significativamente maiores do que a encontrada em 15 dias e que os resultados dos tempos de 24 horas e 7 dias eram também maiores do que em 30 dias (Figura 15).

Quanto aos resultados do tratamento com FM-AnfoB em função do tempo, as contagens de macrófagos em 12 e 24 horas foram significativamente menores do que no tratamento de 80 dias (Figura 15).

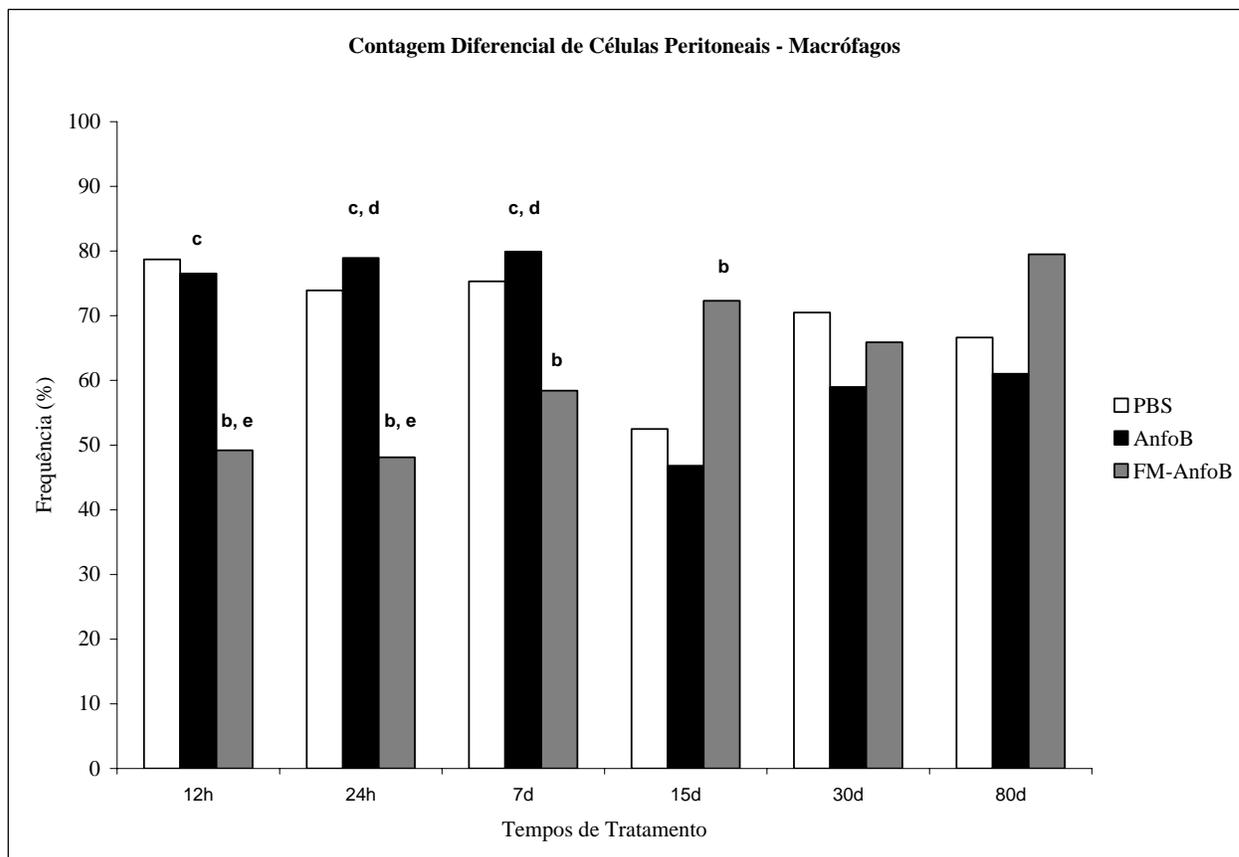


Figura 15: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem de células peritoneais, macrófagos. (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p= 0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação a AnfoB, c - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15d, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d, e - diferença em relação ao mesmo tratamento em 80d.

4.4.5 Basófilos

As amostras AnfoB e FM-AnfoB induziram, com 24 horas de tratamento, alterações significativas em comparação com o controle. Entre os dois tratamentos diferenças significativas foram observadas em 1, 7 e 30 dias (Figura 16).

Ainda que com valores muito baixos, a análise em função do tempo mostra que no tratamento com AnfoB a contagem de basófilos em 12 horas é significativamente maior do que as encontradas em 15 e 80 dias de tratamento.

Na análise dos dados do tratamento com FM-AnfoB, em função do tempo, observa-se uma contagem de basófilos significativamente maior em 12 horas do que em 1, 7, 30 e 80 dias de tratamento e também valores em 15 dias maiores do que os dos tempos de 1, 30 e 80 dias (Figura 16).

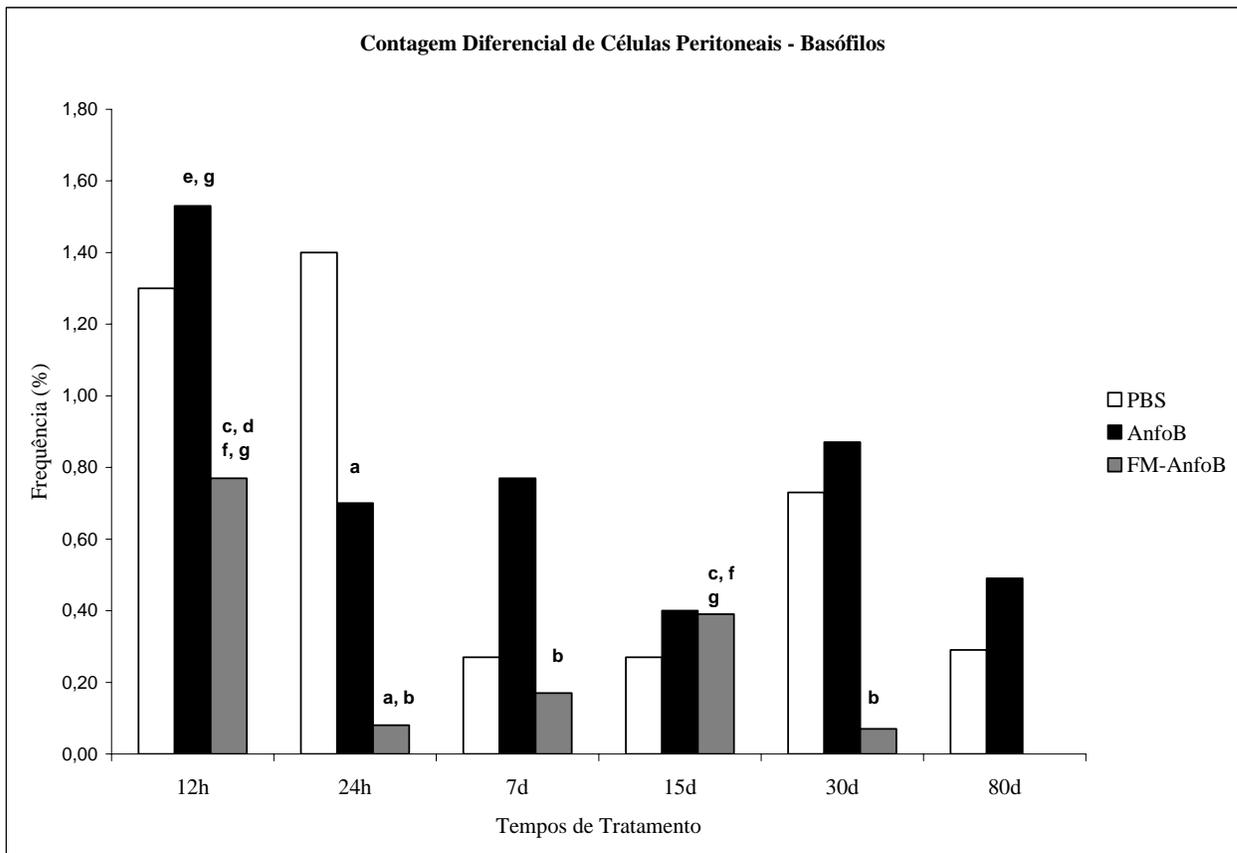


Figura 16: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a contagem de células peritoneais, basófilos. (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p= 0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação a AnfoB, c - diferença em relação ao mesmo tratamento em 1d, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 7d, e - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15d, f - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d p, g - diferença em relação ao mesmo tratamento em 80d.

4.5 Viabilidade de células peritoneais

A figura 17 mostra que diferenças significativas dos tratamentos em relação ao controle só foram encontradas nos tratamentos por 7 dias com a amostra AnfoB e por 12 horas com FM-AnfoB.

Diferença significativa entre os tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB foi observada apenas em 12 horas. No intervalo 1-80 dias não houve alterações significativas entre os tratamentos (Figura 17).

O tratamento com AnfoB gerou alterações significativas, ao longo do tempo. O tratamento mais longo provocou uma redução na contagem de células vivas quando comparado com 12 horas, 1, 7 e 15 dias de tratamento e, por sua vez, a viabilidade celular no tratamento por 30 dias foi significativamente menor do que em 7 e 15 dias (Figura 17).

Alterações significativas foram também observadas no tratamento com FM-AnfoB ao longo do tempo. A contagem de células viáveis no tratamento com duração de 7 dias foi maior do que a de 12 horas, 30 e 80 dias. Em 15 dias de administração os valores encontrados são maiores do que 12 horas, 1, 30 e 80 dias (Figura 17).

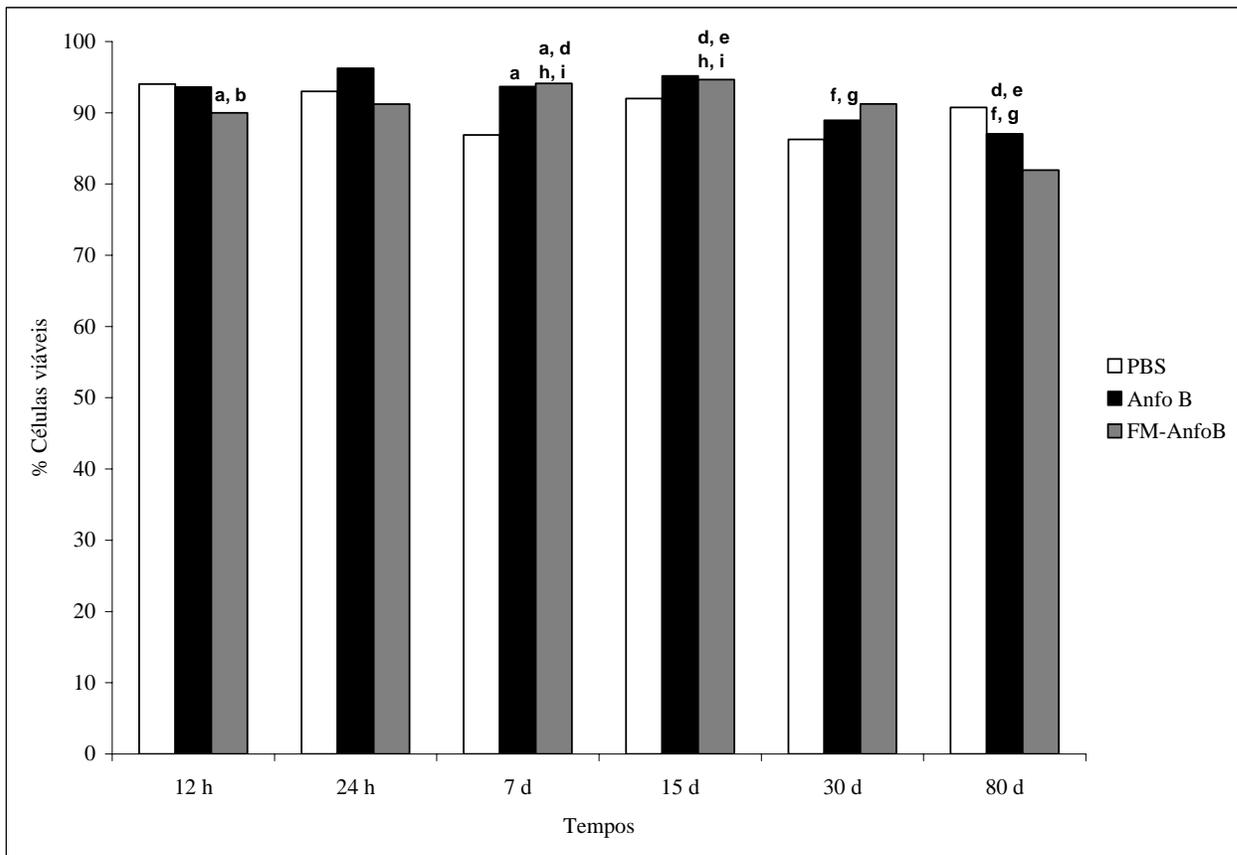


Figura 17: Efeito da administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB sobre a viabilidade das células peritoneais. (PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p=0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação a AnfoB, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 12h, e - diferença em relação ao mesmo tratamento em 1d, f - diferença em relação ao mesmo tratamento em 7d, g - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15d, h - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d, i - diferença em relação ao mesmo tratamento em 80d.

4.6 Ensaio de micronúcleo

O ensaio de micronúcleo é muito utilizado para avaliar os potenciais efeitos genotóxicos e citotóxicos das substâncias nas células da medula óssea. Enquanto os efeitos genotóxicos são analisados pela quantidade de micronúcleos gerados em eritrócitos policromáticos e

normocromáticos, os citotóxicos são obtidos pela frequência de eritrócitos policromáticos (EPC). Este experimento foi realizado nos tempos de tratamento de 1, 7, 15, 30 e 80 dias.

4.6.1 Avaliação da genotoxicidade de AnfoB e FM-AnfoB

Foi utilizado o grupo controle positivo que recebeu ciclofosfamida (40mg/Kg), uma substância potencialmente genotóxica, a fim de validar todas as etapas do experimento. A contagem de EPC nos animais tratados com ciclofosfamida foi aproximadamente de 33,2 e comparada com todos os tratamentos e tempos foi significativamente maior (Figura 18), permitindo concluir que o teste foi realizado corretamente. Nos ENC a ciclofosfamida não induziu aumento significativo de micronúcleos (Figura 19).

Aumentos significativos nos valores de micronúcleos em EPC em relação ao controle foram observadas em 30 e 80 dias, nos animais tratados com AnfoB. Nestes mesmos tempos observa-se diferenças entre os tratamentos, uma vez que nos animais tratados com FM-AnfoB não ocorreu aumento de MNEPC (Figura 18). As frequências de micronúcleos em EPC observadas nestes tratamentos por 30 e 80 dias (respectivamente 5,5 e 4,85) foram também significativamente maiores (Figura 18), que as encontrados nos tempos de 1, 7 e 15 dias (respectivamente 2; 1,33 e 0,5).

Na análise da quantidade de micronúcleos em ENC, não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle e nem sequer entre os tratamentos com as duas amostras. Ao analisar as mudanças no decorrer do tempo houve diferença significativa na quantidade de micronúcleos de ENC após 30 e 80 dias de tratamento com AnfoB, quando comparada com os tempos de 7 e 15 dias (Figura 19).

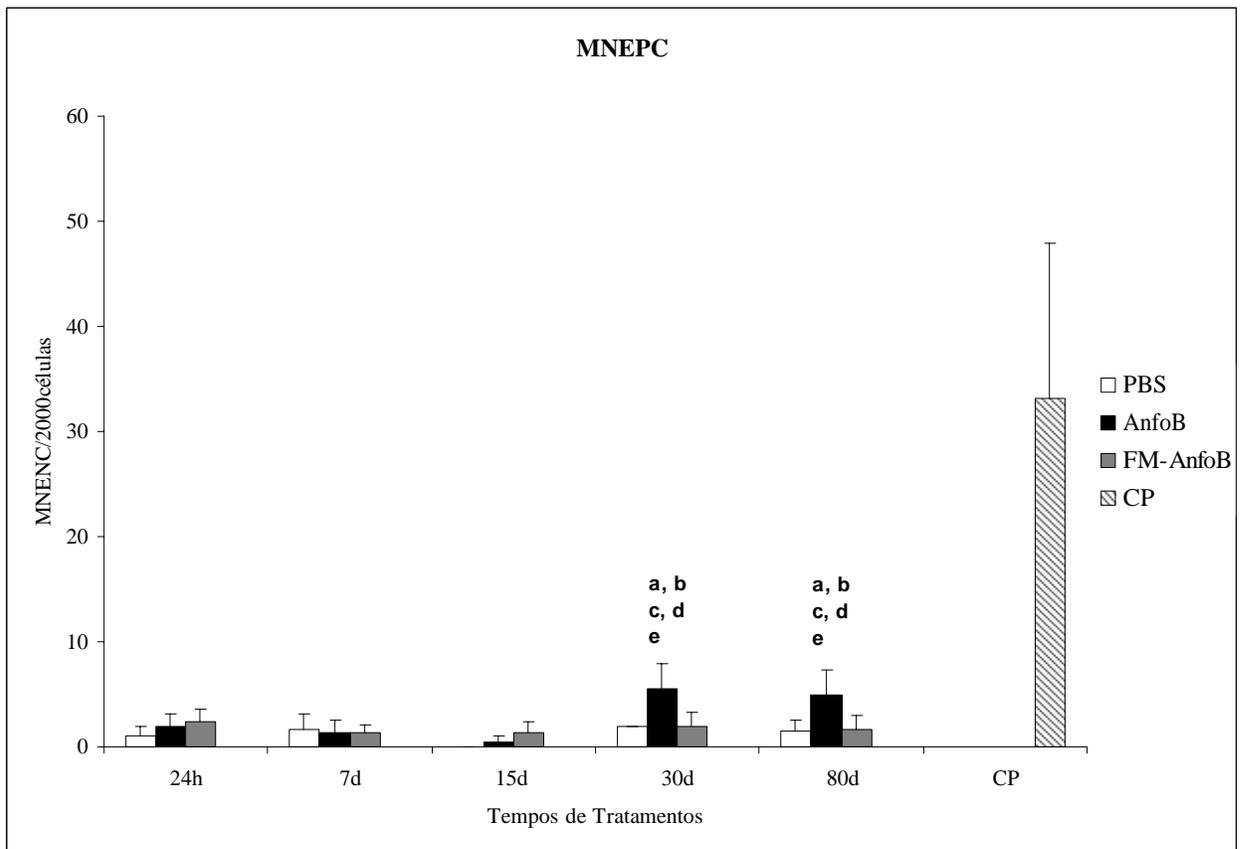


Figura 18: Avaliação da genotoxicidade de AnfoB e FM-AnfoB em EPC. A barra indica o desvio padrão. (MNEPC – Micronúcleos em Eritrócitos Policromáticos, h - horas, d – dias, CP – Controle Positivo, PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p=0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação a AnfoB, c - diferença em relação ao mesmo tratamento em 1 d, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 7d, e - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15d.

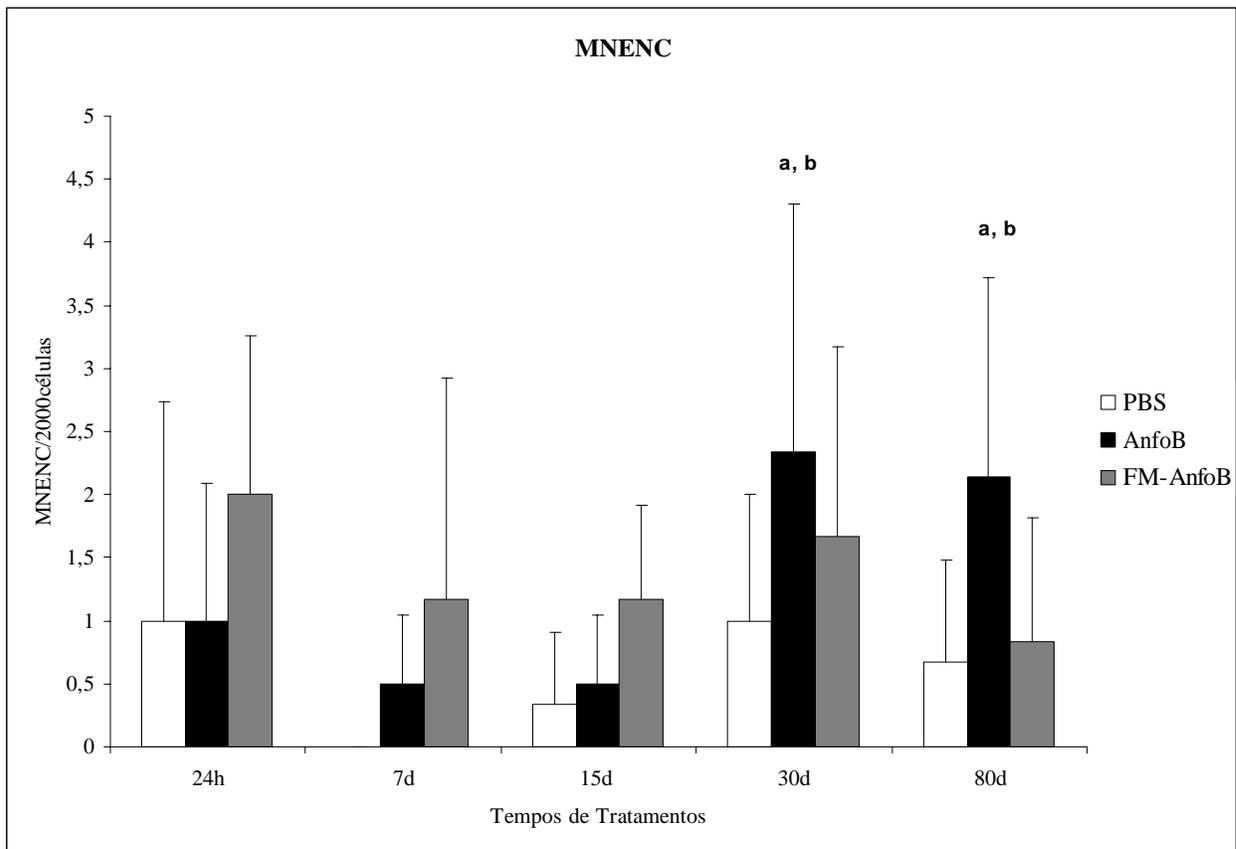


Figura 19: Avaliação da genotoxicidade de AnfoB e FM-AnfoB em ENC. A barra indica o desvio padrão. (MNENC – Micronúcleos em Eritrócitos Normocromáticos, h - horas, d – dias, CP – Controle Positivo, PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p=0,05$): a – diferença em relação ao mesmo tratamento em 7 dias, b - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15 dias.

4.6.2 Avaliação da citotoxicidade de AnfoB e FM-AnfoB

O tratamento com AnfoB não alterou a frequência de eritrócitos policromáticos em nenhum dos tempos analisados comparando-os com o controle, no entanto o tratamento de maior duração, 80 dias com FM-AnfoB induziu citotoxicidade significativa nos eritrócitos policromáticos (Figura 20).

Ao analisar o tratamento com FM-AnfoB ao longo dos tempos foi possível notar que no primeiro dia de tratamento e em 80 dias o valor de EPC estava significativamente menor do que o observado nos tempos de 7, 15 e 30 dias (Figura 20).

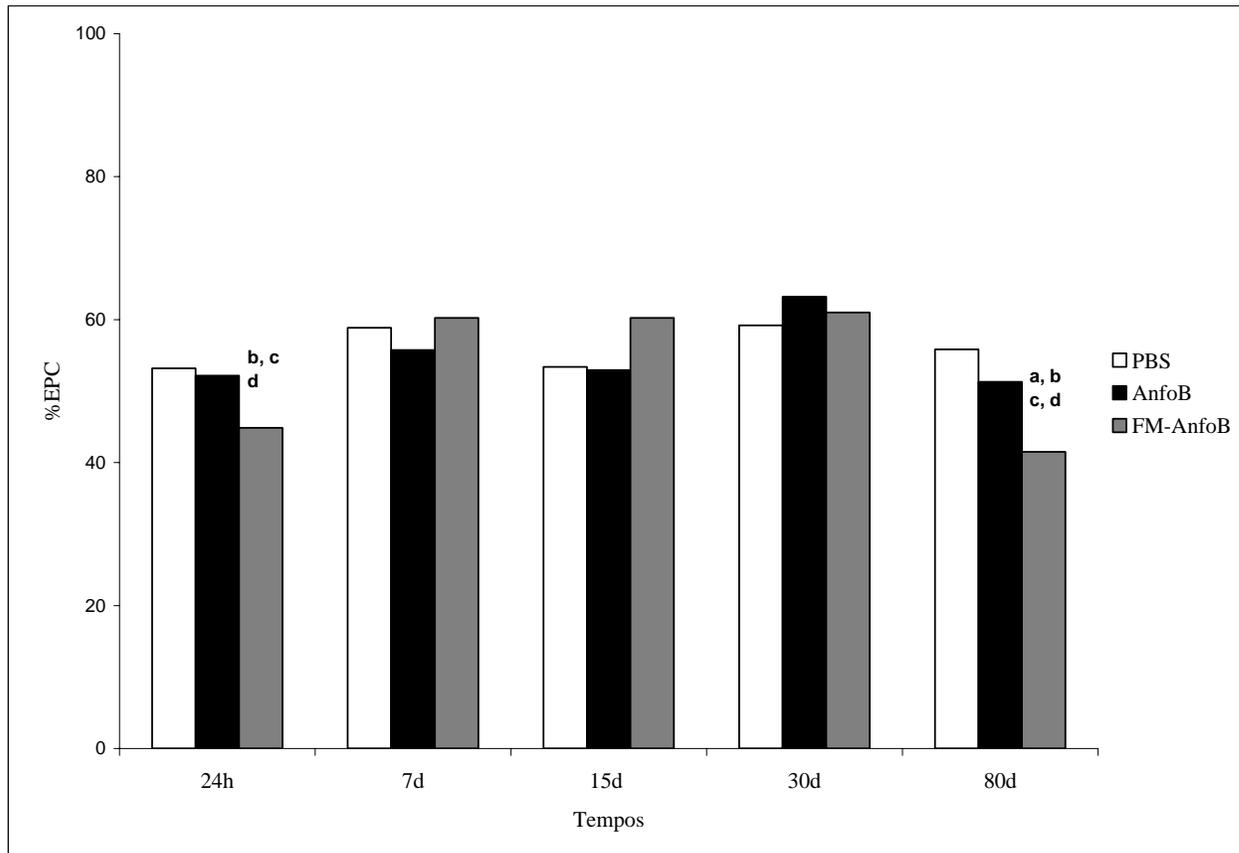


Figura 20: Avaliação da citotoxicidade de AnfoB e FM-AnfoB. A barra indica o desvio padrão. (EPC - Eritrócitos Policromáticos, h - horas, d – dias, CP – Controle Positivo, PBS – Tampão PBS). As letras apontam diferenças significativas ($p= 0,05$): a – diferença em relação ao controle, b – diferença em relação ao mesmo tratamento em 7 d, c - diferença em relação ao mesmo tratamento em 15 d, d - diferença em relação ao mesmo tratamento em 30d.

4.7 Análise Histológica

Os órgãos rim, pulmão, fígado e baço foram analisados por microscopia de luz, utilizando duas diferentes técnicas de coloração. Na coloração de hematoxilina-eosina é possível avaliar a organização estrutural dos órgãos e verificar a presença de aglomerados de nanopartículas, que aparecem na cor marrom. Na coloração de Perls, em conjunto com uma contracoloração, o vermelho rápido nuclear, é possível identificar ferro em forma de grânulos no interior das células e, por este método, os aglomerados de nanopartículas são azuis.

4.7.1 Rim

Aglomerados de nanopartículas magnéticas não foram encontrados nos rins, em nenhum dos tempos analisados com ambas as colorações utilizadas. A cápsula do órgão, os túbulos, a cápsula de Bowman e os glomérulos estavam normais em todos os tempos e tratamentos. Apesar disso, infiltrados inflamatórios foram encontrados (Figura 21 e 22). Nos tempos analisados, com exceção em 30 dias de experimento (Figura 22), os animais do grupo controle apresentaram infiltrados inflamatórios em algumas regiões do órgão, próximo a arteríola e veias na porção cortical e medular (Figura 21 e 22). Em 12 horas após tratamento um animal que recebeu AnfoB apresentou um pequeno processo inflamatório próximo a vênula entre a região cortical e medular e (dado não mostrado) no tratamento com FM-AnfoB nenhuma alteração foi encontrada (Figura 23).

No grupo analisado 24 horas após a administração de FM-AnfoB um leve processo inflamatório foi encontrado em dois animais sendo este sem associação com nanopartículas (Figura 24). A mesma alteração foi encontrada em dois animais que receberam o tratamento de 7 dias com FM-AnfoB e nos tratados com AnfoB (Figura 25).

Em 15 dias de tratamento foi visualizada inflamação perivascular em todos os grupos tratados (Figura 26). No tratamento de 30 dias todos os animais apresentaram a estrutura do órgão normal (Figura 27 a e b), e ausência de nanopartículas no grupo tratado com FM-AnfoB nesses dois tempos.

O tratamento de maior duração, 80 dias, nos animais tratados com AnfoB processos inflamatórios foram visualizados próximo a vasos, a glomérulos e na região cortical, no entanto

um animal apresentou processo inflamatório perivascular severo (Figura 27 c e d). No tratamento com FM-AnfoB todos os animais apresentaram processo inflamatório moderado associado a vasos (Figura 27 e, f e g).

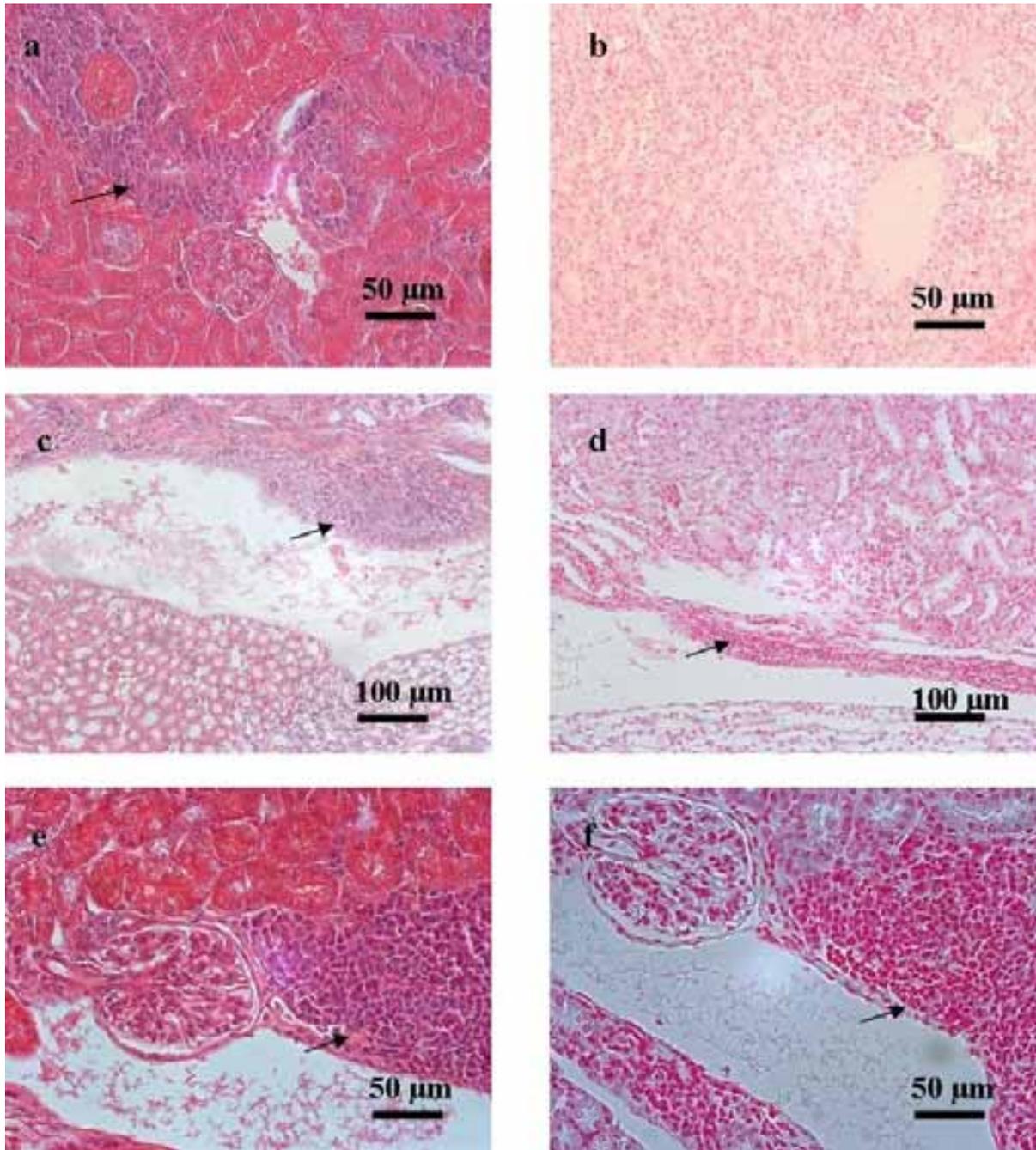


Figura 21: Fotomicrografias de rim de animais controle durante 12 horas (a, b), 24 horas (c, d) e 7 dias (e, f). As setas indicam infiltrado inflamatório. Em a, c e e coloração HE e b, d e f coloração de Perls.

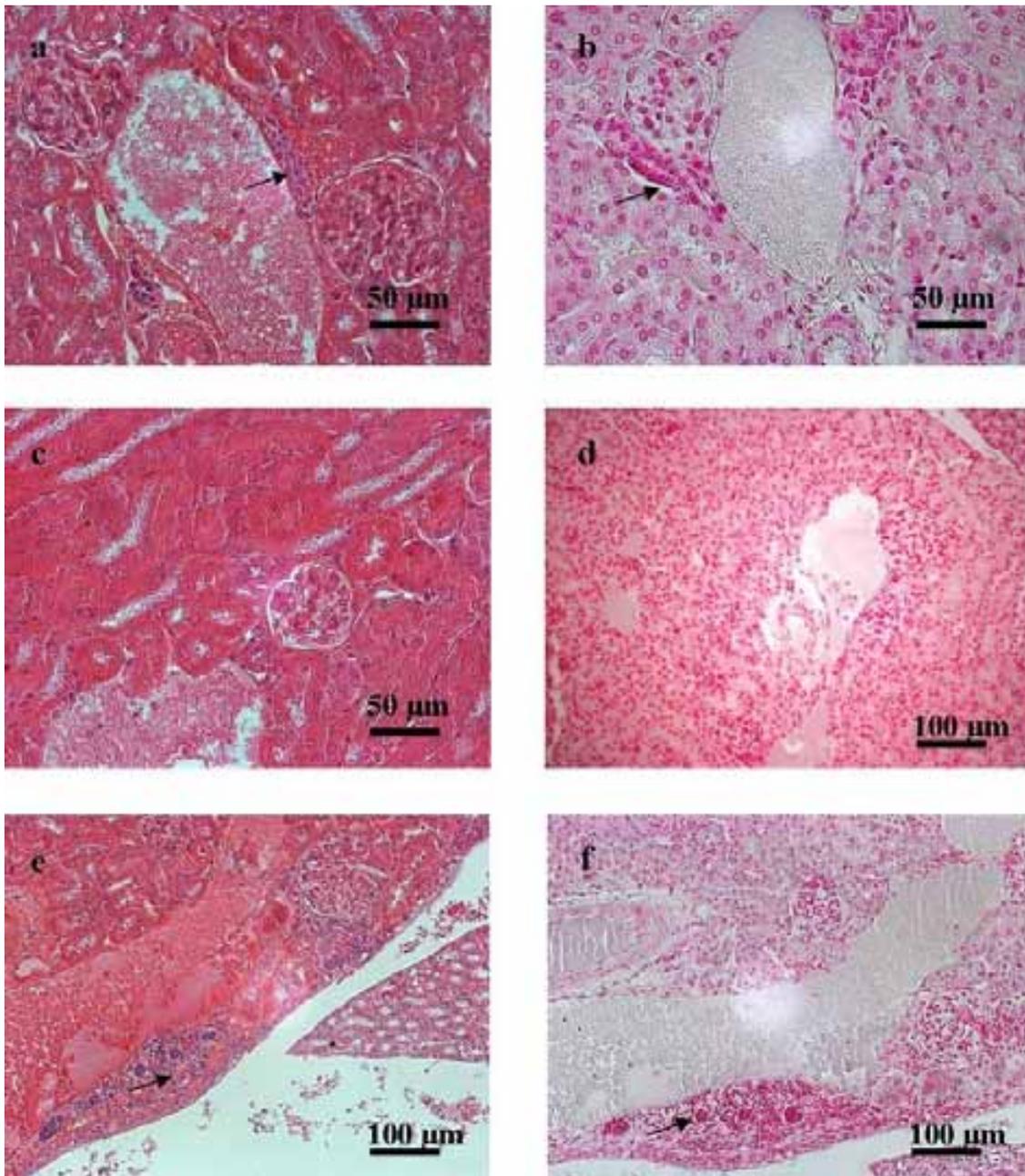


Figura 22: Fotomicrografias de rim de animais controle durante 15 dias (a, b), 30 dias (c, d) e 80 dias (e, f). As setas indicam infiltrado inflamatório. Em a, c e e coloração HE e b, d e f coloração de Perls.

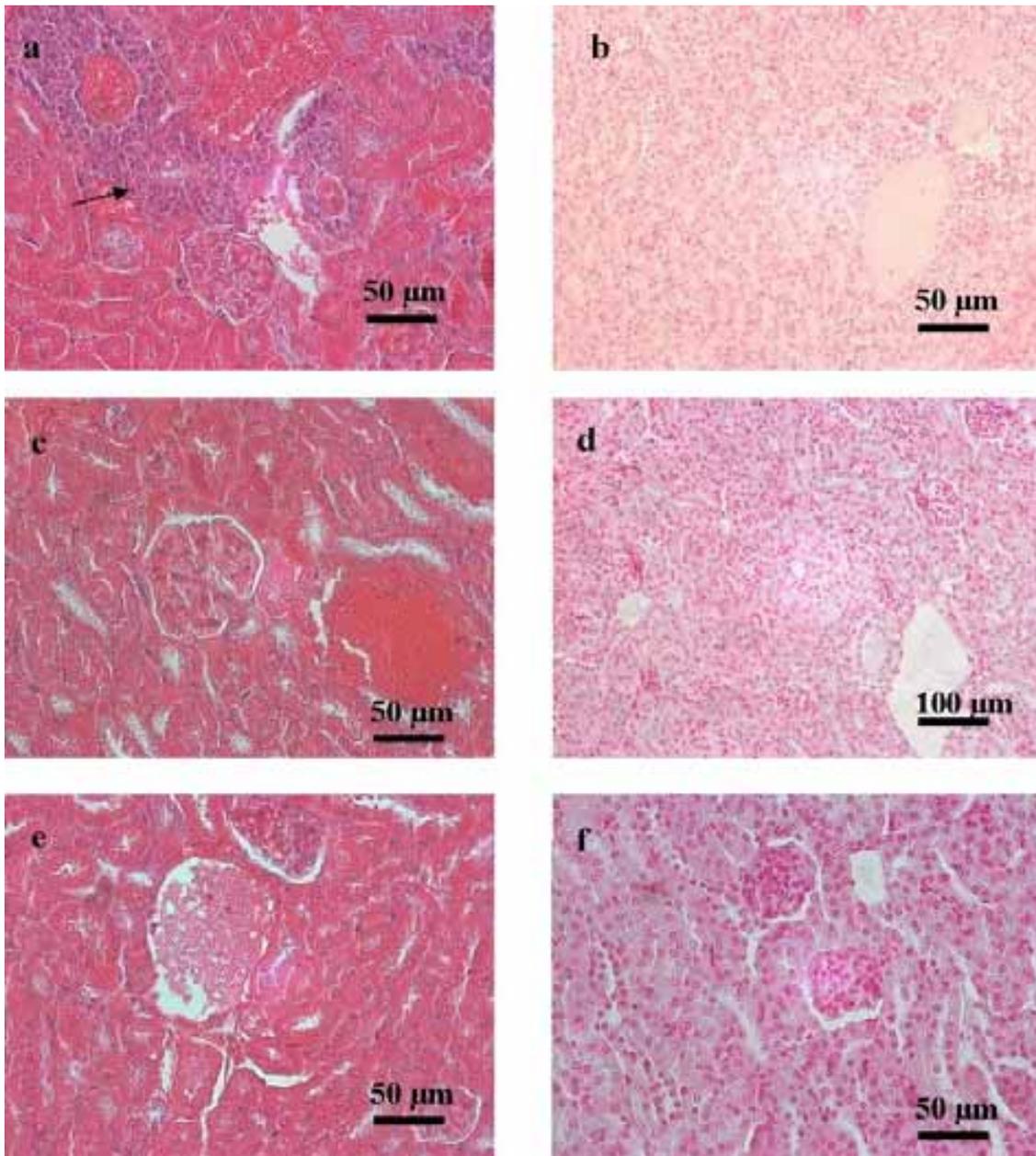


Figura 23: Fotomicrografias de rim no tratamento por 12 horas. Controle (a, b), AnfoB (c, d) e FM-AnfoB (e, f). As setas indicam infiltrado inflamatório. Em a, c e e coloração HE e b, d e f coloração de Perls.

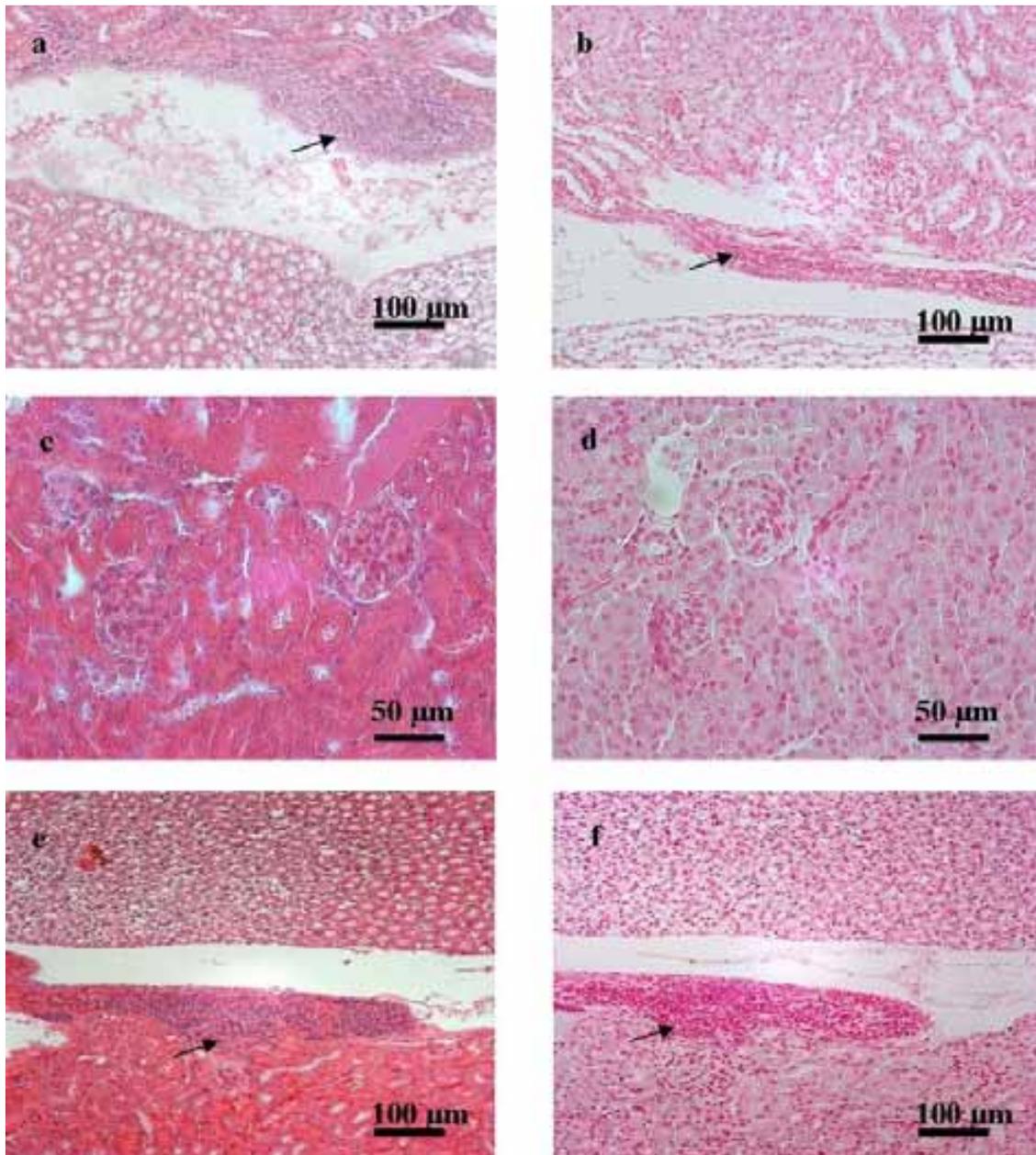


Figura 24: Fotomicrografias de rim no tratamento por 24 horas. Controle (a, b), AnfoB (c, d) e FM-AnfoB (e, f). As setas indicam infiltrado inflamatório. Em a, c e e coloração HE e b, d e f coloração de Perls.

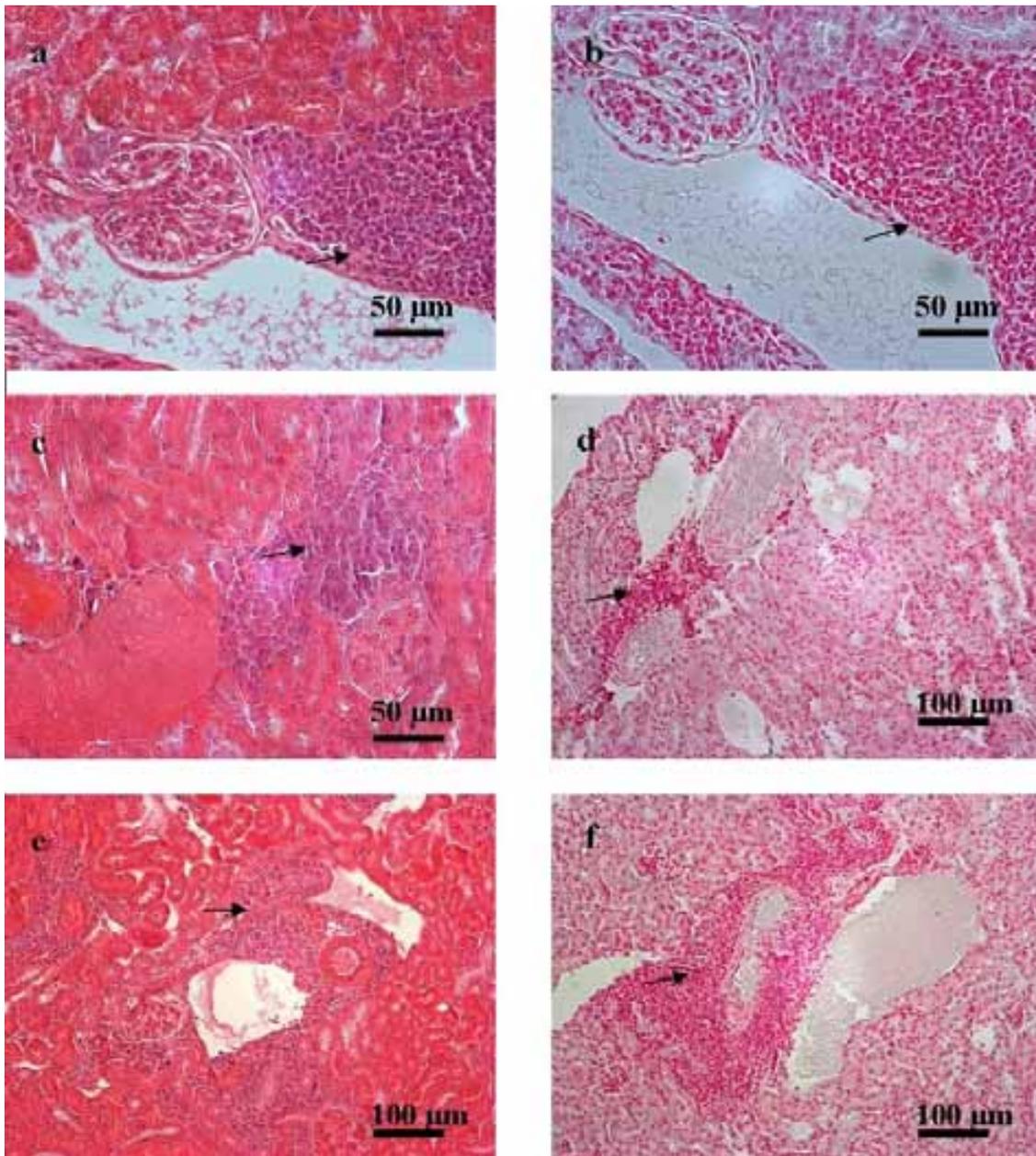


Figura 25: Fotomicrografias de rim no tratamento por 7 dias. Controle (a, b), AnfoB (c, d) e FM-AnfoB (e, f). As setas indicam infiltrado inflamatório. Em a, c e e coloração HE e b, d e f coloração de Perls.

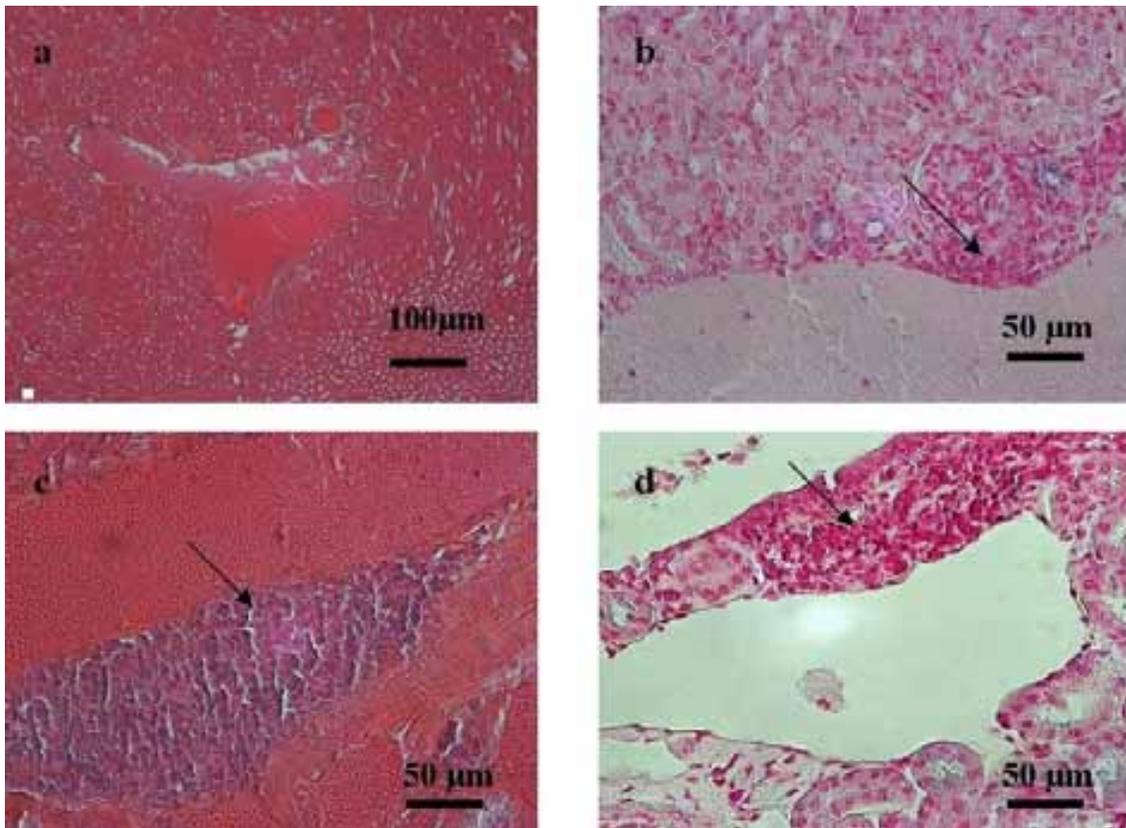


Figura 26: Fotomicrografias de rim no tratamento por 15 dias. AnfoB (a, b) e FM-AnfoB (c, d). As setas indicam infiltrado inflamatório. Em a e c coloração HE e b e d coloração de Perls.

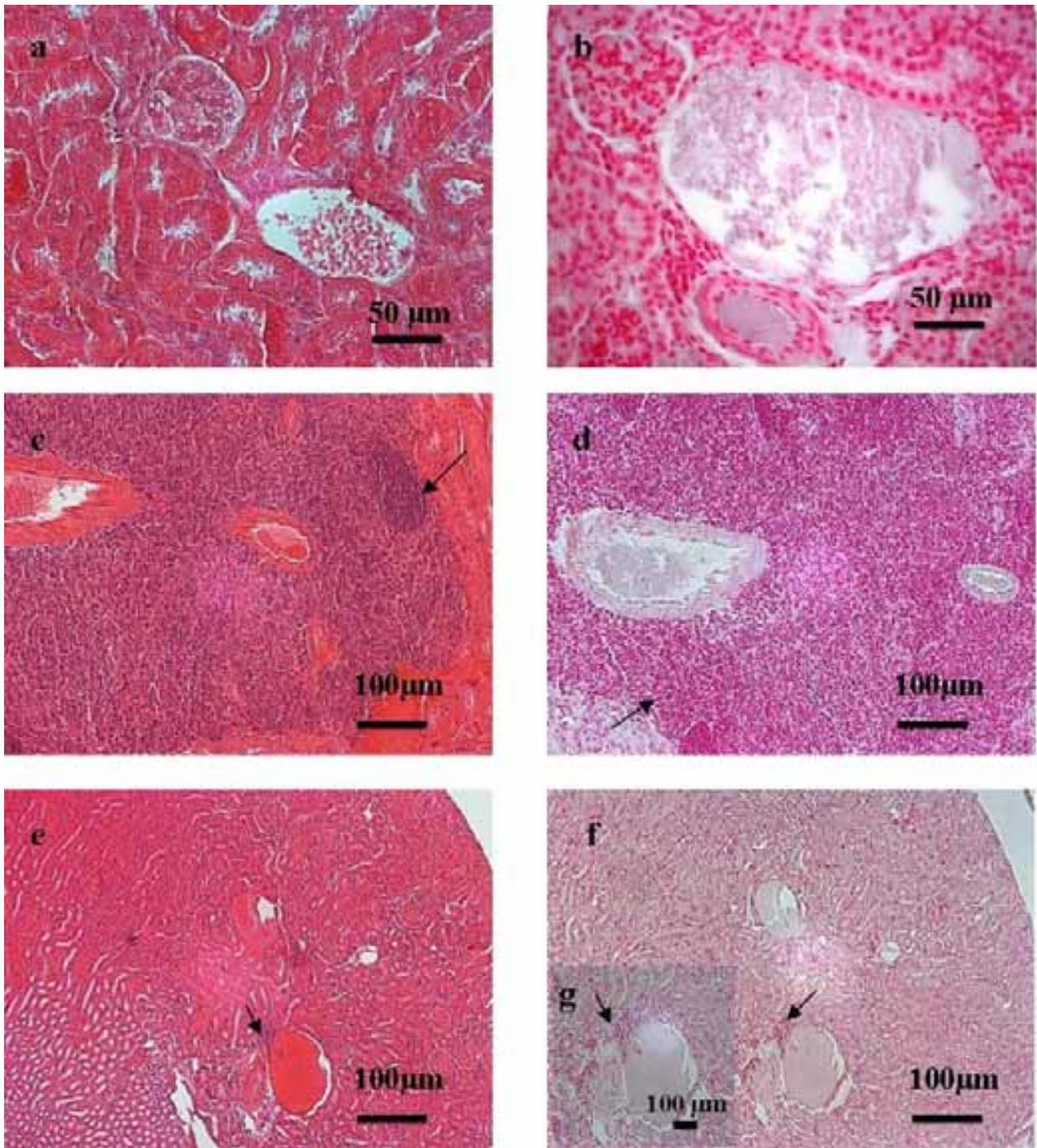


Figura 27: Fotomicrografias de rim no tratamento por 30 e 80 dias. FM-AnfoB em 30 dias (a, b), AnfoB em 80 dias (c, d) e FM-anfoB em 80 dias (e, f e g). As setas indicam infiltrado inflamatório. Em a, c e e, coloração HE e b, d, f e g, coloração de Perls.

4.7.2 Baço

O baço é um órgão caracterizado por duas funções, a linfóide e a vascular, formado pela polpa branca composta por folículos linfáticos, circundados pela polpa vermelha. Os tratamentos não provocaram alteração histológica em nenhum tempo e a polpa vermelha foi facilmente diferenciada da polpa branca.

Em todos os tempos, nos animais controle, aglomerados marrons foram visualizados na coloração de HE, em maior quantidade na polpa vermelha que na branca. Isto foi confirmado pela presença de aglomerados azuis na coloração de Perls, o que evidencia a existência de ferro endógeno no órgão. Aspecto similar ao do controle (Figura 28) foi observado 12 horas após o tratamento com Anfo B ou com FM-AnfoB.

Após 24 horas, 7, 15 e 30 dias de tratamento o padrão encontrado no controle foi notado também nos animais tratados com AnfoB (Figura 29 e 30 a e b), no entanto nos animais tratados com FM-AnfoB foi observado um pequeno aumento na quantidade de aglomerados marrons e azuis (Figura 31 e 32 a e b) na polpa vermelha e branca (+). Sugerindo um acúmulo de nanopartículas nesse órgão.

Em 80 dias de tratamento o grupo tratado com AnfoB estava com aspecto similar ao apresentado pelo grupo controle (Figura 30 c e d) e em um animal do grupo FM-AnfoB apresentou ferro endógeno (Figura 32 c e d) na polpa branca em maior quantidade (+) comparado ao controle.

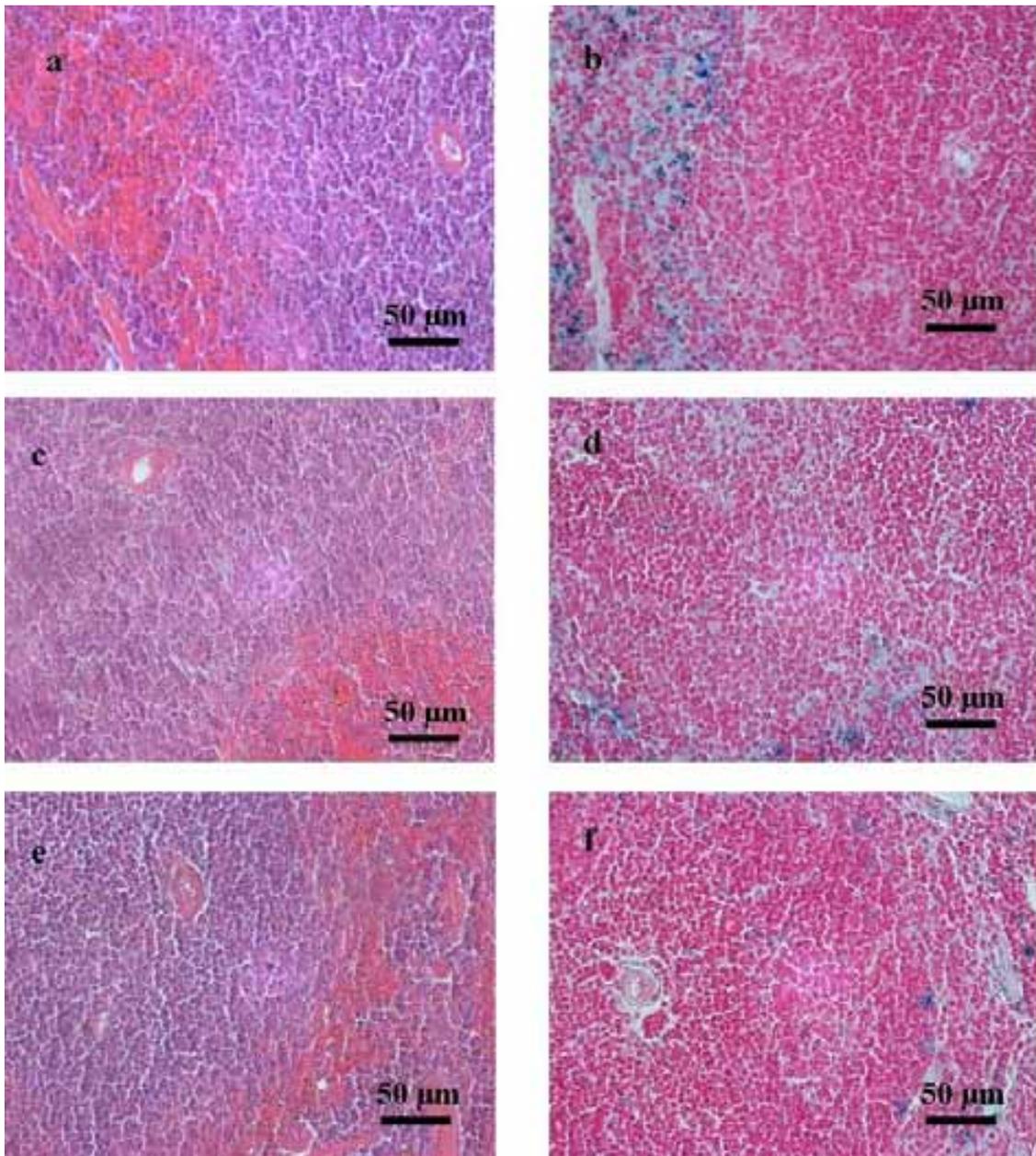


Figura 28: Fotomicrografia de baço dos animais tratados por 12 horas. Controle (a, b), AnfoB (c, d) e FM-AnfoB (e, f). Em a, c e e coloração HE e b, d e f coloração de Perls.

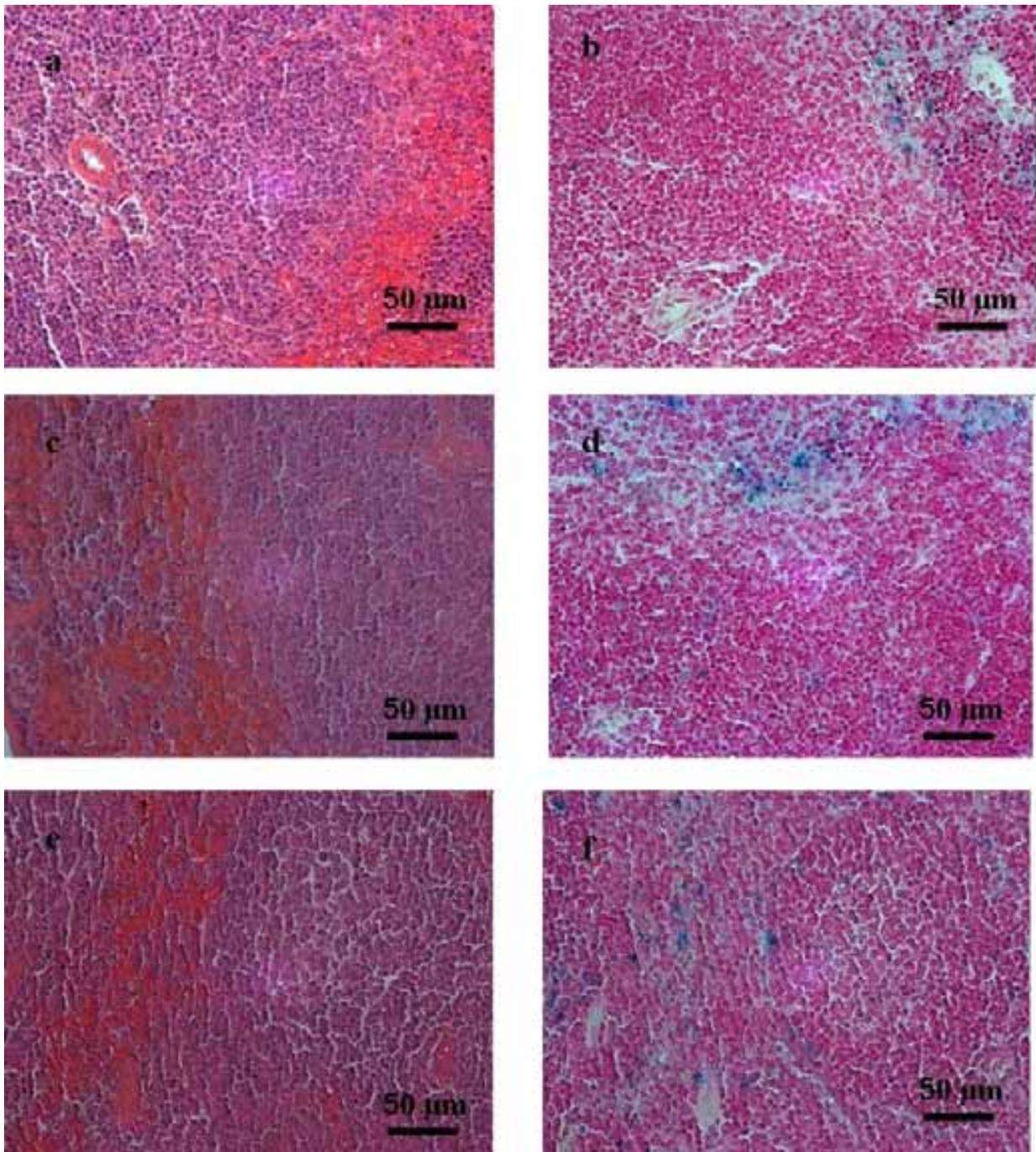


Figura 29: Fotomicrografia de baço dos animais tratados com AnfoB. Tempos 24 horas (a, b), 7 dias (c, d) e 15 dias (e, f). Em a, c e e coloração HE e b, d e f coloração de Perls.

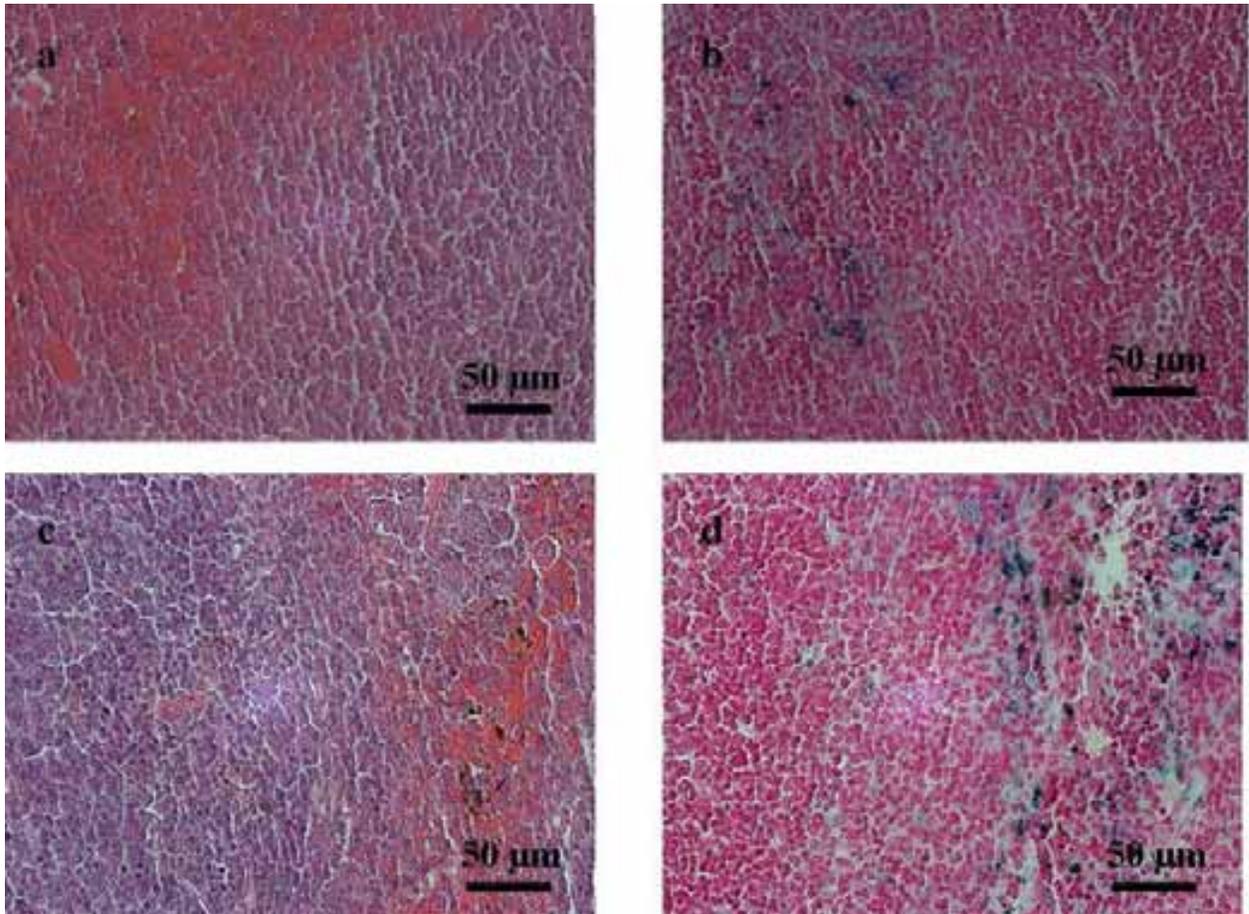


Figura 30: Fotomicrografia de baço dos animais tratados com AnfoB. Tempos 30 dias (a, b), 80 dias (c, d). Em a, c coloração HE e b, d coloração de Perls.

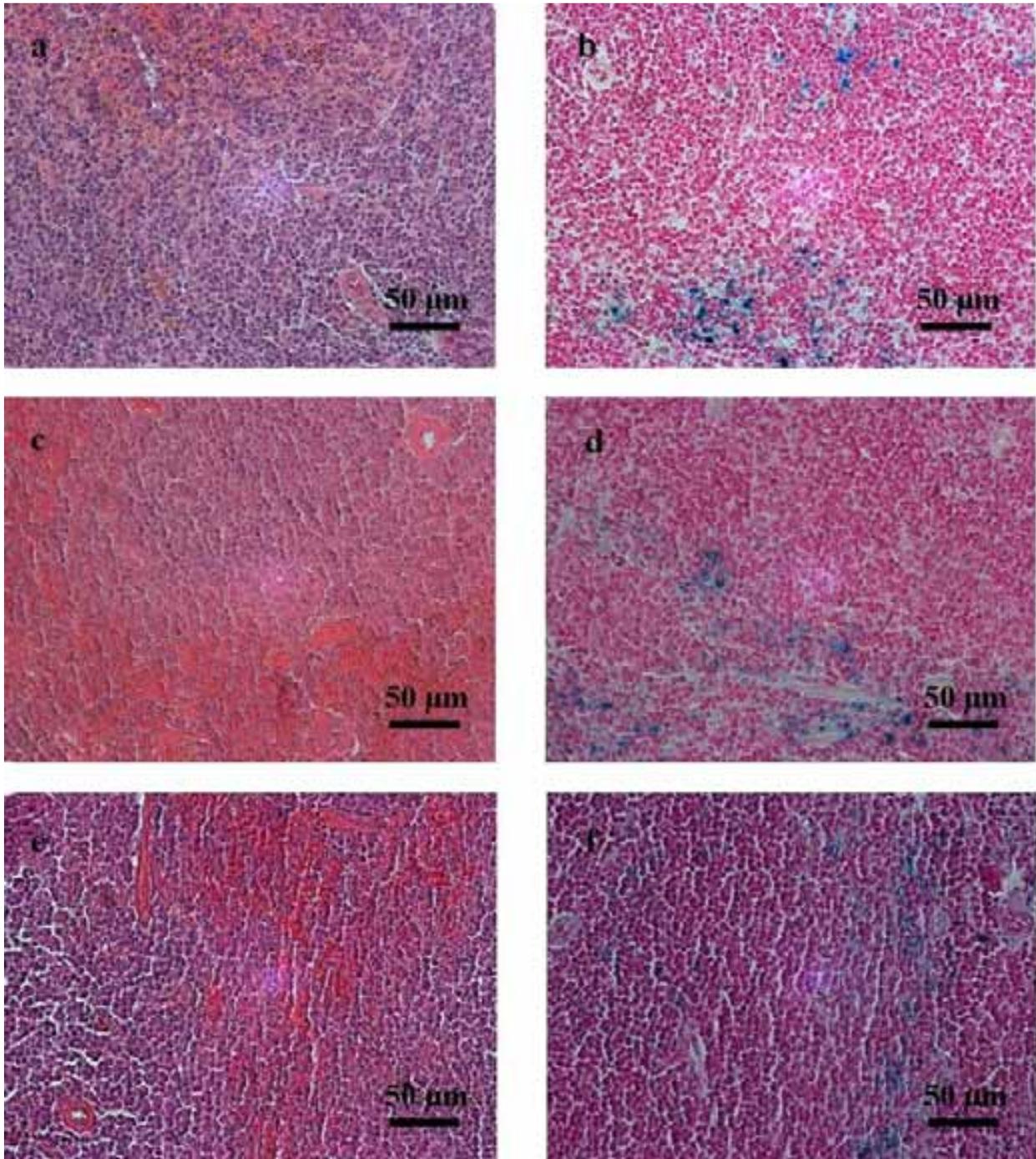


Figura 31: Fotomicrografia de baço dos animais tratados com FM-AnfoB. Tempos 24 horas (a, b), 7 dias (c, d) e 15 dias (e, f). Em a, c, e coloração HE e b, d, f coloração de Perls.

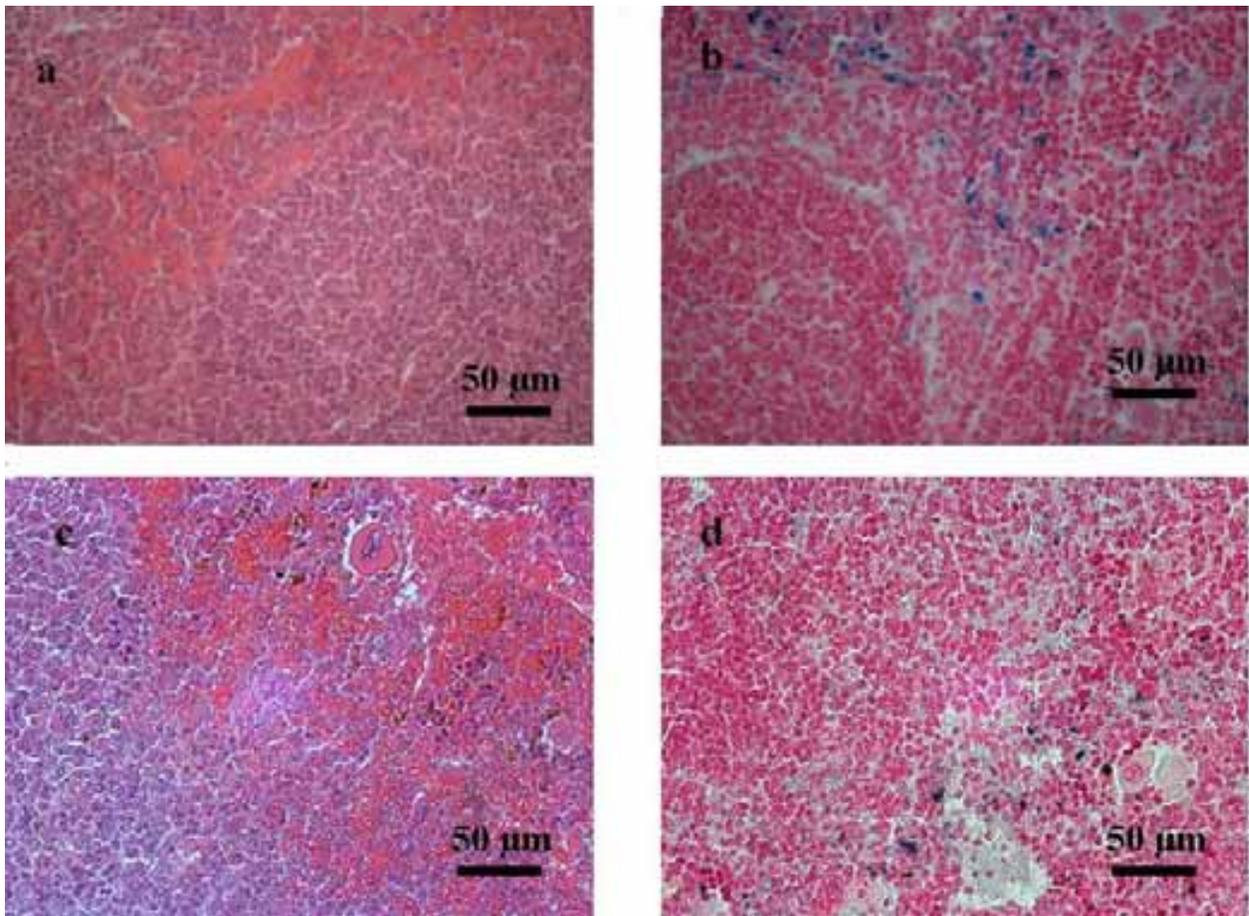


Figura 32: Fotomicrografia de baço dos animais tratados com FM-AnfoB. Tempos 30 dias (a, b), 80 dias (c, d). Em a, c coloração HE e b, d coloração de Perls.

4.7.3 Fígado

O fígado dos animais do grupo controle teve a cápsula, parênquima, lóbulos e hepatócitos preservados e não foram encontrados aglomerados de nanopartículas.

Em 12 horas, 7 e 15 dias de tratamento nenhuma alteração e aglomerados de nanopartículas foram observados nos grupos analisados (Figura 33 e 34). Após 24 horas de tratamento em 2 animais tratados com AnfoB foi encontrado pequenos processos inflamatórios associados ao ducto biliar (Figura 35 c e d), o mesmo aconteceu em 1 animal tratado com FM-AnfoB. Aglomerados de nanopartículas (+) foram encontrados no interior dos hepatócitos de um animal tratado com FM-AnfoB (dado não mostrado).

No grupo analisado 30 dias após o tratamento todos os animais tratados com AnfoB apresentaram processos inflamatórios (++) no parênquima e próximo a hepatócitos (Figura 36 a e b). No tratamento com FM-AnfoB pequenos processos inflamatórios foram encontrados próximo à veia sublobular, centrolobular, ducto biliar e espaço porta (Figura 36 c e d).

Após 80 dias de tratamento um animal tratado com AnfoB apresentou um pequeno processo inflamatório associado a vaso e três animais que receberam FM-AnfoB apresentaram processo inflamatório próximo a veia e associado a aglomerados de nanopartículas (Figura 36 e e f), em um animal nenhuma alteração foi encontrada (dado não mostrado) e outro apresentou aglomerado de nanopartículas sem processo inflamatório.

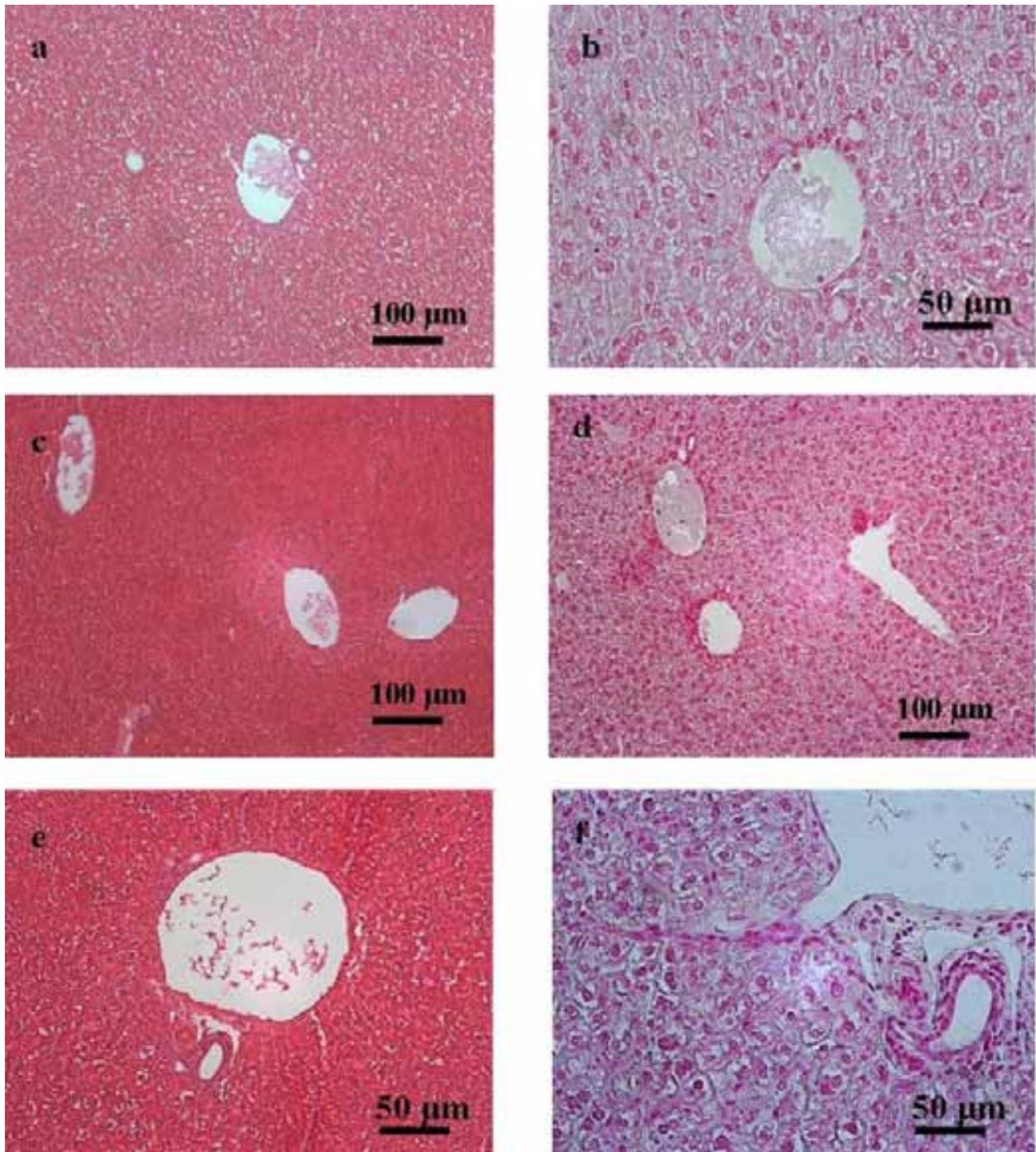


Figura 33: Fotomicrografia de fígado dos animais tratados com AnfoB. Tempos 12 horas (a, b), 7 dias (c, d) e 15 dias (e, f). Em a, c, e coloração HE e b, d, f coloração de Perls.

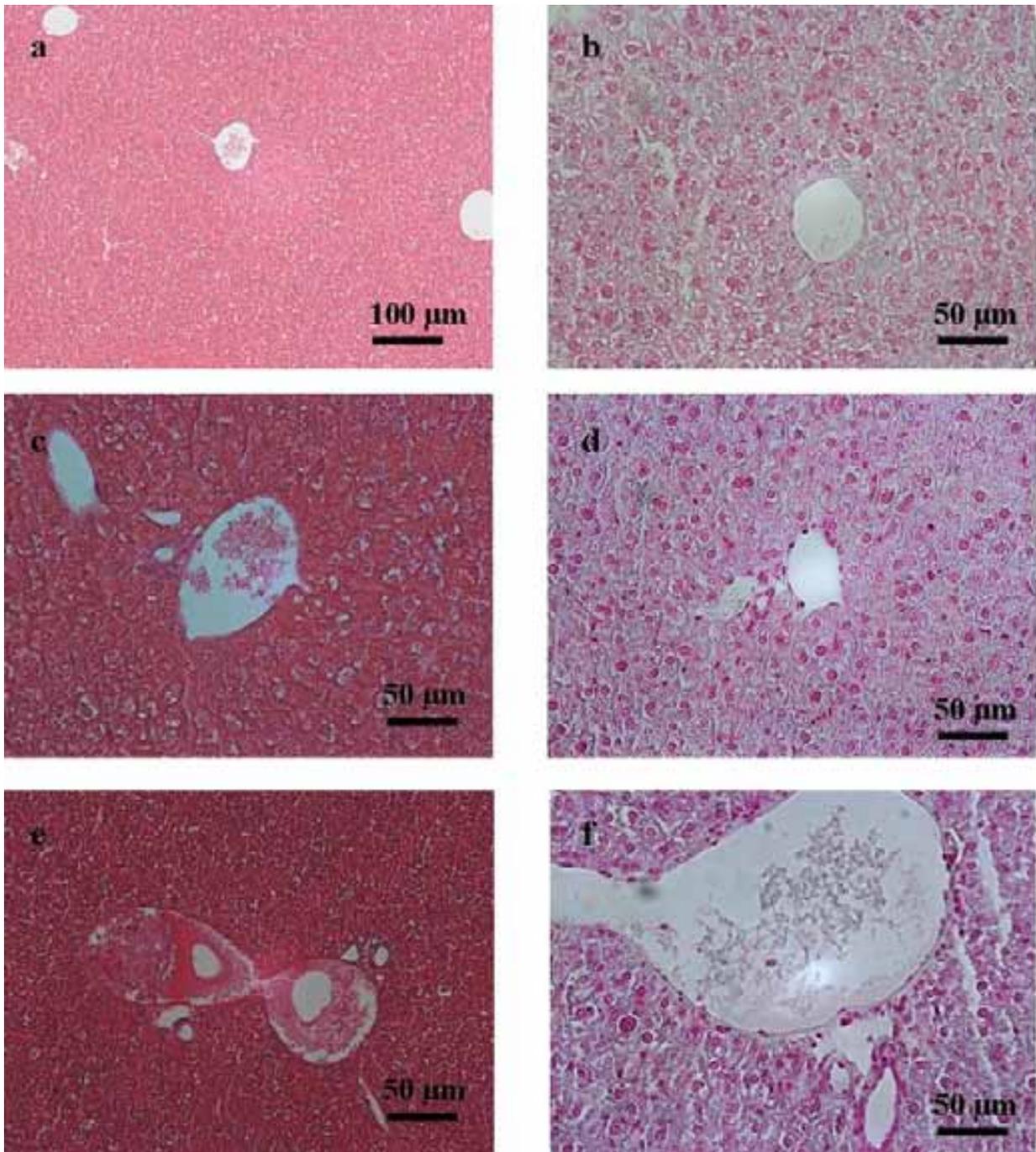


Figura 34: Fotomicrografia de fígado dos animais tratados com FM-AnfoB. Tempos 12 horas (a, b), 7 dias (c, d) e 15 dias (e, f). Em a, c, e coloração HE e b, d, f coloração de Perls.

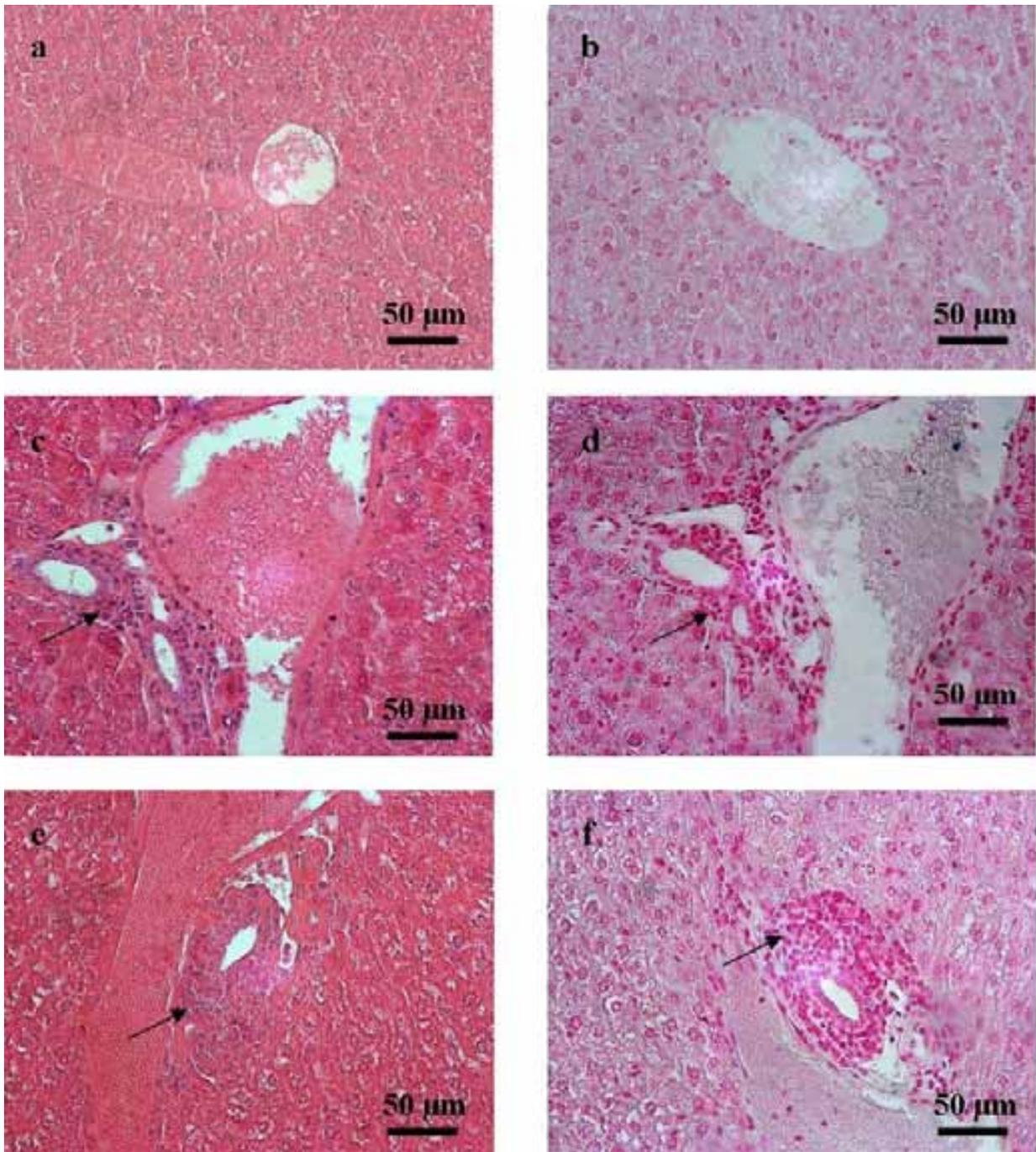


Figura 35: Fotomicrografia de fígado dos animais tratados por 24 horas. Controle (a, b), AnfoB (c, d) e FM-AnfoB (e, f). Em a, c, e coloração HE e b, d, f coloração de Perls. As setas indicam infiltrado inflamatório.

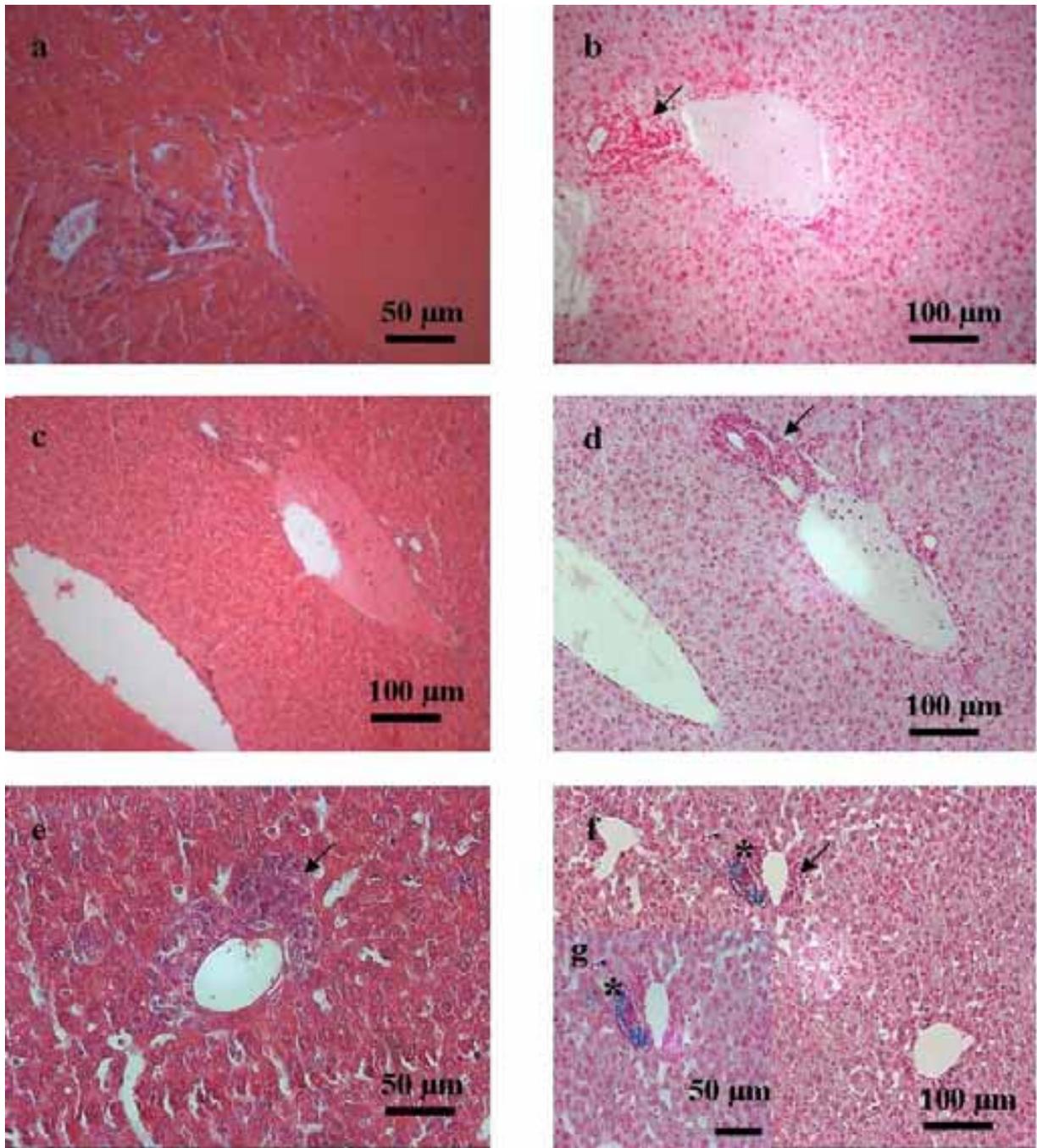


Figura 36: Fotomicrografia de fígado dos animais. AnfoB 30 dias (a, b), FM-AnfoB 30 dias (c, d) e FM-AnfoB 80 dias (e, f e g). Em a, c, e coloração HE e b, d, f e g coloração de Perl's. As setas indicam infiltrado inflamatório e o asterisco aglomerados de nanopartículas.

4.7.4 Pulmão

Nos animais do grupo controle pequenos acúmulos de tecido linfático estavam associados à mucosa, a cápsula do órgão estava normal e o parênquima do pulmão de alguns animais apresentou leve espessamento de tecido conjuntivo, esse padrão foi também observado nos tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB.

Em 12 horas no tratamento com AnfoB nenhuma alteração foi observada, mas no tratamento com FM-AnfoB dois animais apresentaram aglomerados marrons e azuis (+) ao redor de bronquíolo indicando a presença de nanopartículas (Figura 37 a, c e d).

Após 24 horas de tratamento um animal do grupo FM-AnfoB apresentou pequenos aglomerados azuis (+), de nanopartículas, na coloração de perls próximo aos sacos alveolares (Figura 37 e,f), todos os animais tratados com AnfoB foi encontrado um pequeno processo inflamatório.

Nos tratamentos de 7 e 15 dias no grupo FM-AnfoB foram observados aglomerados de nanopartículas (+) em todos os animais junto aos processos inflamatórios perivasculares e próximo aos bronquíolos (Figura 38), o tratamento com AnfoB não induziu alterações.

Em 30 dias de tratamento um animal do grupo AnfoB apresentou vários MALT (Tecido Linfóide Associado à Mucosa) e inflamações perivasculares (++). Em dois animais do grupo FM-AnfoB foi encontrado aglomerado marrom e azul, sendo que em um desses aglomerados azuis estavam próximos a inflamações associadas a vasos sanguíneos e bronquíolos (Figura 39).

Em dois animais do grupo AnfoB, tratados por 80 dias, as paredes estavam espessas com processo inflamatório próximo aos bronquíolos, mais intenso que no grupo controle (Figura 40). No tratamento com FM-AnfoB as paredes alveolares estavam mais espessas com aglomerados marrons no interior de macrófagos. Estes se apresentavam carregados de aglomerados de ferro, encontrados na superfície dos alvéolos e no tecido intersticial dos septos interalveolares. Aglomerados azuis (+++) foram encontrados associados a processos inflamatórios, vasos sanguíneos e bronquíolos (Figura 40 e, f, g).

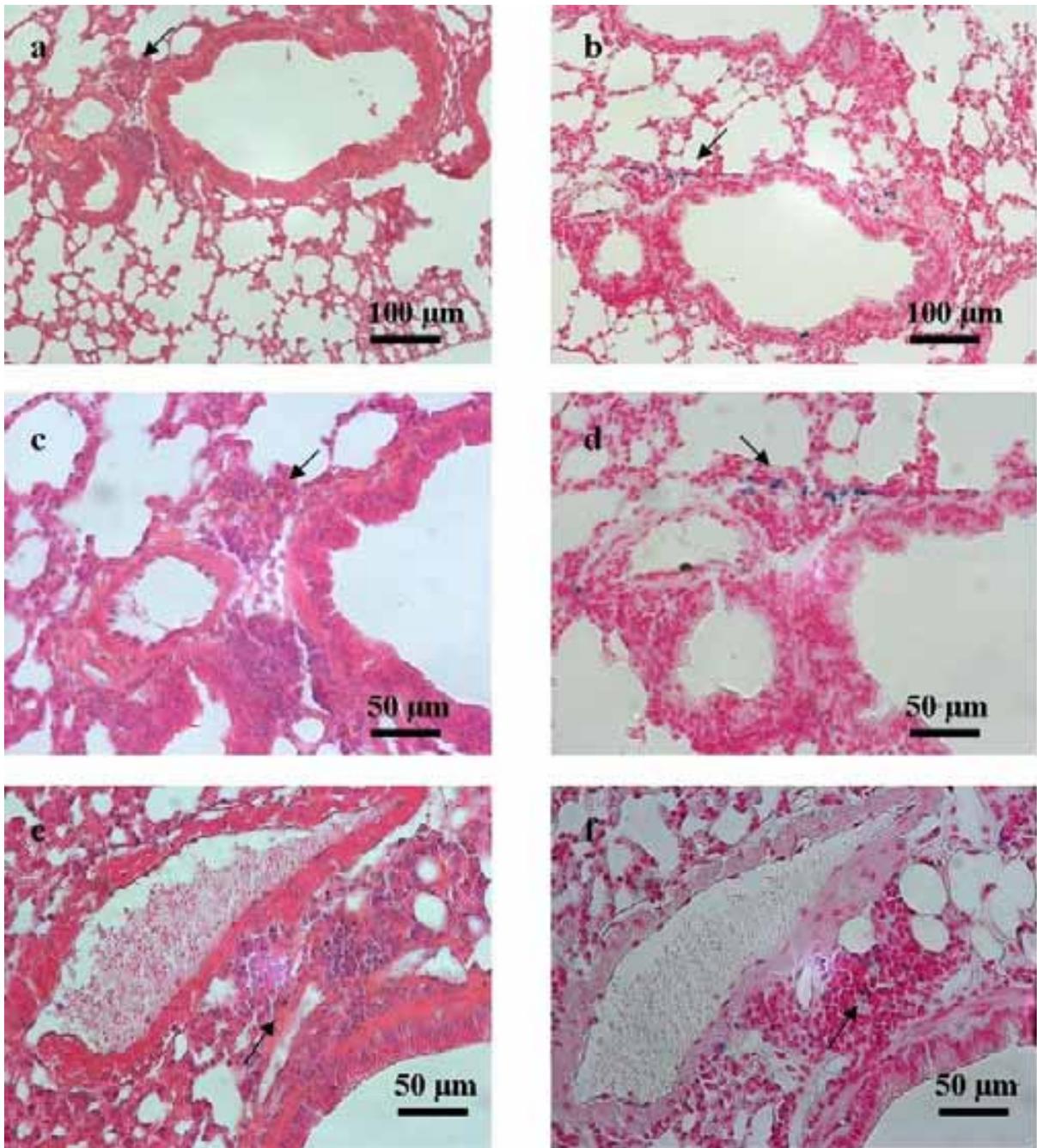


Figura 37: Fotomicrografia de pulmão dos animais tratados com FM-AnfoB. 12 horas (a, b, c e d), 1 dia (e, f). Em a, c, e coloração HE e b, d, f coloração de Perls. As setas indicam aglomerados de nanopartículas.

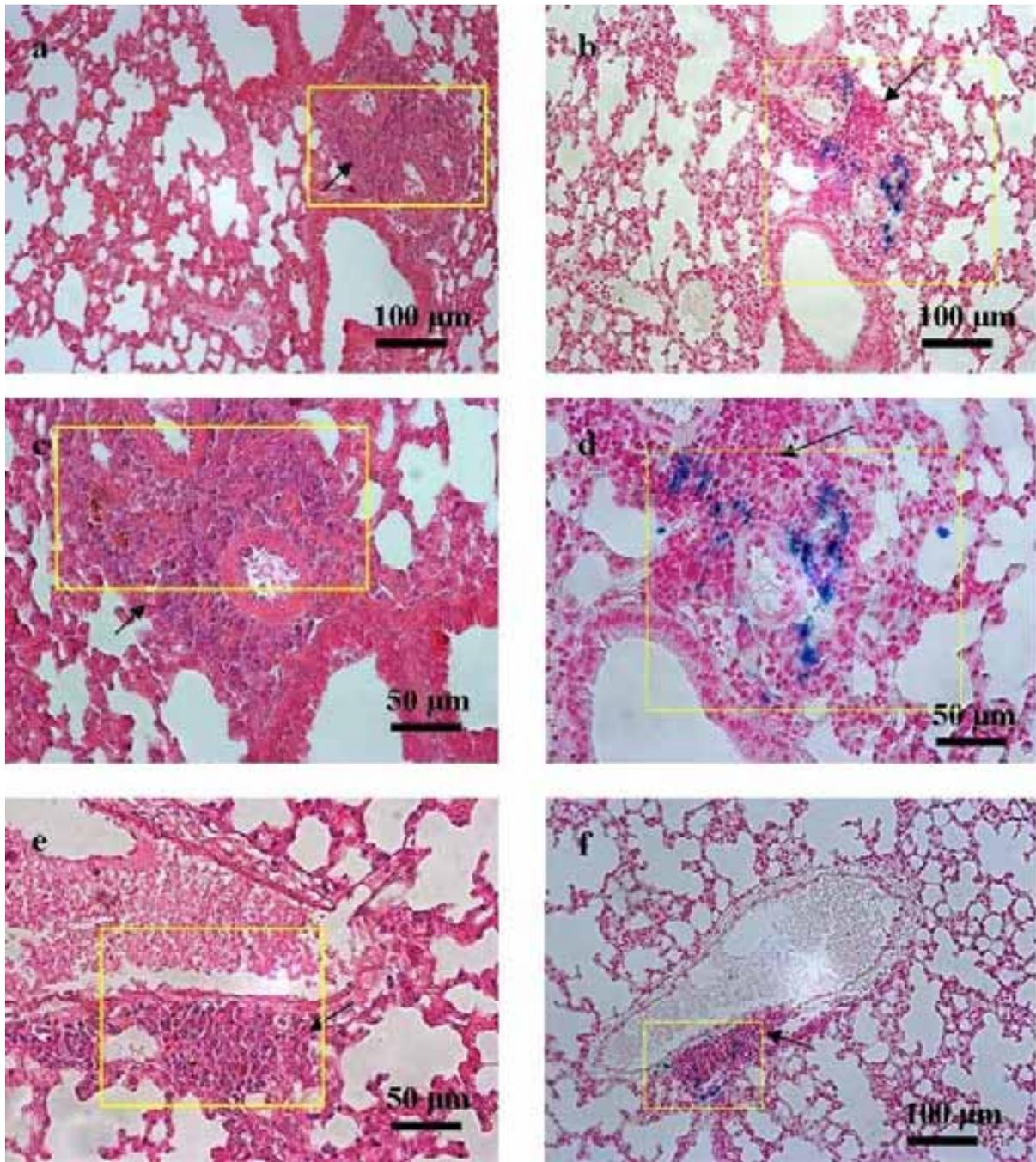


Figura 38: Fotomicrografia de pulmão dos animais tratados com FM-AnfoB. 7 dias (a, b, c e d), 15 dias (e, f). Em a, c, e coloração HE e b, d, f coloração de Perls. As setas indicam infiltrado inflamatório e a marcação amarela região de aglomerados de nanopartículas.

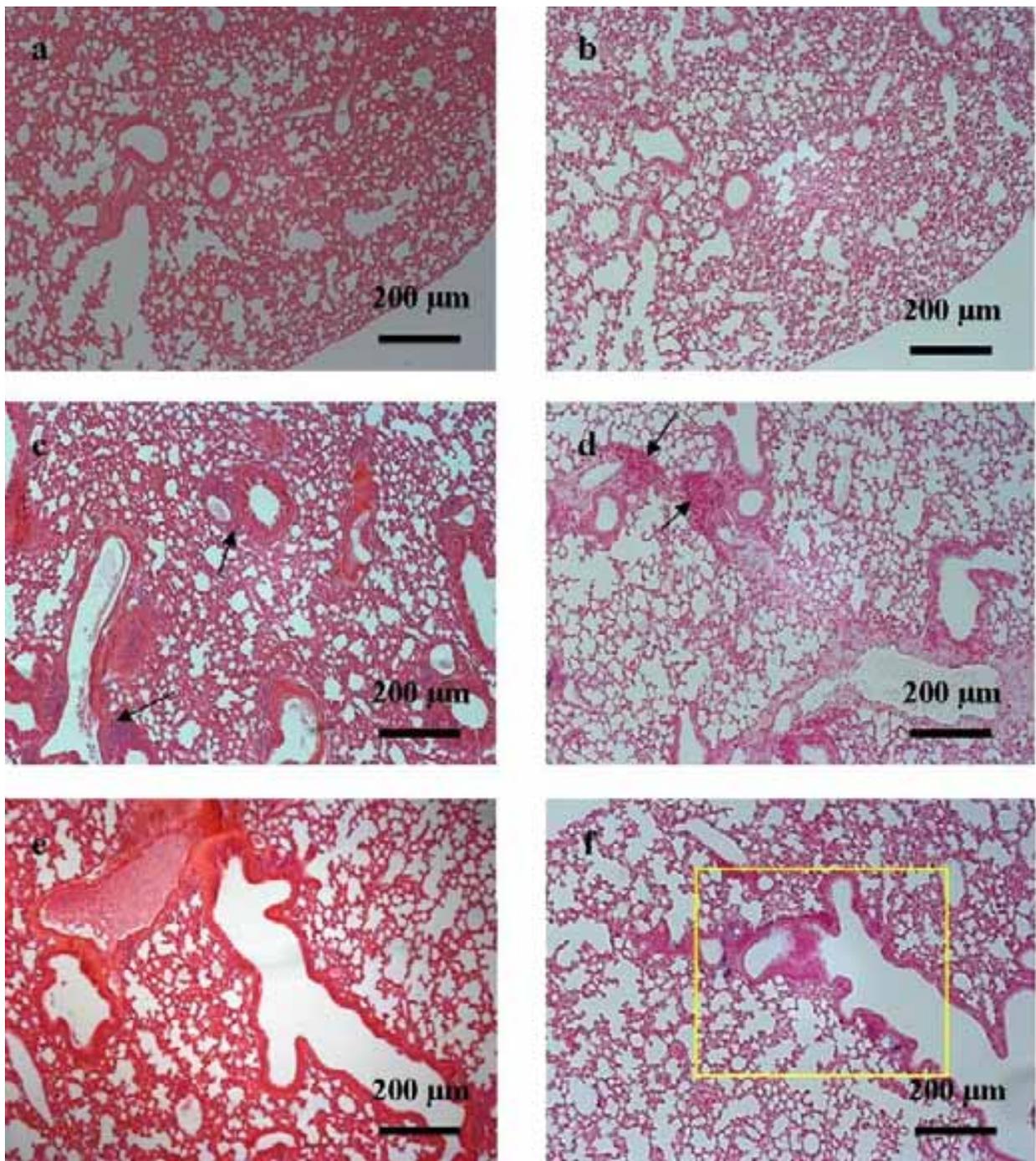


Figura 39: Fotomicrografia de pulmão dos animais tratados por 30 dias. Controle (a, b), AnfoB (c, d), FM-AnfoB (e, f). Em a, c, e coloração HE e b, d, f coloração de Perls. As setas indicam infiltrado inflamatório e a marcação amarela região de aglomerados de nanopartículas.

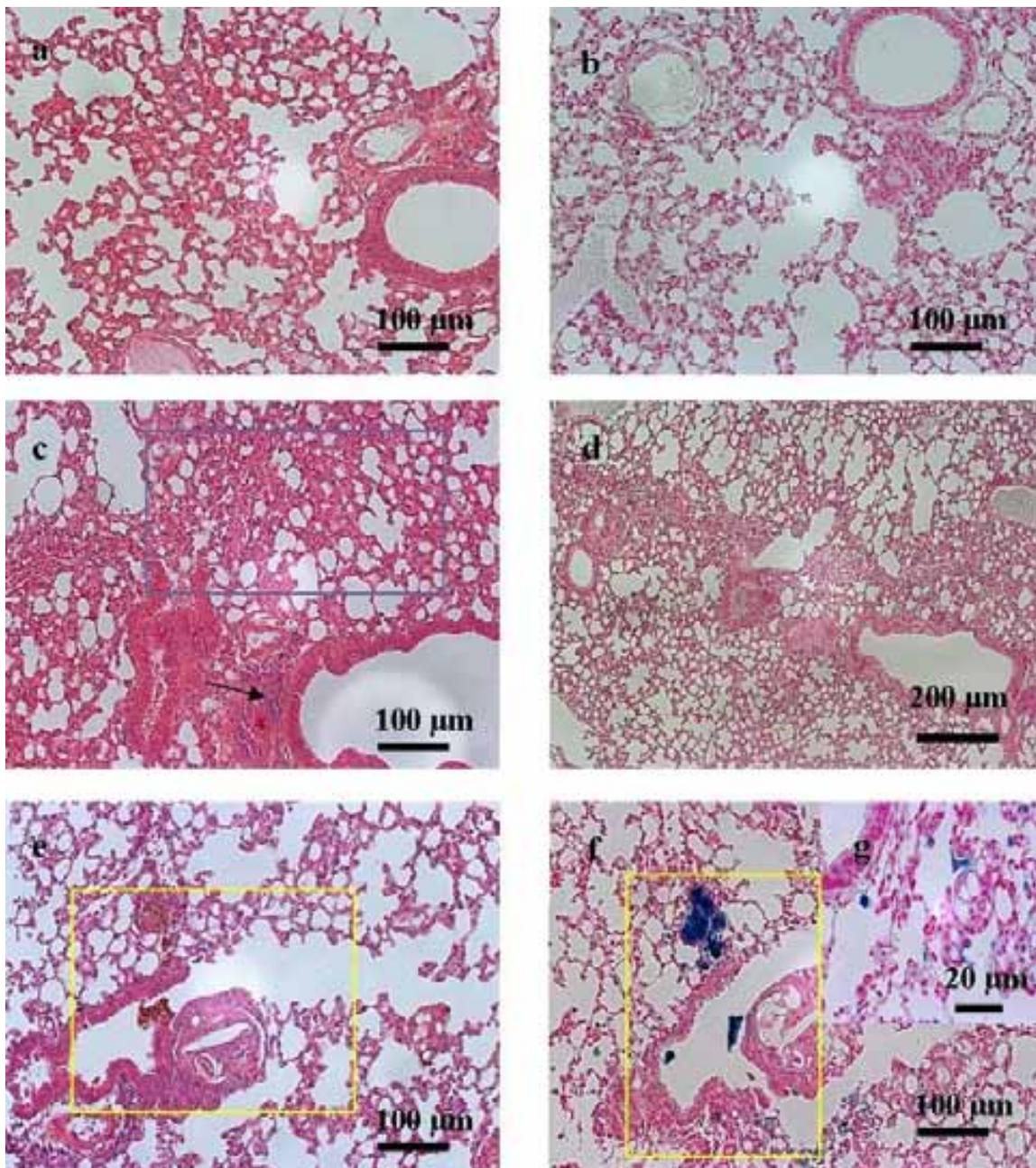


Figura 40: Fotomicrografia de pulmão dos animais tratados por 80 dias. Controle (a, b), AnfoB (c,d), FM-AnfoB (e, f e g). Em a, c, e coloração HE e b, d, f, g coloração de Perls. A marcação amarela região de aglomerados de nanopartículas e a azul espessamento pulmonar.

5.1 Considerações sobre a amostra e os tratamentos

A amostra FM-AnfoB, fluido magnético constituído por nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA e associadas à anfotericina B, foi investigada neste trabalho em relação à sua bicompatibilidade e possibilidade de uso como carreador da anfotericina B.

A anfotericina B apresenta uma atividade clínica útil contra a *Paracoccidioides brasiliensis*, mas apresenta limitações não só devido à nefrotoxicidade, mas também por precisar ser administrada durante um longo período, fatores que levam o paciente a interromper o tratamento. Após administração, as maiores concentrações da anfotericina B convencional são verificadas no fígado e no baço e em quantidades menores nos rins e nos pulmões. Os efeitos colaterais associados incluem: febre, mal estar, hiperpnéia, frio e hipertensão arterial, ocorrendo comumente flebite. Além de ser nefrotóxica, pode dar hipopotassemia, hipomagnesemia e diminuição dos níveis do hematócrito [49].

Um tratamento mais eficaz da Pbmicose seria concentrar o fármaco no local de interesse, uma vez que é uma patologia de evolução crônica com acometimento pulmonar, minimizando os efeitos colaterais associados com a administração do antifúngico. O desejado carreamento da droga para o pulmão poderia ser exercido por NPM adequadamente desenvolvidas. O fato de que as propriedades magnéticas das NPM são distribuídas por todo o fluido onde estão inseridas faz delas boas candidatas para uso como carreadores de drogas. Além disso, estudos revelaram que entre muitas amostras, as NPM recobertas com ácido dimercaptossuccínico (DMSA) tendem a acumular-se preferencialmente no pulmão [48]. Em conseqüência, estas NPM poderiam ser utilizadas como carreadores de drogas para o pulmão, incluindo-se a entrega do antifúngico anfotericina B (FM-AnfoB) para o tratamento da Pbmicose.

O desenvolvimento de novas formulações de drogas utilizadas na prática clínica pode reduzir efeitos colaterais, aumentar a adesão do paciente ao tratamento, reduzindo os custos dos tratamentos [49]. A eficiência da entrega de droga para diversas partes do organismo está diretamente relacionada com o tamanho das partículas. Os sistemas de entrega de droga mediados por nanoestruturas aumentam potencialmente a distribuição da droga, melhoram a liberação de entrega de drogas e possibilitam uma ação específica da droga [50], com redução da sua toxicidade [51, 52] e, eventualmente, da dose administrada [53]. Os sistemas de entrega de

drogas em nanoescala podem ser utilizados na terapia pulmonar [54] e tem sido descrito que o melhor deles é conseguido com nanopartículas com diâmetro menor que 100 nm [54] que possibilitam maior distribuição da droga no pulmão e liberação da droga encapsulada.

Muitos estudos estão sendo realizados para desenvolver sistemas de entrega de drogas que possibilitam redução da toxicidade ocasionada pela administração da anfotericina B, e formulações lipídicas, como sistemas coloidais e lipossomais, já estão disponíveis no mercado farmacêutico. No entanto, o custo do tratamento utilizando essas formulações é alto, demandando o desenvolvimento de formulações menos dispendiosas [55, 56, 57, 58].

Neste trabalho, a amostra FM-AnfoB foi desenvolvida na tentativa de, além de diminuir os custos, reduzir os efeitos colaterais, aumentar a adesão do paciente ao tratamento e direcionar o fármaco para o sítio de ação da doença. No tratamento dos animais, a nanoformulação possibilitou menor quantidade de administrações (tabela 1) devido à liberação do fármaco ser controlada, ainda que a dose administrada a cada 3 dias fosse equivalente à soma das 3 doses de AnfoB administrada em 3 dias consecutivos. Esta forma de tratamento, por si só, é benéfica por ocasionar menor estresse nos animais.

Em relação ao peso corporal, observou-se que não houve diferenças significativas em nenhum dos grupos de animais tratados ou controles. Embora fosse esperado ganho de peso ao longo de 80 dias de experimento, os dados demonstram que os tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB não geram qualquer efeito nutricional desfavorável em adição ao do estresse por manipulação diária dos animais. É interessante observar que estes dados diferem do trabalho de Amaral (comunicação pessoal) em que o tratamento com anfotericina B convencional em animais infectados com Pbmicosse induziu uma redução significativa no peso corporal desses animais enquanto o tratamento com o fármaco nanoformulado evitou esse efeito adverso.

A mortalidade observada após 70 dias de tratamento com FM-AnfoB deve ser melhor analisada, uma vez que as análises feitas não permitem uma explicação plausível. Após tratamento com FM-AnfoB ocorre diminuição significativa, tanto da viabilidade celular no peritônio, quanto da percentagem de eritrócitos policromáticos na medula óssea, mas não tão expressiva que explique a mortalidade dos animais. Considerando que a amostra propicia um direcionamento eficaz da droga ao local de ação da doença e a concentração inibitória mínima para o tratamento fúngico é constante, talvez o tempo de tratamento possa ser reduzido a fim de evitar esses efeitos adversos.

É importante lembrar que foram realizadas 27 injeções de amostra contendo NPM. Muitas outras amostras de fluidos magnéticos foram avaliadas nos laboratórios de Genética e Morfologia do IB, UnB [9, 48, 61, 26, 101, 102, 103], mas, em sua grande maioria, envolviam apenas uma e no máximo duas aplicações da amostra, ainda que em concentração final equivalente ou mesmo maior do que a testada neste trabalho. Os dados obtidos com este tratamento podem ter relevância para outras possíveis aplicações biomédicas de materiais magnéticos que demandem várias aplicações sucessivas.

5.2 Considerações sobre a análise citométrica

O hemograma é muito utilizado para avaliar quantitativa e qualitativamente os componentes celulares do sangue. Os itens avaliados neste estudo foram os leucócitos totais e a contagem diferencial de leucócitos que possibilitam definir a influência das substâncias testadas sobre essas células. Os leucócitos participam da defesa do organismo contra agentes infecciosos e substâncias estranhas. Quando é necessário ativar uma resposta a um agente estranho uma quantidade suficiente de leucócitos é recrutada para destruir e digerir os organismos e substâncias prejudiciais. Os leucócitos originam-se de células precursoras na medula óssea que amadurecem em cinco tipos principais de leucócitos: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Variações no número de leucócitos podem ocorrer em situações fisiológicas ou de doença [59].

Os neutrófilos, eosinófilos e basófilos são chamados de granulócitos por apresentarem granulações específicas no citoplasma e os linfócitos e monócitos são os agranulócitos [60]. A destruição ou seqüestro de um ou vários destes tipos celulares pode levar à leucopenia [9].

A administração de AnfoB induziu leucopenia significativa em 12 horas e 15 dias, enquanto a FM-AnfoB o fez de forma mais branda e apenas após o tratamento por 15 dias. Esse achado é provavelmente consequência da redução de linfócitos, a população mais abundante no sangue dos camundongos [9], ainda que as outras populações de células tenham apresentado alteração após os tratamentos [61]. A linfopenia ou linfocitopenia ocorre na fase aguda das inflamações, em viroses imunodepressoras e em processos infecciosos graves e tem sido observado em vários testes com amostras magnéticas.

A leucopenia é quase sempre devido a um processo patológico e acontece quando a contagem total de leucócitos fica abaixo do nível mínimo considerado para aquela espécie. Pode resultar de um ou mais fatores, como a diminuição da produção em casos de danos na medula óssea ou necrose do tecido linfóide, granulopoiese inefectiva ou diminuição da liberação na circulação, aumento na utilização ou destruição, como nos casos de sepse. As causas mais comuns são algumas doenças por vírus, septicemia ou toxemia bacteriana, alguns casos de leucemia, anafilaxia, substâncias tóxicas, drogas ou outros compostos químicos, que competem na utilização do ácido fólico pelas células e ainda deficiências nutricionais [59]. Em acordo com nossos dados, a leucopenia tem sido relatada em pacientes que recebem tratamento com AnfoB [62]. É interessante observar que nos tempos mais longos (30-80 dias) a alteração significativa do número de leucócitos em relação ao controle não foi observada, nem sequer para as subpopulações leucocitárias.

Após 7 dias, o tratamento com FM-AnfoB induziu neutrofilia, mas esse fato não gerou alterações na contagem global devido a seu valor pequeno em relação à população de linfócitos. O aumento do número de neutrófilos jovens na circulação, acima do normal da espécie, ocorre na fase aguda dos processos inflamatórios, por uma liberação mais acelerada dessas células pela medula. Pode ocorrer uma neutrofilia fisiológica que não tem relação com alterações patológicas; causada por uma liberação súbita dos neutrófilos do compartimento marginal, o que ocorre após as refeições, na gestação, após exercícios violentos ou prolongados, após vômitos ou convulsões e no estresse. A neutrofilia observada neste trabalho é devido a um processo pró-inflamatório gerado pela presença de partículas magnéticas na amostra FM-AnfoB, a exemplo do que foi anteriormente observado após administração das mais diferentes amostras magnéticas [61].

A contagem de monócitos diminuiu após tratamento com AnfoB por 12 horas. A monocitopenia não é alteração significativa, pois pequenos números destas células são normalmente observados [59]. Os monócitos pertencem ao sistema mononuclear fagocitário, atuam nos dois tipos de defesa (reação inespecífica e reação imune específica) e no sangue circulante estão continuamente sendo mobilizados para se transformarem em macrófagos, que são células que atuam nas defesas teciduais [63, 64, 65].

Diferente das demais, as populações de eosinófilos, que sinaliza processos alérgicos, e de basófilos não sofreram alterações com os tratamentos.

5.3 Considerações sobre os exames bioquímicos

As análises bioquímicas possibilitam a monitorização, prognóstico, diagnóstico, tratamento, investigação de doenças e ainda podem ser utilizadas para avaliar a toxicidade de substâncias. Os exames bioquímicos realizados permitiram a análise da função renal e hepática dos animais ao longo do tratamento com AnfoB e FM-AnfoB. Uma vez que a anfotericina B pode ser nefrotóxica, avaliamos seu efeito no estado convencional e a nova formulação desenvolvida.

O teste da alanina amino transferase é muito útil na prática clínica por avaliar a função hepática e monitorar os danos causados, embora não permita detectar a extensão dos danos hepáticos. Para a determinação utilizou-se o sistema em modo cinético da ALT. A ALT catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase, enquanto a coenzima NADH é reduzida a NAD. A redução da absorbância em 340 ou 365 nm, conseqüente à oxidação da NADH, é analisada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra [66].

Elevações das transaminases ocorrem nas hepatites (viral e tóxica), na mononucleose, cirrose, colestase, carcinoma hepático primário ou metastásico, pancreatite, rabdomiólise, traumatismo extenso e no choque prolongado [66].

A administração de AnfoB gerou alterações não significativas nos níveis séricos dos animais tratados, mas no tratamento de maior duração, 80 dias, houve um aumento significativo na quantidade da ALT comparado com o mesmo tratamento nos diferentes tempos, sugerindo que um tratamento mais longo pode ocasionar danos hepáticos. Essa ausência de hepatotoxicidade após tratamento com AnfoB está de acordo com resultados encontrados ao utilizar a anfotericina B convencional na dose de 0,6mg/Kg/dia e também formulação lipossomal do fármaco (1mg/Kg/dia) [58].

A administração de FM-AnfoB gerou alterações entre os tratamentos e tempos, porém não significativas. Ao contrário de dados que retratam aumento nos níveis da ALT após uso de nanopartículas magnéticas [67], os resultados deste trabalho são positivos, uma vez que a amostra testada não gera dano hepático, mesmo quando administrada em até 27 doses sucessivas. A

compatibilidade hepática encontrada com FM-AnfoB foi também notada no estudo de Medarova et al. (2007) que utilizou nanopartículas magnéticas [68].

Para a determinação da FA em amostra de sangue foi utilizado o método cinético de tempo fixo e medição de ponto final. A FA do soro hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A intensidade de cor formada, diretamente proporcional à atividade enzimática, é medida em espectrofotômetro no comprimento de onda 590 nm. O produto final da reação é constituído de uma mistura de cor azul e cor própria do substrato [69].

A FA é produzida por muitos tecidos, principalmente pelos ossos, fígado, intestinos e placenta e é excretada pela bile. A dosagem sérica desta enzima é particularmente útil na investigação das doenças hepatobiliares e ósseas. Os níveis elevados ocorrem em doenças ósseas caracterizadas por um aumento da atividade osteoblástica, doenças obstrutivas das vias biliares, metástases hepáticas, doenças granulomatosas e na cirrose hepática. Níveis reduzidos da FA são encontrados na desnutrição crônica, na hipofosfatose e, ocasionalmente, no hipotireoidismo e anemia perniciososa [69].

Há estudos mostrando que nanopartículas magnéticas induzem aumento na concentração sérica da fosfatase alcalina, dependendo da substância associada a elas [68]. Neste trabalho foi possível observar que em 24 horas a FA sérica foi significativamente maior no tratamento com FM-AnfoB. Cabe ressaltar que esse aumento foi transitório, significativo apenas em 24 horas.

Hepatotoxicidade é considerado um efeito colateral raro induzido pela anfotericina B [70]. Há estudos de caso que mostram que um paciente com leucemia mielóide recebeu tratamento com anfotericina B em altas doses durante 18 dias para o tratamento de pneumonia fúngica, foi notada uma elevação assintomática nos níveis de FA, ALT e bilirrubina, retornando ao normal quando a administração foi interrompida [71]. Foi relatado que a formulação lipossomal de anfotericina B induz aumento na concentração sérica de FA e ALT [72], o que mostra vantagens da FM-AnfoB em relação à FA.

A determinação quantitativa da atividade da γ -glutamyl transferase (GGT) no plasma foi realizada por fotometria em modo cinético [73]. A gama-glutamyltransferase (GGT), também chamada de gama-glutamyltranspeptidase ou gama-gt, participa na transferência de aminoácidos através das membranas celulares e, possivelmente, do metabolismo da glutatona. As concentrações mais altas de GGT encontram-se nas membranas celulares e túbulos renais,

todavia a enzima também aparece no fígado, epitélio do trato biliar, pâncreas, linfócitos, cérebro e testículos. Este teste é usado para medir os níveis séricos de GGT e fornece informação sobre doença hepato-biliar, avalia a função hepática e detecta a ingestão de álcool.

A análise da GGT urinária tem sido utilizada como um bom método diagnóstico para lesão ou disfunção tubular renal [74]. Os resultados encontrados neste trabalho permitem concluir que AnfoB e FM-AnfoB não geraram alteração nos níveis séricos de GGT.

A uréia é o maior produto do catabolismo de proteínas em animais, sintetizada primariamente no fígado e secretada pelos rins, funciona como um veículo para remoção da amônia tóxica do organismo. A determinação da uréia é muito utilizada na prática clínica para avaliar a função renal [75, 76].

Foi utilizado o sistema enzimático-colorimétrico para determinar a uréia nas amostras de sangue. A uréia é hidrolisada pela urease a íons amônio e CO_2 . Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade de cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra [77].

Fisiologicamente, a uréia se eleva devido à dieta hiperprotéica ou com a idade. Sua diminuição ocorre durante a gravidez normal e em indivíduos com dieta hipoprotéica e alto teor glicídico. Elevações protéicas também ocorrem por catabolismo elevado (febre, septicemia) e hemorragias internas, principalmente do trato gastrointestinal. As elevações da uréia por defeito de excreção se devem a causas pré-renais (insuficiência cardíaca congestiva), causas renais (nefrites, pielonefrites e insuficiência renal aguda ou crônica). As causas pós-renais são obstruções no trato urinário (cálculos, pólipos ou carcinomas). Diminuição da uréia não tem expressão clínica, mas pode indicar insuficiência hepática [75] que deve ser medida utilizando outros parâmetros. A dosagem sérica de creatinina é considerada mais específica para a avaliação da função glomerular, mas pode ser menos sensível em algumas doenças renais precoces. A disfunção renal é melhor avaliada por meio das dosagens de uréia e creatinina associadas [77].

A administração intraperitoneal de AnfoB e FM-AnfoB não induziu aumento nos níveis de uréia sérica dos animais tratados, portanto revela que a dose utilizada e a duração do tratamento não geram danos renais. Estudos mostram que o aumento dos níveis séricos de uréia induzido por nanopartículas pode estar relacionado com a dose administrada, ou seja, em doses menores os níveis não são alterados, mas quando se aumenta a dose administrada, a quantidade

de uréia eleva significativamente [78]. Apesar da nefrotoxicidade ser um efeito adverso da AnfoB, o mesmo não pôde ser identificado no presente trabalho. Em relação à uréia sérica, portanto, não foi possível atestar que as formulações nanoparticuladas podem evitar a nefrotoxicidade causada por fármacos [76].

A creatinina, molécula química proveniente do metabolismo muscular [79], é produzida a partir da creatina, molécula de grande importância para a produção de energia nos músculos. Aproximadamente 2% da creatina do organismo são convertidos diariamente em creatinina. Esta é transportada pela circulação sanguínea aos rins, onde a maioria é filtrada e eliminada na urina [80].

Para a determinação da creatinina foi utilizado o sistema colorimétrico. A creatinina reage com a solução de picrato em meio alcalino formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira [81].

A creatinina é um marcador muito útil para avaliar a função renal, principalmente da filtração glomerular [79, 80], em virtude da sua independência de fatores como dieta, grau de hidratação e metabolismo protéico. A creatinina plasmática é um teste de função renal mais seguro que a uréia. Nas doenças renais a creatinina se eleva mais vagarosamente que a uréia e se reduz mais vagarosamente com a hemodiálise. Insuficiência cardíaca congestiva, choque e obstrução mecânica do trato urinário provocam também elevação da creatinina plasmática [81].

No presente trabalho não houve aumento significativo nos níveis de creatinina sérica após os tratamentos com Anfo B e FM-AnfoB. Pode-se dizer, portanto, que os tratamentos não geraram nefrotoxicidade. Apesar do potencial nefrotóxico da anfotericina B ser conhecido, alguns fatores podem ter influenciado a não elevação da creatinina sérica nos animais tratados com AnfoB. Estudos mostram que a administração intravenosa de 3mg/Kg representa a dose letal de anfotericina B, sendo 1,5mg/Kg a dose terapêutica capaz de gerar nefrotoxicidade. Com base nessas informações, a dose utilizada neste trabalho foi 2mg/Kg de Anfo B, via intraperitoneal.

Uma possibilidade para explicar a não nefrotoxicidade de AnfoB neste estudo seria a da via de administração. Ao utilizar a via intraperitoneal deve ser levada em consideração a absorção do fármaco e a biodisponibilidade deste após a absorção. Quando o fármaco é administrado pela

via intravenosa não passa pelo processo de absorção, ou seja, a dose administrada estará completamente biodisponível e, conseqüentemente, seus efeitos podem ser maiores.

O estudo de Tiyaboonchai & Limpeanchob [82] demonstra a nefrotoxicidade induzida pela anfotericina B, o Fungizone®, em diferentes doses (1, 4 e 8mg/Kg), via intravenosa, comparada com uma nova formulação de anfotericina B nanoparticulada. A anfotericina B nanoparticulada mostrou-se biocompatível, uma vez que não gerou nefrotoxicidade nos animais tratados. Estudos com outros fármacos que são nefrotóxicos, como ciclosporina demonstram a redução ou ausência desse efeito colateral quando o fármaco está em formulação nanoparticulada [79]. Estes dados revelam que a redução de efeitos colaterais gerados após administração de determinadas drogas pode ser evitado utilizando nanopartículas.

O tratamento com AnfoB e com FM-AnfoB não causaram toxicidade renal e hepática, o que também foi verificado no trabalho de Amaral utilizando a mesma dose e via de administração (comunicação pessoal). Apesar da concentração de anfotericina B administrada no tratamento com FM-AnfoB extrapolar o limite tolerável (2.7mg/Kg/dia), não causou os danos renal e hepáticos, provavelmente por causa da baixa circulação sanguínea efetiva de anfotericina B liberada gradualmente da nanoformulação. A nefrotoxicidade induzida pela Anfotericina B poderia ser detectada pelo aumento dos níveis séricos de creatinina [83, 84].

Para avaliar a nefrotoxicidade induzida pelo tratamento com anfotericina B e compará-la à do tratamento com FM-AnfoB a fim de verificar diferenças nos tipos de formulação, deve-se considerar a via de administração e ajustar a dose para que seja equivalente nas duas diferentes formulações. Outra possibilidade seria analisar mais parâmetros que favoreçam a identificação de substâncias nefrotóxicas, como a produção de malonil dialdeído, H₂O₂ e glutatona presente nos glomérulos [85]. O estudo de Park et al. (2006) mostra que a utilização de nanopartículas magnéticas não altera os níveis de creatinina e uréia nos animais tratados [67].

5.4 Considerações sobre a contagem diferencial de células peritoneais

As células presentes em maior quantidade na cavidade peritoneal, os macrófagos, atuam na resposta primária contra infecções, câncer [86] e substâncias estranhas e estão também

envolvidos na regulação da resposta aguda e liberação de monocinas interleucina-1 (IL-1), IL-6, TNF- α e metabólitos do ácido aracdônico [86]. São células que, juntamente com os neutrófilos, apresentam atividade fagocitária sempre estimulada na presença de materiais particulados.

Os tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB não induziram alterações significativas na população de macrófagos, quando comparadas ao controle. Entretanto, é possível observar que, após administração de FM-AnfoB ocorreu decréscimo (12h) de cerca de 30% nessa população que foi, de certa forma, compensado pelo acréscimo inicial também aproximado de 25% da população de neutrófilos.

Observa-se uma tendência ao aumento da população de linfócitos durante todo o experimento, em todos os grupos, mesmo no controle, o que provavelmente evidencia processo de migração de células para o peritônio, estimulado pelas injeções intraperitoneais frequentes.

Resposta alérgica foi sugerida pelo aumento de eosinófilos nos animais tratados com FM-AnfoB ou AnfoB, mas principalmente no primeiro grupo de animais. Nos tratamentos com 80 dias, este efeito não foi mais evidenciado.

Respostas diversas à presença de nanopartículas magnéticas tem sido observada em testes biológicos com a utilização de amostras de diferentes composições [61, 87]. Os tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB induziram alterações nas populações de células peritoneais, de forma geral mais frequentes quando as nanopartículas foram utilizadas (FM-AnfoB), denotando um processo inflamatório [88, 89]. Cabe ressaltar, entretanto que, considerando o longo tratamento a que alguns grupos foram submetidos, as alterações nas populações leucocitárias não foram muito severas.

5.5 Considerações sobre a viabilidade de células peritoneais

Inúmeras metodologias têm sido desenvolvidas para analisar a viabilidade celular. O teste de viabilidade das células peritoneais fornece informações relacionadas com a biocompatibilidade da amostra a ser testada. Utiliza-se a nigrosina, corante vital que possibilita uma diferenciação rápida e fácil das células vivas e mortas. Neste teste as células mortas aparecem coradas, devido à perda da seletividade de sua membrana permitindo a entrada do

corante, e as células não coradas indicam a integridade da membrana. A proporção da mesma possibilita avaliar a viabilidade celular na presença de agentes exógenos [90].

Os tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB pouco afetaram a viabilidade celular peritoneal. No primeiro tempo experimental (12h), FM-AnfoB induziu uma redução significativa na frequência de células viáveis, indicando que pode provocar morte celular. A citotoxicidade pode ser induzida pela administração de substâncias estranhas ou pela presença de ferro nas nanopartículas, uma vez que esse metal tem a capacidade de aceitar e doar elétrons, danificar tecidos, pois catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em radicais livres que atacam membranas celulares, proteínas e DNA [91]. Esse resultado está de acordo com dados obtidos após administração intraperitoneal de nanopartículas de magnetita cobertas com dextrana, ácido dimercaptossuccinico ou ácido cítrico. Foi mostrado que o uso de quelante de ferro pode minimizar os efeitos de amostra magnética na viabilidade de células peritoneais [92].

É necessário considerar também que a migração de células do sangue para o peritônio pode, de alguma maneira, mascarar um possível efeito danoso na sobrevivência de células peritoneais. De qualquer forma, os resultados obtidos são bastante interessantes, tendo em vista que outras amostras magnéticas reduziram de forma mais expressiva a viabilidade celular. Além disso, merece atenção o fato de que a redução na viabilidade (significativa em 7 dias) parece às vezes estar simplesmente associada com o número grande de injeções intraperitoneais.

5.6 Considerações sobre o ensaio de micronúcleo

Na toxicologia é essencial o estudo de danos ao DNA, pois mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese e em outras patologias importantes [93]. Vários testes são indicados pelas agências internacionais e instituições governamentais utilizados para avaliar a genotoxicidade e o teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito e recomendado para a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial [94].

Esse teste consiste na avaliação de micronúcleos em eritrócitos normo- e policromáticos e é um ensaio *in vivo* amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram

cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) [94, 95] induzidos por uma substância teste [100]. Na medula óssea, um eritroblasto desenvolve em eritrócito policromático, sendo esse formado após extrusão do núcleo. Qualquer micronúcleo formado pode permanecer no citoplasma e é facilmente visualizado, pois essas células são anucleadas [96]. São considerados micronúcleos os corpúsculos que, em relação ao núcleo, apresentam aproximadamente 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refringência [95]. Os eritrócitos policromáticos são eritrócitos imaturos que ainda contêm ribossomos. Por esta razão podem ser diferenciados dos eritrócitos normocromáticos por coloração seletiva dos ribossomos [97].

O teste possibilita ainda avaliar se a substância testada é citotóxica, a partir da análise da %EPC [97]. De acordo com dados previamente estabelecidos, a toxicidade excessiva na medula óssea está associada com a depressão de 80% ou mais do valor do controle [94].

Para validar o experimento utilizou-se a ciclofosfamida, substância reconhecidamente genotóxica [97], como controle positivo [94]. O grupo tratado com ciclofosfamida apresentou aumento significativo na frequência de micronúcleo em EPC [94], atestando que o ensaio funcionou adequadamente.

No presente trabalho, o teste de MN foi realizado em camundongos tratados com PBS, AnfoB e FM-AnfoB 1,7, 15, 30 e 80 dias após a administração intraperitoneal. A anfotericina livre (AnfoB) aumentou significativamente o número de micronúcleos tanto nos eritrócitos policromáticos, quanto nos normocromáticos, nos períodos mais longos (30 e 80 dias) de tratamento, mostrando, portanto, potencial genotóxico dependente da dose e do tempo de tratamento.

Na literatura há dados incompletos quanto ao potencial carcinogênico e mutagênico do medicamento. A bula do Anforicin B® não contém essa informação, o Fungizon® (Anfotericina B com desoxicolato de sódio) traz como informação que não foram realizados estudos em longo prazo em animais para avaliar o potencial carcinogênico, mutagênico ou se este medicamento afeta a fertilidade em machos e fêmeas [98]. Para o Amphocil® não foi realizado estudo para avaliar o potencial carcinogênico, mas não é mutagênico a partir da análise da medula óssea de ratos [99].

Contrariamente ao observado com a amostra AnfoB, a amostra FM-AnfoB não apresentou atividade genotóxica nas células policromáticas, nem sequer nas normocromáticas. Este é um

dado relevante, pois indica que essa formulação não causa instabilidade genômica sobre as células da medula óssea de camundongos saudáveis e que a anfotericina B nanoestruturada evita que o potencial genotóxico do fármaco em questão se manifeste. Estudos com nanopartículas magnéticas estão sendo realizados e amostras com composições variadas não apresentaram atividade genotóxica, como observado com a administração de dose única de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico [26], magnetolipossomas com nanopartículas de magnetita recobertas com ácido láurico [101], nanopartículas de maghemita recobertas com citrato [102] ou com polifosfato [9]. É necessário salientar que o resultado favorável obtido com FM-AnfoB, é muito interessante, uma vez que foram administradas múltiplas doses nos camundongos, sobretudo nos tratamentos por 80 dias.

A análise do percentual de eritrócitos policromáticos dos tratamentos mostra que a administração intraperitoneal de FM-AnfoB leva à citotoxicidade nas células da medula óssea, após 80 dias de tratamento. Esses resultados diferem dos encontrados em trabalhos anteriores nos quais se aplicou única dose de fluido magnético [102, 103]. É interessante notar que foi exatamente no tratamento com a amostra FM-AnfoB por 80 dias que se observou o menor valor de viabilidade celular das células peritoneais.

Em síntese, o teste de MN mostrou potencial genotóxico no tratamento com AnfoB, a redução deste quando o fármaco é nanoestruturado e a citotoxicidade induzida pelo tratamento com FM-AnfoB. Essa citotoxicidade poderia ser evitada pela redução do tempo de tratamento com FM-AnfoB, uma vez que o direcionamento eficaz para o sítio específico, proposta por essa nova formulação, possibilita redução da dose e do tempo de tratamento.

5.7 Considerações sobre a análise histológica

A análise histológica em microscopia de luz mostrou que a amostra FM-AnfoB contendo nanopartículas magnéticas vai para os pulmões, fígado e baço, observação possível graças à presença de aglomerados de nanopartículas presentes nesses órgãos.

Na análise histológica, os aglomerados de nanopartículas apresentam coloração marrom quando as lâminas são coradas com HE [104] ou azul, quando usado o método de Perls

(coloração de Prussian). A cor azul neste método é provavelmente consequência do fato de que, quando interiorizadas pelas células as nanopartículas tendem a perder parcial ou totalmente a cobertura [10]. A reação ocorre com o tratamento dos cortes dos órgãos em soluções ácidas de ferrocianeto. O íon férrico (+3) no tecido combina com o ferrocianeto e resulta na formação do pigmento azul intenso [105].

O ferro tem a capacidade de aceitar e doar elétrons, por isso é fisiologicamente essencial como componente dos citocromos e moléculas ligantes de oxigênio. Entretanto, é também perigoso, pois pode danificar tecidos catalizando a conversão do peróxido de hidrogênio em radical livre que ataca as membranas, proteínas e o DNA das células. Estes danos são reduzidos, em condições normais, devido à regulação do metabolismo de ferro que impede concentração de ferro livre capaz de gerar esses danos, mas a sobrecarga de ferro pode amplificar os efeitos prejudiciais da superprodução do superóxido, induzindo processo inflamatório agudo e crônico [91].

O rim controla a eliminação de diversas substâncias resultantes do metabolismo dos nutrientes, sobretudo das proteínas. Também atua na regulação da concentração de água, eletrólitos e não-eletrólitos no meio interno, possuindo papel muito importante na manutenção da homeostase. Neste trabalho não foram encontrados aglomerados de nanopartículas nesse órgão, ao contrário do que foi encontrado em estudos anteriores após a administração de outras amostras de nanopartículas magnéticas [102]. Coincidentemente com esses trabalhos, infiltrados inflamatórios foram encontrados nos rins de animais controle [102]. Por esta razão, os infiltrados inflamatórios observados após tratamentos com as amostras AnfoB e FM-AnfoB não podem ser interpretados como efeitos destes fármacos. Entretanto, no tratamento de maior duração (80 dias) com AnfoB foram observados processos inflamatórios severos em um dos animais testados, sugerindo um possível efeito nefrotóxico dependente da dose e do tempo de tratamento. Esse dado é interessante uma vez que mesmo após administrações sucessivas de nanopartículas da nova formulação FM-AnfoB este processo inflamatório severo não foi observado e, portanto, pode-se dizer que a amostra é potencialmente menos tóxica ao rim que a formulação convencional de anfotericina B [56].

No baço nenhuma alteração histológica foi observada nos diferentes tempos e tratamentos. A partir de 24 horas até 80 dias o tratamento com FM-AnfoB observou-se a maior quantidade de aglomerados azuis no órgão, indicando que o ferro se acumulou nesse órgão.

Estudos com outras amostras de nanopartículas mostraram que não causam danos no baço, embora formem aglomerados de nanopartículas nos mesmos [9, 102]. O baço é um órgão naturalmente rico em ferro e para reconhecer o ferro proveniente das nanopartículas magnéticas outras técnicas que não a microscopia de luz teria que ser usada. A ressonância magnética foi usada em investigações anteriores com este propósito.

O ferro remanescente do organismo é encontrado nos hepatócitos e macrófagos do sistema fagocítico mononuclear servindo como depósito, através do metabolismo de primeira passagem hepática uma quantidade de ferro pode ser enviada para a circulação sanguínea e se ligar a transferrina. Os macrófagos ingerem células vermelhas senescentes, degradam a hemoglobina e o ferro é carregado pela transferrina para ser reutilizado [106].

No fígado, alterações histológicas não foram observadas, exceto pela constatação de processos inflamatórios encontrados nos controles e também nos tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB. De maneira geral, os processos inflamatórios foram maiores nos animais tratados com a amostra AnfoB do que com FM-AnfoB, sugerindo uma vez mais efeitos benéficos no uso de formulações nanoestruturadas. Poucos animais tratados com a amostra FM-AnfoB apresentaram aglomerados de nanopartículas, ao contrário do que foi verificado após tratamento com outros fluidos magnéticos à base de nanopartículas de maghemita recobertas com polifosfato [9] ou com citrato [102]. É plausível que haja nanopartículas no órgão cuja detecção por microscopia de luz seja impossibilitada devido ao tamanho das mesmas.

Dentre os órgãos investigados, os pulmões é que apresentaram as alterações histológicas mais expressivas. A amostra AnfoB induziu espessamento das paredes alveolares e processo inflamatório relacionado com a dose e tempo de tratamento. A amostra FM-AnfoB induziu ainda mais espessamento das paredes e infiltrados inflamatórios sempre próximos a aglomerados de nanopartículas observados desde as 12 horas de tratamento e que aumentam progressivamente até 80 dias. A presença preferencial destes aglomerados nos pulmões evidencia o direcionamento da anfotericina B para os pulmões, sugerindo eficácia da amostra FM-AnfoB no tratamento da Pbmicoze. Os resultados estão de acordo com a literatura onde nanopartículas diversas, entre as quais as nanopartículas com cobertura de DMSA tendem a se acumular no pulmão [9, 48, 102]

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho que avaliou os efeitos da amostra FM-AnfoB (nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA e associadas com anfotericina B), e os comparou com os efeitos da anfotericina B convencional (AnfoB), em tempos que variaram de 12 horas até 80 dias de tratamento, permitem concluir que:

- FM-AnfoB causa menor estresse nos animais que AnfoB porque a liberação controlada do fármaco permite manter a dose mesmo com menor número de administrações;
- As amostras AnfoB e FM-AnfoB induzem pequenas e temporárias alterações nas populações leucocitárias do sangue e do peritônio. FM-AnfoB causa leucopenia mais branda que AnfoB;
- As amostras AnfoB e FM-AnfoB não causam alterações nos níveis enzimáticos que indiquem hepato ou nefrotoxicidade. No tratamento de maior duração, 80 dias, AnfoB gerou alterações nos níveis séricos da enzima ALT, sugerindo que um tratamento mais longo pode ocasionar danos hepáticos.
- A viabilidade das células peritoneais é pouca afetada pelos tratamentos com AnfoB e FM-AnfoB;
- A amostra AnfoB causa genotoxicidade tanto em EPC quanto em ENC, enquanto o mesmo não é observado com a amostra FM-AnfoB;
- A amostra FM-AnfoB causa citotoxicidade nas células da medula óssea no início e no final do experimento;
- A análise histológica mostra aglomerados de nanopartículas no fígado, baço e pulmão, ausência de danos ao baço, processo inflamatório mais severos nos rins e fígado pela amostra AnfoB, espessamento maior das paredes alveolares pela amostra FM-AnfoB e direcionamento preferencial das NPM para os pulmões;
- Em síntese, o fluido magnético constituído por nanopartículas de maghemita recobertas por DMSA pode ser usado como carreador da anfotericina B, diminuindo, em muitas circunstâncias, os efeitos colaterais da anfotericina B convencional, evidenciando os benefícios dos fármacos nanoestruturados.

REFERÊNCIAS

- [1] MAYNARD, A.D. Nanotechnology: assessing the risks. **Nanotoday**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 22-23, May. 2006.
- [2] NASCHIE, M. S. E. Nanotechnology for the developing world. **Chaos, Solitons and Fractals**, Cobham, v. 30, p. 769–773, 2006.
- [3] GUZ, I.A.; RODGER, A.A.; GUZ b, A.N.; RUSHCHITSKY, J.J. Developing the mechanical models for nanomaterials. **Composites**, Guildford, v. 38, n. 4, Apr. 2007. Part A. Applied Science and Manufacturing, p. 1234-1250.
- [4] LEE, L. A.; WANG, Q. Adaptations of nanoscale viruses and other protein cages for medical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n.3, p. 137– 149, 2006.
- [5] MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociência e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, n. 18, p. 9, 2004.
- [6] GOULD, P. Nanomaterials face control measures. **Nanotoday**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 34-39, May. 2006.
- [7] ALINGTON, V.A. Nanotechnology. In: Report of the National Nanotechnology Initiative Workshop, 2003.
- [8] JAIN, K. K. The role of nanobiotechnology in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 21, p. 1435-1445, Nov. 2005.
- [9] PORTILHO-CORRÊA, F. A. **Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos**. Dissertação (Pós-graduação em Patologia Molecular)–Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- [10] KAGAN, V. E.; BAYIR, H.; SHVEDOVA, A. A. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. **Nanomedicine. Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.1, p. 313–316, 2005.
- [11] OBERDÖRSTER, G. et al. Environ. Health Perspect, v.13, n. 117, p. 823, 2005. In: MAYNARD, A.D. Nanotechnology: assessing the risks. **Nanotoday**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 22-23, May. 2006.
- [12] BERMUDEZ, E.; MANGUM, J. B.; WONG, B. A.; ASGHARIAN, B.; HEXT, P. M.; WARHEIT, D. B.; EVERITT, J. I. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. **Toxicological Sciences**, v. 77, p. 347–357, 2004.
- [13] THRALL, J. H. Personalized Medicine. **Radiology**, v. 231, p. 613-616, 2004.

- [14] LEHR, C.M. Cell culture models and nanobiotechnology—contemporary topics in advanced drug delivery research. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.60, v–vi, 2005.
- [15] NASCHIE, M. S. El. Nanotechnology for the developing world. **Chaos, Solitons and Fractals**, v. 30, n. 4, p. 769–773, 2006.
- [16] BIANCO, A.; KOSTARELOS, K.; PRATO, Maurizio. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 674–679, 2005.
- [17] WEISSLEDER, R. et al. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 1418–23, 2005.
- [18] BOGUNIA-KUBIK, K.; SUGISAKA, M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. **BioSystems**, v. 65, p. 123–138, 2002.
- [19] FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 161–171, Mar. 2005.
- [20] NAJLAH, M.; D'EMANUELE, A. Crossing cellular barriers using dendrimer nanotechnologies. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 1–6, 2006.
- [21] FATTAL, E.; ROJAS, J.; YOUSSEF, M.; COUVREUR, P.; ANDREMONT, A. Liposome-entrapped ampicillin in the treatment of experimental murine listeriosis and salmonellosis. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 35, p. 770–772, 1991. In: BOGUNIA-KUBIK, K.; SUGISAKA, M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. **BioSystems**, v. 65, p. 123–138, 2002.
- [22] REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation II: biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 53–65, 2006.
- [23] PACHECO, R. F.; MARQUINAB, C.; VALDIVIA, J. G.; GUTIÉRREZ, M.; ROMERO, M. S.; CORNUDELLAC, R.; LABORDAD, A.; VILORIAD, A.; T.; GARCÍA, A.; JALÓN, J. A. G. de; IBARRAA, M. R. Magnetic nanoparticles for local drug delivery using magnetic implants. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p. 318–322, 2007.
- [24] ALEXIOU, C.; JURGONSA, R.; SCHMIDA, R.; HILPERTB, A.; BERGEMANN, C.; PARAKD, F.; IROA, H. In: VITRO and in vivo investigations of targeted chemotherapy with magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 389–393, 2005.
- [25] GUEDES, M.H.A.; GUEDES, M.E.A.; MORAIS, P.C., et al., Proposal of a magnetohyperthermic system: preliminary biological tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 2406–2407: 272–76, 2004.

- [26] 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. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 41, n. 10, p. 4108-4110, 2005.
- [27] BARBOSA, L.S. Avaliação *in vivo* da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, FS, UnB. 2004.
- [28] ALMEIDA, Oslei Paes; JORGE JUNIOR, Jacks, SCULLY, Crispian. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 4, p. 268-274, 2003.
- [29] SCHOFIELD, Christina M.; HOSPENTHAL, Duane R. **Paracoccidioidomycosis**. Emedicine, 2006. Disponível em: <http://www.emedicine.com/med/topic1731.htm>.
- [30] DEISMUKES, W.E.; PAPPAS, P.G., SOBEL, J.D. (Eds.). Clinical Mycology. New York: Oxford University Press, p. 328–345, 2003. In: GONZALEZ, A.; LENZI, H.L.; MOTTA, E.M.; CAPUTO, L.; SAHAZA, J.H.; COCK, A.M.; RUIZ, A.C.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 666–673, 2005.
- [31] LONDERO, A.T. Paracoccidioidomicose: formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *Journal Pneumology*, v. 12, p. 41–60, 1986. In: GONZALEZ, A.; LENZI, H.L.; MOTTA, E.M.; CAPUTO, L.; SAHAZA, J.H.; COCK, A.M.; RUIZ, A.C.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 666–673, 2005.
- [32] RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*, v. 23, p. 323–34, 1985. In: GOES, T.S.; GOES, V.S.; KALAPOTHAKIS, E.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Identification of immunogenic proteins from *Paracoccidioides brasiliensis* antigenic fractions F0, FII and FIII. **Immunology Letters**, v. 101, p. 24–31, 2005.
- [33] CALICH, V.L.; VAZ, C.A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol*, v. 149, p. 407–417, 1998. In: GOES, T.S.; GOES, V.S.; KALAPOTHAKIS, E.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Identification of immunogenic proteins from *Paracoccidioides brasiliensis* antigenic fractions F0, FII and FIII. **Immunology Letters**, v. 101, p. 24–31, 2005.
- [34] GOES, T.S.; GOES, V.S.; KALAPOTHAKIS, E.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Identification of immunogenic proteins from *Paracoccidioides brasiliensis* antigenic fractions F0, FII and FIII. **Immunology Letters**, v. 101, p. 24–31, 2005.
- [35] SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; PÔNCIO MENDES, R.; LOPES COLOMBO, A.; MORETTI, M. L.; Consenso em Paracoccidioidomicose. Consenso em

paracoccidioidomycosis Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, mai./jun. 2006.

[36] FUKUI, H.; KOIKE, T.; SAHEKI, A.; SONOKE, S.; TOMII, Y.; SEKI, J. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS®). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 51–60, 2003.

[37] BARRETT, J. P.; VARDULAKI, K. A.; CONLON, C.; COOKE, J.; DAZA-RAMIREZ, P.; EVANS, E. G. V.; HAWKEY, P.M.; HERBRECHT, R.; MARKS, D. I.; MORALEDA, J. M.; PARK, G. R.; SENN, S. J.; VISCOLI, C. A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. Excerpta Medica, Inc. **Clinical Therapeutics**, v. 25, p. 1295-1320, 2003.

[38] GUO, L. S.S. Amphotericin B colloidal dispersion: an improved antifungal therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 149–163, 2001.

[39] DEKRUIJF, B.; DEMEL, R.A. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 339, p. 57, 1974. In: HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; GRZYBOWSKA, J.; BOROWSKI, E. *N*-(1-Piperidinepropionyl)amphotericin B methyl ester (PAME)— a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 287, p. 476–484, 2005.

[40] SEOANE, R.; MIÑONES, J.; CONDE, O.; IRIBARNEGARAY, E.; LANGMUIR, M. *Casas*, v. 15, p. 5567, 1999. In: HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; GRZYBOWSKA, J.; BOROWSKI, E. *N*-(1-Piperidinepropionyl)amphotericin B methyl ester (PAME)— a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 287, p. 476–484, 2005.

[41] REY-GOMEZ-SERRANILLOS, I.; DYNAROWICZ-L, P.; ATKA, J.; MIÑONES, R. ; SEOANE, J. *Colloid Interface Sci*, v. 234, p. 351, 2001. In: HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; GRZYBOWSKA, J.; BOROWSKI, E. *N*-(1-Piperidinepropionyl)amphotericin B methyl ester (PAME)— a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 287, p. 476–484, 2005.

[42] MAZERSKI, J.; BILARD, J.; BOROWSKI, E. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1236, p. 170, 1995. In: HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; GRZYBOWSKA, J.; BOROWSKI, E. *N*-(1-Piperidinepropionyl)amphotericin B methyl ester (PAME)— a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 287, p. 476–484, 2005.

[43] MARKLUND, L.; HENRIKSSON, R.; GRANKVIST, K. Amphotericin b-induced apoptosis and cytotoxicity is prevented by the na⁺, k⁺, zci-cotransport blocker bumetanide. **Pharmacology letters Life Sciences**, v. 66, n. 23, p. 319-324, 2000.

- [44] KINSKY, S.C.; LUSE, S.A.; VAN DEENEN, L.L.; Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol, v. 25, p. 1503, 1996. In: HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; GRZYBOWSKA, J.; BOROWSKI, E. *N*-(1-Piperidinepropionyl)amphotericin B methyl ester (PAME)— a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 287, p. 476–484, 2005.
- [45] HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; GRZYBOWSKA, J.; BOROWSKI, E. Interactions of Amphotericin B derivative of low toxicity with biological membrane components—the Langmuir monolayer approach. **Biophysical Chemistry**, v. 116, p. 77– 88, 2005.
- [46] DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, 2002. Suppl 1, p. 37–41.
- [47] WINGARD, J.; KUBILIS, P.; LEE, L.; YEE, G.; WHITE, M.; WALSH, L. et al. Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with Amphotericin B for suspected or proven aspergilosis. **Clinical Infectious Diseases**; v. 29, p. 1402–1407, 1999
- [48] GARCIA, M. P.; PARCA, R. M.; CHAVES, S. B.; SILVA, L. P.; SANTOS, A. D.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 277-282, 2005.
- [49] GILMAN, A.G., HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2001. p. 864-867.
- [50] HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 1, p. 22-30, 2005.
- [50] DUBIN, C. H. Special delivery: pharmaceutical companies aim to target their drugs with nano precision. *Mech Eng Nanotechnol*, v. 126, 2004. Suppl, p. 10-2. In: [a] HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 1, p. 22-30, 2005.
- [51] RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29; n. 9, p. 1790-1798, 2006.
- [52] RAVI, K. M. N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 234- 258, 2000.
- [53] LAVAN, D. A.; MCGUIRE, T.; LANGER, R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 21; part 10, p. 1184-1191, 2003.
- [54] COURRIER, H. M.; BUTZ, N.; VANDAMME, T. F. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, v. 19, p. 425- 498, 2002. In:

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

[55] WAREE, T; NANTEETIP, L. Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 142–149, 2007.

[56] COHEN, B.E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, p. 95–106, 1998.

[57] UEHARA, R. P.; SÁ, V. H. L. de; KOSHIMURA, É. T.; PRUDENTE, F. V. B.; TUCUNDUVA, L. T. C. de M.; GONÇALVES, M. S.; SAMANO, E. S. T.; GIGLIO, A. d. Continuous infusion of amphotericin B: preliminary experience at Faculdade de Medicina da Fundação ABC. **Sao Paulo Med. J.** , São Paulo, v. 123, n. 5, 2005.

[58] SUBIRA, M.; MARTINO, R.; GOMEZ, L.; MARTI, J. M.; ESTANY, C.; SIERRA, J. Low dose amphotericin b lipid complex vs. conventional amphotericin B for empirical antifungal therapy of neutropenic fever in patients with hematologic malignancies – a randomized, controlled trial. **European Journal of Haematology**, v. 72, p. 342–347, 2004.

[59] VAL BICALHO, A. P. C.; CARNEIRO, R. A. **Apostila de patologia clínica: interpretação clínica das alterações no número dos leucócitos**. Disponível em: <http://www.vet.ufmg.br:8080/Portal_Vet/departamentos/clinica/clinica/documentos/Apostila%20de%20patologia%20clinica.pdf/view>. Acesso em: 28 dez. 2007. p. 31-36.

[60] DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. Practical haematology. 8th. edition. Livingstone: Churchill, 1995. In: SHINOHARA, Elvira Maria Guerra. **Células sanguíneas**. . Disciplina de hematologia clínica, diurno – 2005 Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/C%C3%A9lulas%20sangu%C3%ADneas.pdf>>.

[61] LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, L. M.; MARTINS, E. V.; GARCIA, V. A. P.; REBULA, C. A.; LEMOS, A. P. C.; SOUZA, M. H.; TOURINHO, F. A.; MORAIS P.C.; SILVA, M. F. Toxic effects of ionic fluids in mice. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, p. 90-95, 1999.

[62] STEIN, J. B.; TOLLE, S. W. Episodic leukopenia associated with amphotericin B. **South Medical Journal**, v. 76, 1983. Micromedex, p. 409-410.

[63] MOTTA JÚNIOR, M. C. M. Células do sistema imune. Disponível em: <<http://ioh.medstudents.com.br>>. Acesso em: 08 out. 2006. In: NASCIMENTO, M. de L. P. **Leucocitoses leves e moderadas**. 84. ed. [S.L.]: NewsLab, 2007. p. 156-174.

[64] SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. As citocinas e o sistema de defesa do organismo. Disponível em: <<http://perflin.com/cear/artigos/citocinas>>. Acesso em: 19 abr. 2007. In: NASCIMENTO, M. de L. P.. **Leucocitoses leves e moderadas**. 84. ed. [S.L.]: NewsLab, 2007. p. 156-174.

- [65]. CÉLULAS envolvidas na inflamação. Disponível em: <<http://www.geocities.com>>. Acesso em: 29 abr. 2007. In NASCIMENTO, M. de L. P. **Leucocitoses leves e moderadas**. 84. ed. [S.L.]: NewsLab, p. 156-174, 2007.
- [66] INSTRUÇÕES de uso ALT/GPT Liquiform. Disponível em: <<http://www.labtest.com.br/?lng=pt&s=3&id=11>>. Acesso em: 27 nov. 2007.
- [67] PARKA, S.I.; HWANGB, Y.H.; LIMB, J.H.; KIMC, J.H.; YUNB, H.I.; KIM, C.O. Biological and thermic effects of magnetic fluids for photodynamic therapy and hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 304, p. 403-405, 2006.
- [68] MEDAROVA, Z.; PHAM, W.; FARRAR, C.; PETKOVA, V.; MOORE, A.. Vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. **Nature Medicine**, v. 13, n. 3, 2007.
- [69] INSTRUÇÕES de uso Fosfatase alcalina. Disponível em: <<http://www.labtest.com.br/?lng=pt&s=3&id=45>>. Acesso em: 27 nov. 2007.
- [70] KAPLOWITZ, N.; DELEVE, L. D. **Drug-Induced liver disease**. New York: Marcel Decker, 2003. p. 488.
- [71] MARK, B.; MILLER, A. Reversible hepatotoxicity related to amphotericin. **Canadian Medical Association Journal**, v. 131, n. 15, p. 1245-1247, 1984.
- [72] STUECKLIN-UTSCH, B. A.; HASAN, C.; BODE, U.; FLEISCHHACK, G. Pancreatic toxicity after liposomal amphotericin. **Mycoses**, v. 45, p. 170-173, 2002.
- [73] INSTRUÇÕES de uso Gama GT Liquiform. Disponível em: <<http://www.labtest.com.br/?lng=pt&s=3&id=57>>. Acesso em: 27 nov. 2007.
- [74] SANTIN, F.; MOUTINHO, F. Q.; AMARAL, A. S. do; TAKAHIRA, R. K. Laboratorial accompaniment of kidney funtion of health dogs experimentally treated with therapeutic dosages of amphotericin B. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, 2006.
- [75] QUANTITATIVE colorimetric urea determination at 520nm BioAssay Systems Urea. Disponível em: <<http://www.bioassaysys.com/DIUR.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2007.
- [76] SONAJE, K.; ITALIA, J. L.; SHARMA, G.; BHARDWAJ, V.; TIKOO, K.; KUMAR, M. N. V. Ravi. Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine a-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, 2007.
- [77] INSTRUÇÕES de uso. Uréia. Labtest. Disponível em: <<http://www.labtest.com.br/?lng=pt&s=3&id=92>>. Acesso em: 27 nov. 2007.
- [78] HEIDEL, J. D.; YU, Z.; LIU, J. Yi-Ching; RELE, S. M.; LIANG, Y.; ZEIDAN, R. K.; KORNBRUST, D. J.; DAVIS, Mark E. Administration in non-human primates of escalating

intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. **Proceedings of National Academy of Sciences**, vol. 104, no. 14, 5715–5721. 2007.

[79] ITALIA, J.L.; BHATT, D. K.; BHARDWAJ, V.; TIKOO, K.; KUMARA, M. N .V. Ravi. PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral®. **Journal of Controlled Release**, v.119, p. 197–206, 2007.

[80] MEDLINEPLUS medical encyclopedia: creatinine – serum. **Definition of creatinine**. Disponível em: <<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=12550>>. Acesso em: 14 jan. 2008.

[81] INSTRUÇÃO de uso. Creatinina. Labtest. Disponível em: <<http://www.labtest.com.br/?lng=pt&s=3&id=33>>. Acesso em: 27 nov. 2007.

[82] TIYABOONCHAI, W., LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 142–149, 2007.

[83] Deray G. Amphotericin B nephrotoxicity. **J. Antimicrob. Chemother.** V. 49 Suppl S1, p. 37-41, 2002.

[84] Dupont B. Overview of the lipid formulations of amphotericin. **J. Antimicrob. Chemother.** V. 49 Suppl. S1, p. 31-36, 2002.

[85] VARELA, M. C.; GUZMAN, M.; MOLPECERES, J.; ROSARIO ABERTURAS, M. Del; RODRIGUEZ-PUYOL, D.; RODRIGUEZ-PUYOL, M.. Cyclosporine-loaded polycaprolactone nanoparticles: immunosuppression and nephrotoxicity in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, p. 471–478, 2007.

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

[87] GUEDES, M. H. A., SADEGHIANI, N.; PEIXOTO, D. L. G.; COELHO, J. P.; BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, R. B.; KUCKELHAUS, S.; SILVA, M. de F. Da; MORAIS, P. C.; LACAVA, 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.

[88] MONTENEGRO, M. R.; FECCHIO, D. Inflamação: conceitos gerais e inflamação aguda. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO M. Patologia: processos gerais . 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.109-128. In: MURAD, I.; BERSANIAMADO, C. A.; SILVA, F. Pereira; CUMAN, R. K. N. Efeito comparativo do potencial irritativo da solução de fenol a 1% e a 0,5% no peritônio do rato. **Arquivos da Apadec**, v. 8, maio, 2004. Supl., p. 832-836.

[89] 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, n. 10, 2006.

[90] FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3rd. Ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

[91] EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedical Pharmacotherapics**, v. 55, p. 333-9, 2001.

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

[93] FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

[94] RIBEIRO, L.R. 2003. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORE, D.M.F.; Marques, E.K. (Orgs). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Da Libra, 2003. cap.7, p.173-200.

[95] FAGUNDES, F. A.; OLIVEIRA, L. B. de; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. Annona coriacea induz efeito genotóxico em Camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 24-29, 2005.

[96] OECD guideline for the testing of chemicals. **Mammalian erythrocyte micronucleus test adopted**. 21st, July 1997. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/18/34/1948442.pdf>>. Acesso em: 26 dez. 2007.

[97] DEMSIA, G.; VLASTOS, D.; GOUMENOU, M.; MATTHOPOULOS, D. P. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl incultures human lymphocytes and rat bone marrow. **Mutation Research**, v. 634, p. 32-39, 2007.

[98] BULÁRIO eletrônico da Anvisa. **Bula do profissional de saúde**. Disponível em: <<http://bulario.bvs.br/index.php?action=search.2004030315394456998982000107&mode=dir&letter=A>>. Acesso em: 26 dez. 2007.

[99] PRODUCT INFORMATION – Australia. **Amphotericin powder for intravenous infusion** (Amphotericin B Cholesteryl Sulfate Complex). Disponível em: <http://www.maynepharma.com/AU/Files/amphotericin_B_Amphocil_pi.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2007.

[100] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Health effects test guidelines oppts 870.5395 mammalian erythrocyte micronucleus test**. 1998. Disponível em: <<http://epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS>>. Acesso em: 26 dez. 2007.

- [101] GARCIA, V. A. P.; LACAVA, L. M.; KÜCKELHAUS, S.; AZEVEDO, R. B.; SILVA, M. F. Da; MORAIS, P. C.; CUYPER, M. De; LACAVA, Z. G. M.. Magnetoliposome evaluation using cytometry and micronucleus test.. **European Cells and Materials**, v. 3, 2002. Suppl. 2 p. 154-155.
- [102] BRUGIN, A. **Toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss**. Tese (Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular Avaliação da Biocompatibilidade)– Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- [103] GARCIA, V. A. P. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos**. Tese (Doutoramento do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular)– Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.
- [104] LACAVA, Z. G. M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. **The use of magnetic nanoparticles in drug delivery systems: nanoparticles interactions with cells**. In: Handbook of Particulate Drug Delivery, Vol. 1. . Editado por M.N.V. Ravi Kumar, Ed. ASP, California, 2008.
- [105] SURGICAL pathology - histology staining manual - minerals and pigments. iron - prussian blue reaction - mallory's method. Disponível em: <<http://library.med.utah.edu/webpath/histhtml/manuals/iron.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2008.
- [106] ANDREWS, N. C. Disorders of iron metabolism. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1986-95, 1999.

Anexo 1 – Contagem global e diferencial de leucócitos.

Tempo	Tratamento		CGL	Neu.	Eos.	Lin.	Mon.	Bas.
12 horas	PBS	Média	7316,7	544,4	16,9	6635,1	102,3	18,0
		DP	2547,7	359,1	15,6	2691,3	62,2	20,6
	AnfoB	Média	3908,3	578,8	18,3	3277,7	33,6	0,0
		DP	1378,9	363,8	21,4	1422,2	15,6	0,0
	FM-AnfoB	Média	9750,0	1335,4	66,3	8244,6	103,7	2,0
		DP	4544,4	1054,2	48,5	4827,5	73,5	4,9
24 horas	PBS	Média	6733,3	433,1	65,8	6107,4	123,0	4,1
		DP	1511,9	179,9	62,4	1321,1	41,2	7,1
	AnfoB	Média	5991,7	401,7	60,4	5413,1	112,4	4,1
		DP	1696,3	170,4	28,8	1639,3	44,1	6,8
	FM-AnfoB	Média	6066,7	681,7	121,1	5062,0	201,8	0,0
		DP	2464,5	228,2	210,3	2117,3	179,6	0,0
7 dias	PBS	Média	6883,3	166,3	28,6	6637,9	46,8	3,7
		DP	1404,8	98,3	19,1	1345,3	17,5	6,4
	AnfoB	Média	5375,0	338,1	136,9	4768,0	128,5	3,7
		DP	2867,9	160,5	219,4	2392,8	167,9	9,0
	FM-AnfoB	Média	9140,0	734,7	108,2	8270,0	27,1	0,0
		DP	2659,5	353,5	87,4	2475,1	27,2	0,0
15 dias	PBS	Média	10870,0	637,9	213,4	9902,9	115,8	0,0
		DP	2861,9	362,6	170,8	2428,4	93,1	0,0
	AnfoB	Média	5080,0	438,9	122,1	4406,4	982,0	2,1
		DP	1053,9	35,3	79,3	1125,7	1951,1	4,6
	FM-AnfoB	Média	6270,0	744,1	84,8	5391,5	49,6	0,0
		DP	3923,9	552,6	77,8	3334,4	49,2	0,0
30 dias	PBS	Média	7183,3	537,8	96,8	6492,7	56,1	0,0
		DP	2967,0	368,0	84,0	2724,0	31,4	0,0
	AnfoB	Média	10033,3	857,9	278,3	8436,3	62,3	8,5
		DP	4316,3	737,5	578,7	4340,0	39,8	13,3
	FM-AnfoB	Média	8550,0	366,4	55,6	8021,3	113,4	0,0
		DP	2667,6	156,5	52,8	2730,5	102,1	0,0
80 dias	PBS	Média	4608,3	424,6	32,4	4075,2	74,0	2,2
		DP	1761,4	212,5	33,8	1580,2	30,8	5,4
	AnfoB	Média	7550,0	567,2	100,3	6688,1	188,7	5,7
		DP	3139,8	413,3	97,5	2978,0	280,0	15,1
	FM-AnfoB	Média	6837,5	461,9	71,0	6214,5	86,2	4,0
		DP	3205,0	145,2	43,2	3081,5	73,8	8,0

Anexo 2: Contagem de células peritoneais.

Tempos	Ttos		Valores Absolutos					Valores Relativos				
			Mast.	Eos.	Neut.	Linf.	Mac.	Mast.	Eos.	Neut.	Linf.	Mac.
12 horas	PBS	Média	7	8	20	73	394	1	2	4	15	79
		DP	2	3	11	80	74	0	1	2	16	15
	AnfoB	Média	8	10	49	51	383	2	2	10	10	77
		DP	4	7	41	17	47	1	1	8	3	9
	FM-AnfoB	Média	4	25	150	75	246	1	5	30	15	49
		DP	4	25	84	61	89	1	5	17	12	18
24 horas	PBS	Média	7	8	15	100	369	1	2	3	20	74
		DP	2	2	15	68	82	0	0	3	14	16
	AnfoB	Média	4	15	16	72	395	1	3	3	14	79
		DP	2	14	14	75	87	0	3	3	15	17
	FM-AnfoB	Média	0	49	131	79	240	0	10	26	16	48
		DP	1	15	55	20	53	0	3	11	4	11
7 dias	PBS	Média	1	9	11	103	377	0	2	2	21	75
		DP	2	4	3	37	36	0	1	1	7	7
	AnfoB	Média	4	15	31	50	400	1	3	6	10	80
		DP	2	4	21	30	50	0	1	4	6	10
	FM-AnfoB	Média	1	48	64	96	292	0	10	13	19	58
		DP	1	20	42	60	81	0	4	8	12	16
15 dias	PBS	Média	1	5	25	206	263	0	1	5	41	53
		DP	1	4	10	33	23	0	1	2	7	5
	AnfoB	Média	2	33	89	142	234	0	7	18	28	47
		DP	2	13	45	60	91	0	3	9	12	18
	FM-AnfoB	Média	2	33	10	95	366	0	7	2	19	72
		DP	2	25	2	61	85	0	5	0	12	17
30 dias	PBS	Média	4	36	12	96	352	1	7	2	19	70
		DP	2	16	3	59	51	0	3	1	12	10
	AnfoB	Média	4	53	19	129	295	1	11	4	26	59
		DP	3	47	14	40	72	1	9	3	8	14
	FM-AnfoB	Média	0	11	42	118	330	0	2	8	23	66
		DP	1	9	21	50	72	0	2	4	10	14
80 dias	PBS	Média	2	9	3	155	334	0	2	1	31	67
		DP	3	7	1	112	113	1	1	0	22	23

AnfoB	Média	3	17	5	172	307	0	3	1	34	61
	DP	3	21	5	86	79	1	4	1	17	16
FM-											
AnfoB	Média	0	20	11	73	398	0	4	2	15	80
	DP	0	27	7	58	54	0	5	1	11	11

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.