

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE FLUIDO MAGNÉTICO À  
BASE DE NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA RECOBERTAS POR  
POLIFOSFATO EM CAMUNDONGOS**

**FLÁVIA ARRUDA PORTILHO CORRÊA**

**FLÁVIA ARRUDA PORTILHO CORRÊA**

**AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE FLUIDO MAGNÉTICO À  
BASE DE NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA RECOBERTAS POR  
POLIFOSFATO EM CAMUNDONGOS**

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  
2007**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais (Eumil e Neide), ao meu marido (Ronald) e às minhas filhas (Bruna e Carolina) pelo carinho, incentivo e dedicação prestados a mim hoje e sempre.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade da vida e pelas graças recebidas diariamente.

À professora Zulmira Guerrero Marques Lacava por ter me dado esta oportunidade. Obrigada, também, pela boa companhia, pelos ensinamentos e por sua compreensão nos momentos necessários.

À Dra. Maria Terezinha de Oliveira Cardoso por sempre ter confiado em mim e ter me incentivado a estar aqui hoje. Obrigada por sua amizade e seus ensinamentos.

À Cleide, por ter cuidado da Bruna e Carolina durante todas as vezes que precisei estar ausente. Obrigada pelo carinho que você tem pelas crianças.

Às minhas irmãs, Déia, Dri e Val, pela confiança, incentivo e ajuda nos momentos necessários. Amo vocês.

Aos cunhados (Neco, Mê, Lu, Robert e Tat) e sobrinhos (Gui, Lulu, Sérgio, Pedrinho e Lala) pelas palavras de incentivo e pelo carinho que sempre recebi.

Aos meus sogros Ivanice e Dudu, pelo carinho que recebo diariamente. Obrigada por tudo que vocês sempre fizeram pela gente.

Aos professores Ricardo, Maria Imaculada, Tosta, Élide, Anamélia, pelos ensinamentos que, com certeza, colaboraram muito para a elaboração deste trabalho.

Aos professores César Grisólia e Maria de Fátima, por terem me ajudado nos momentos em que precisei. Obrigada por tudo!!

À professora Emília, por ter gentilmente cedido a amostra de polifosfato.

À Adriana Brugin (Dri), por ter sido tão companheira e amiga durante todos estes anos. Obrigada por sua paciência e prestatividade. Você é muito importante pra mim. Te adoro!

À Lane, por todos os ensinamentos que tive até mesmo antes de começar o mestrado. Aprendi muito com você. Obrigada por tudo! Te adoro!

Aos meus colegas queridos (Dani, Júlia, Neda, Mirian, Lulu, Leonora, Camilinha, Letícia, Ana Luisa, Ana Elisabete, Arthur, Cassinha, Débora, Gleyson, Maria Carolina, Nayara, André, Ana Laura, Bruno, Ornil) por tudo de bom que vocês me proporcionaram durante estes dois anos. Obrigada pelos ensinamentos, carinho, amizade, gargalhadas (que foram muitas), companhia e respeito que vocês sempre tiveram por mim. Adoro vocês.

À Eliza (Glorinha), por ser tão prestativa, carinhosa (apesar de me chamar de tia) e amiga. Obrigada, querida. Espero um dia poder retribuir a sua ajuda.

Aos colegas Grazi, Sacha e Carol por toda ajuda recebida nos momentos de aperto.

Aos meus colegas Yanna, Iara, Renatinha, Thaís, Mariana, Maria Creuza, Rafa e Sandra, pela amizade e carinho. Que bom ter conhecido vocês!

Aos meus amigos queridos de tanto tempo (Pat, Rê, Flá, Ronaldo, Aninha, Henrique, Inaê, Dâ e Germana) pelo carinho e incentivo. Amo vocês.

Ao laboratório exame por ter me concedido a licença necessária para a realização deste trabalho.

À CAPES e à FINATEC, pelo auxílio e realização desta pesquisa.

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO.</b>	.1
1.1 Materiais nanoestruturados.	.1
1.2 Fluido magnético..	.3
1.3 Aplicações.	.4
1.3.1 Aplicação diagnóstica.	.4
1.3.2 Aplicação terapêutica.	.5
1.3.2.1 Sistemas entregadores de drogas.	.5
1.3.2.2 Magnetohipertermia.	.6
1.4 Testes biológicos..	.7
<b>2 OBJETIVO.</b>	.9
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.</b>	.10
3.1 Amostra.	.10

3.1.1 Caracterização das partículas de maghemita do FMF para Microscopia Eletrônica de Transmissão. . . . .	.10
3.2 Animais. . . . .	.10
3.3 Tratamento dos animais FMF. . . . .	.11
3.3.1 Avaliação de toxicidade em células peritoneais. . . . .	.11
3.3.2 Avaliação da contagem global de leucócitos. . . . .	.12
3.3.3 Avaliação da contagem diferencial de leucócitos. . . . .	.12
3.3.4 Avaliação da genotoxicidade. . . . .	.13
3.3.5 Avaliação histológica. . . . .	.14
3.4 Testes estatísticos. . . . .	.14
<b>4 RESULTADOS. . . . .</b>	<b>.16</b>
4.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas. . . . .	.16
4.1.1 Determinação do diâmetro das amostras do FMF. . . . .	.16
4.2 Teste de viabilidade celular. . . . .	.17
4.2.1 Avaliação da viabilidade celular do FMF-1 e FMF-2.. . . .	.18
4.3 Análise citométrica. . . . .	.18
4.3.1 Avaliação citométrica em animais tratados com FMF-1. . . . .	.19

4.3.2 Avaliação citométrica em animais tratados com FMF-2.	.22
4.4 Teste de micronúcleo.	.23
4.4.1 Avaliação de genotoxicidade do FMF-1 e FMF-2.	.23
4.4.2 Avaliação de citotoxicidade do FMF-1 e FMF-2.	.24
4.5 Histologia.	.25
4.5.1 Efeito histológico em animais tratados com FMF-1.	.27
4.5.1.1 Pulmão.	.27
4.5.1.2 Fígado.	.28
4.5.1.3 Baço.	.29
4.5.2 Efeito histológico em animais tratados com FMF-2.	.29
4.5.2.1 Pulmão.	.29
4.5.2.2 Fígado.	.30
4.5.2.3 Baço.	.30
<b>5 DISCUSSÃO.</b>	<b>.45</b>
5.1 Considerações sobre a amostra de polifosfato.	.45
5.2 Considerações sobre o ferro.	.47
5.3 Considerações sobre o teste de viabilidade.	.49

5.4 Considerações sobre a análise citométrica. . . . .	.49
5.5 Considerações sobre o teste de micronúcleo. . . . .	.52
5.6 Considerações sobre o teste histológico. . . . .	54
<b>6 CONCLUSÃO.</b> . . . . .	.58
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b> . . . . .	.59
<b>ANEXOS.</b> . . . . .	.66
Anexo 1. . . . .	.66
Anexo 2. . . . .	.67
Anexo 3. . . . .	.68
Anexo 4. . . . .	.72
Anexo 5. . . . .	.73
Anexo 6. . . . .	.74

## ABREVIATURAS

ENC – Eritrócitos normocromáticos

EPC – Eritrócitos policromáticos

FM – Fluido magnético

FMF – Fluido magnético à base de nanopartículas magnéticas de maghemita recobertas com polifosfato

FMF-1 – Fluido magnético à base de NPM de maghemita recobertas com polifosfato na concentração de  $0,7 \times 10^{15}$  partículas

FMF-2 – Fluido magnético à base de NPM de maghemita recobertas com polifosfato na concentração de  $1,4 \times 10^{15}$  partículas

HE – Hematoxilina-eosina

MN – Micronúcleo

NP – Nanopartículas

NPM – Nanopartículas magnéticas

SFM – Sistema fagocitário mononuclear

## I. RESUMO

A nanotecnologia representa, atualmente, uma área de interesse crescente. Dentre os materiais nanoestruturados que vêm sendo desenvolvidos, as nanopartículas magnéticas (NPM) surgem como proposta promissora para várias aplicações na área biomédica como, por exemplo, magnetohipertermia para tratamentos de tumores, entrega de drogas alvo-específico, agente de contraste para a imagem por ressonância magnética.

Considerando a necessidade de testar novos materiais antes de seu emprego clínico, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade (toxicidade e genotoxicidade) de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas com polifosfato (FMF), em duas concentrações diferentes ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas em  $50 \mu\text{L}$  nomeada FMF-1 e  $1,4 \times 10^{15}$  partículas em  $100 \mu\text{L}$ , a FMF-2), por meio de testes de viabilidade de células peritoneais, citometria de sangue periférico, ensaio de micronúcleo (MN) e análise morfológica, em camundongos fêmeas Swiss.

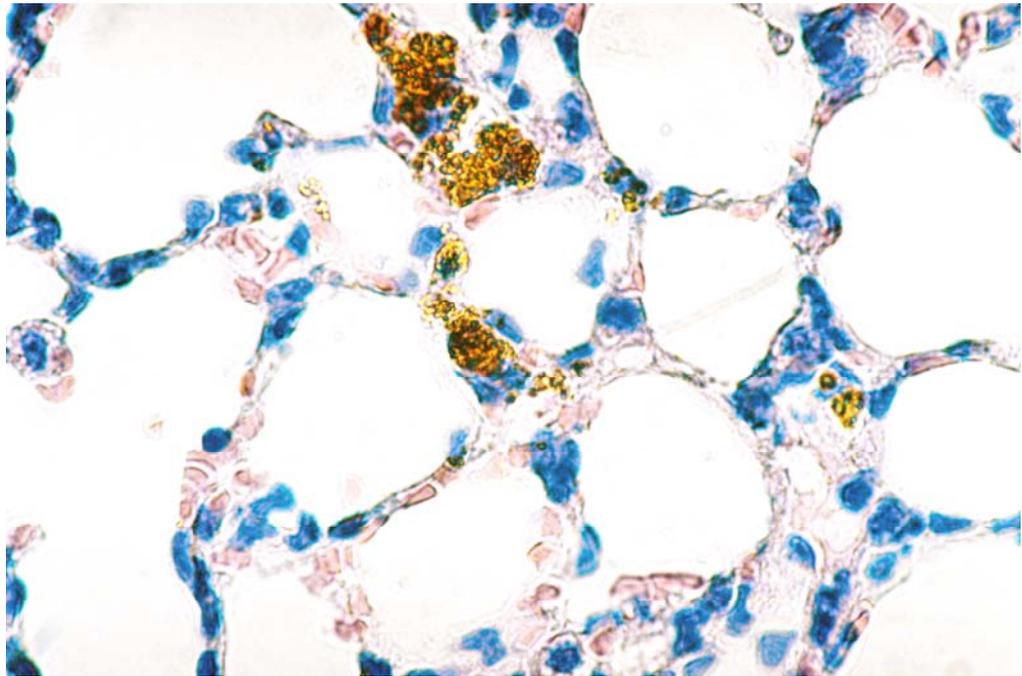
A amostra FMF, no período que abrangeu de 30 minutos a sete dias, não afetou a viabilidade de células peritoneais, apresentou brando e temporário processo inflamatório (análise citométrica), ausência de genotoxicidade e baixa citotoxicidade nas células da medula óssea (ensaio de MN). Estudos morfológicos revelaram, em microscópio de luz, a presença de aglomerados de NPM nos três órgãos analisados (pulmão, fígado e baço). Ainda assim, não foram observadas alterações morfológicas no baço, e apenas ligeiro infiltrado celular no fígado (também observado nos controles) e pulmão, órgão em que também foi encontrado espessamento temporário dos septos alveolares. A toxicidade induzida pela amostra FMF é tempo e dose dependente. Os resultados obtidos permitem concluir que FMF possui biocompatibilidade adequada para aplicações biomédicas, como magnetohipertermia e sistemas entregadores de drogas.

## II. ABSTRACT

Nowadays, nanotechnology represents a broad area of increasing interest. Several kinds of nanostructured materials have been synthesized. Among them magnetic nanoparticles (MNPs) represent a promising class to be used in several biomedical applications, such as magnetohyperthermia for tumor therapy, target-specific drug delivery, and contrast agents for magnetic resonance images.

New materials have to be pre-clinical tested before they can be used for clinical trials. Therefore, the aim of this work was to evaluate the biocompatibility (toxicity and genotoxicity) of a new magnetic sample based on maghemite nanoparticles coated with polyphosphate (FMF), using two different concentrations ( $0.7 \times 10^{15}$  particle in 50 $\mu$ L named FMF-1 and  $1.4 \times 10^{15}$  particle in 100 $\mu$ L named FMF-2). FMF sample was tested using female Swiss mice through viability of peritoneal cells, cytometry of blood cells, micronucleus assay (MN), and morphological analysis.

FMF sample effects were investigated from 30 minutes until 7 days after the administration. The viability of peritoneal cells was not affected. Light and temporary inflammatory process (cytometry analysis), absence of genotoxicity, and a slight cytotoxicity of bone marrow cells (MN assay) were found. Morphological studies performed under light microscope showed the presence of MNP clusters in three investigated organs: liver, lung, and spleen. Nevertheless, despite the observation of MNP clusters, no morphological alterations were found in the spleen, and only a slight cell infiltration was found in the liver (also observed in the control animals) and lungs. In was also found in the lungs a temporary alveolar septum enlargement. All the toxicity effects of FMF are time and doses dependent. The results allow concluding that the FMF sample presents biocompatibility adequate to be used in biomedical applications, such as magnetohyperthermia and drug delivery systems.



## 1. INTRODUÇÃO

Nanociência e nanotecnologia são termos que se referem, respectivamente, ao estudo e às aplicações tecnológicas de objetos e dispositivos que tenham ao menos uma de suas dimensões físicas menores que, ou da ordem de, algumas dezenas de nanômetros (Melo; Pimenta, 2004). Nano (do grego: “anão”) é um prefixo usado nas ciências para designar uma parte em um bilhão e, assim, um nanômetro (1nm) corresponde a um bilionésimo de um metro.

A nanotecnologia, ciência multidisciplinar por natureza, tem potencial de revolucionar amplamente vários campos tecnológicos e científicos, como os da biologia, da física, da química e da engenharia. Quando aplicada às ciências da vida, recebe o nome de nanobiotecnologia. Seu papel na criação de novas drogas está em fase inicial de desenvolvimento, entretanto o conhecimento na área cresce de forma rápida e multidirecional (Fortina et al., 2005). Atualmente, sua aplicação na área médica, nanomedicina, é bastante promissora, pois busca desenvolver processos de tratamento e diagnóstico de diversas patologias, a fim de preservar e melhorar a saúde humana (Freitas Jr., 2005).

### **1.1 Materiais nanoestruturados**

A pesquisa em nanotecnologia é muito ampla, interdisciplinar e baseada nos mais diversos tipos de materiais – polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais – estruturados em escala nanométrica, nanoestruturados, de modo a formar blocos de construção, tais como *clusters*, nanotubos e nanofibras, que, por sua vez, são formados a partir de átomos ou de moléculas. Dessa forma, a síntese controlada desses blocos de construção e seu subsequente arranjo para formar materiais e/ou dispositivos nanoestruturados constitui seu objeto central (Medeiros; Paterno; Mattoso, 2006).

Uma classe particularmente interessante de material nanoestruturado é constituída pelas nanopartículas magnéticas. Estas oferecem muitas possibilidades atrativas em biotecnologia, primeiramente porque possuem dimensões comparáveis às do vírus (20-500nm), proteínas (5-50nm) ou até mesmo às do gene (2nm) (Tartaj et al., 2005). Em segundo lugar, por serem magnéticas, elas podem ser manipuladas mesmo quando introduzidas em um organismo por meio de um gradiente de campo magnético externo (Lacava et al., 2003). E, finalmente, porque as nanopartículas possuem uma grande superfície que pode ser modificada e associada a agentes biológicos, tais como proteínas (Lee et al., 2006) e anticorpos, entre outros (Tartaj et al., 2005) Ataman-Önal e colaboradores (2006), por exemplo, descrevem o uso de nanopartículas associadas à proteína p24 do HIV-1 como um sistema promissor no desenvolvimento de vacinas.

As propriedades magnéticas de uma nanopartícula estão diretamente relacionadas ao seu tamanho. O ferro é um exemplo de material magnético usado para fazer ímãs permanentes, porém nanopartículas de ferro de tamanho menor que 4 nm perdem suas propriedades magnéticas (Ma et al., 2004).

Além de determinar as propriedades magnéticas, o diâmetro médio das partículas, quando administradas a um ser vivo – via endovenosa, intraperitoneal ou injetadas diretamente na área do tratamento –, pode influenciar diretamente no tempo de permanência no organismo, na velocidade com que atravessam a barreira endotelial e no seu reconhecimento pelo sistema mononuclear fagocitário (Sadeghiani, 2004).

## 1.2. Fluido Magnético

Nanopartículas magnéticas suspensas em líquidos carreadores de natureza polar ou apolar (Rheinländer et al., 2000) compõem os fluidos magnéticos ou ferrofluidos. Nestes fluidos, o comportamento magnético das nanopartículas é distribuído homogeneamente para todo o líquido, característica que desperta o interesse nas áreas tecnológica, industrial e biomédica. Na área biomédica, os fluidos magnéticos (FM) podem ser empregados em aplicações diversas, como separação magnética de células, sistemas de entrega de drogas, tratamento de câncer por magnetohipertermia, aumento de contraste em imagens de ressonância magnética purificação de ADN, imobilização de enzimas e proteínas na superfície das NPM, entre outras (Santana et al., 2005).

Uma característica fundamental das suspensões coloidais é a tendência natural de aglomeração de suas nanopartículas. Para se obter a estabilidade coloidal, deve-se minimizar a possibilidade de aglomeração e uma das maneiras de atingi-la é fazer com que as partículas sejam pequenas o suficiente para que não haja precipitação, permitindo que o movimento browniano atue como agente dispersante (Silveira, 2006). A estabilidade de um fluido magnético pode também ser obtida por meio do recobrimento das nanopartículas com moléculas apropriadas.

Para uso biomédico, os FM devem ser biocompatíveis – biodegradáveis e hemocompatíveis –, e não tóxicos ao organismo, pois as partículas magnéticas devem atravessar a barreira endotelial e devem acumular-se especificamente nas células alvo, sem induzir danos às células normais. Para tanto, as partículas devem ser recobertas com material biologicamente ativo. Seus parâmetros físicos, como o tamanho da partícula e a susceptibilidade magnética da suspensão, devem ser controlados; e seu comportamento no organismo, conhecido (Garcia, 2002).

### **1.3 Aplicações**

Diversos materiais magnéticos podem ser utilizados para aplicações biomédicas; estas, por sua vez, podem ser classificadas em diagnósticas – imagens de ressonância magnética nuclear – e terapêuticas – magnetohipertermia e liberação de drogas.

#### **1.3.1 Aplicação diagnóstica**

A ressonância magnética nuclear (RMN) tem-se destacado em relação às outras técnicas de obtenção de imagem pela alta resolução espacial que oferece, em se tratando da diferença de contraste entre os tecidos, o que possibilita o diagnóstico precoce de diversas patologias.

O interesse na utilização das nanopartículas magnéticas como agentes de contraste vem crescendo nos últimos anos. (Ito et al., 2005; Will et al., 2005). Um caso especial de obtenção de imagens por RMN é alcançado pela associação de anticorpos monoclonais às NPM. Esta associação permite a detecção precoce de micrometástases por RMN devido à absorção de NPM pelas células tumorais, o que possibilita o tratamento subsequente pelo processo de magnetohipertermia, facilitando a erradicação do câncer (Lacava, 2006).

Isto foi mostrado por Suzuki e colaboradores, em 1996, que desenvolveram agentes de contraste por meio da utilização de nanopartículas de magnetita recobertas por PEG (polietileno glicol), associadas a anticorpos monoclonais específicos para glioma humano (Ito et al., 2005).

## **1.3.2 Aplicação Terapêutica**

### **1.3.2.1 Sistemas entregadores de drogas**

A entrega de drogas é preferencialmente feita por via oral e por via endovenosa, o que requer que as drogas sejam formuladas para se adequar a estas rotas de entrega. No entanto, estas duas vias nem sempre são as mais adequadas para uma terapia em particular, como, por exemplo, vias pulmonares, barreiras epiteliais e hemato-cefálica (Hughes, 2005). A nanotecnologia está abrindo novas oportunidades terapêuticas para agentes que não podem ser efetivamente usados com formulações de drogas convencionais, seja pela baixa viabilidade, seja pela instabilidade da droga (Emerich; Thanos, 2006). A utilização de nanopartículas – poliméricas, de cerâmica, lipossomas, dendrímeros – como entregadores de drogas apresenta muitas vantagens: (i) devido ao seu tamanho pequeno, as nanopartículas conseguem penetrar em pequenos capilares e são capturadas por células, permitindo um acúmulo eficiente em alvos específicos; (ii) o uso de materiais biodegradáveis para a preparação das nanopartículas permite sustentar a liberação da droga dentro de alvos específicos por um período de dias e até por semanas. Há também uma boa relação de custo-benefício: (i) a formulação de carreadores de drogas envolve um baixo custo quando comparado à descoberta de uma nova molécula; (ii) minimizar o uso de drogas caras tem como impacto a redução no custo do produto (Bystrzejewski; Huczko; Lange, 2005).

É possível construir estruturas moleculares nanométricas capazes de armazenar em seu interior moléculas ou substâncias ativas de medicamentos, de modo que venham a funcionar como vetores capazes não só do transporte pelo organismo como também do controle da taxa de liberação ou do ambiente fisiológico adequado, para que essa liberação do composto específico ocorra (Melo; Pimenta, 2004).

As nanopartículas magnéticas possuem propriedades interessantes que se adequam aos sistemas de entrega de drogas. Widder e colaboradores, em 1978, demonstraram a possibilidade de se utilizar NPM como carreadores de drogas anti-câncer. Desde então, diferentes enfoques têm sido investigados com o intuito de se desenvolver sistemas magnéticos capazes de entregar, concentrar e liberar a droga em um alvo específico, minimizando os efeitos colaterais de agentes quimioterápicos (Lacava et al, 2007 *in press*). Existem diferentes formas de as NPM, associadas às drogas, alcançarem o alvo específico: conjugada a uma outra molécula – anticorpos, proteínas, lectinas, hormônios – capaz de reconhecer e de se ligar especificamente ao sítio alvo; ou, então, o conjugado NPM-droga pode ser atraído para o tecido alvo por manipulação de um gradiente de campo magnético externo. Neste caso, ele ainda pode ser usado como instrumento térmico de liberação controlada quando as NPM forem excitadas por um campo magnético de frequência alternada (Hughes, 2005).

### **1.3.2.2 Magnetohipertermia**

O termo hipertermia significa aumento da temperatura corporal. Este aumento pode ser causado por agentes externos – exposição ao sol ou locais de temperatura elevada – ou por agentes internos – reação do organismo. A aplicação da hipertermia, que proporciona um aumento de temperatura significativo (entre 5° a 8°C), tem-se mostrado promissora como terapia contra o câncer (Vasseur et al., 2006) e está sendo utilizada para intensificar a eficácia da quimioterapia e da radioterapia (Guedes et al., 2005). As células na fase S do ciclo celular, por exemplo, são relativamente resistentes à radiação, porém são sensíveis à hipertermia (Vasanthan et al., 2005). Trabalhos recentes têm evidenciado que a técnica de associação dessas duas terapias sugere uma vantagem (Zee et al., 2000; Deger et al., 2002;

Lammers et al., 2006) Numerosas aplicações clínicas com aquecimento de tecido têm sido identificadas, incluindo redução da dor ou inflamação e preservação de órgãos (Stauffer, 2005). Hipertermia é um agente efetivo para destruição celular, especialmente para células em hipóxia, necessitadas de nutrientes e que estejam em ambiente de baixo pH, características comumente presentes em tumores malignos (Aktas et al., 2006).

O aumento de temperatura necessário para a obtenção da hipertermia pode ser alcançado, entre outros métodos, pelo uso de nanopartículas magnéticas. Partículas ferromagnéticas cobertas com polímero ou moléculas biodegradáveis podem ser aquecidas pela aplicação de um campo magnético externo de frequência alternada, sendo, portanto, capazes de produzir aquecimento localizado em uma área desejada (Chatterjee et al., 2005). Uma vez no tumor, estes materiais induzem as células à destruição, enquanto a maioria do tecido normal permanece relativamente ileso. Existem muitos tipos de materiais magnéticos que podem ser usados para gerar e dissipar calor. Os principais são: materiais ferromagnéticos, ferrimagnéticos e superparamagnéticos, todos adequados para estas aplicações específicas (Bretcanua et al., 2006). Entretanto, as partículas superparamagnéticas apresentam características interessantes por não reter magnetismo após a remoção do campo magnético (Gupta; Gupta, 2005). Testes pré-clínicos e algumas tentativas clínicas com o uso de NPM (Rau et al., 2000) têm mostrado que a hipertermia magnética, ou magnetohipertermia, pode representar uma terapia altamente eficiente na terapia contra o câncer.

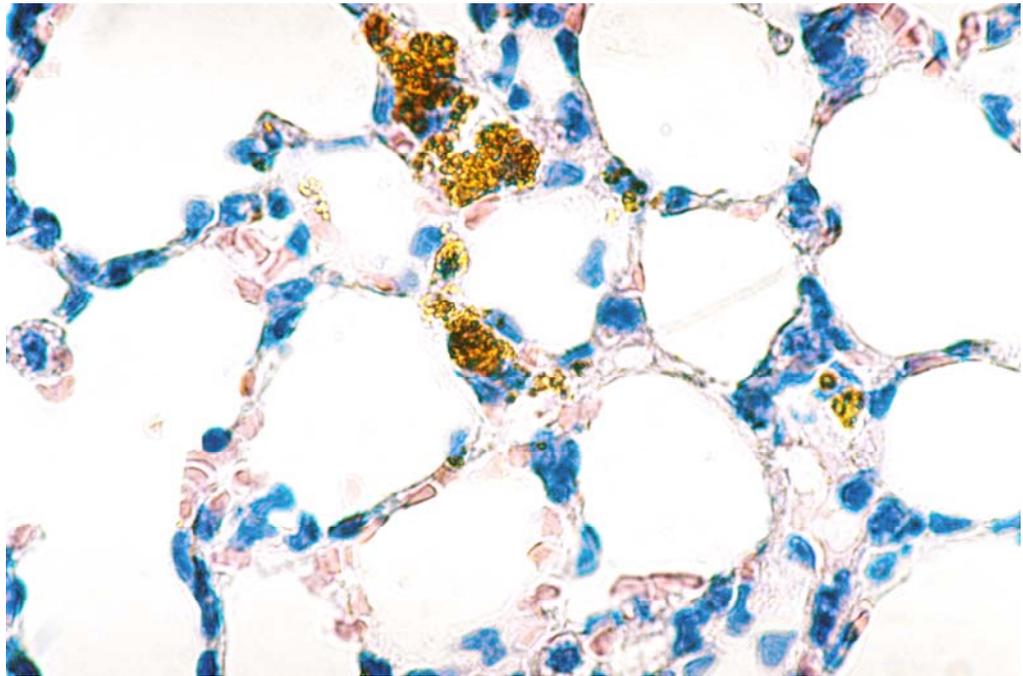
#### **1.4 Testes biológicos**

Para avaliar a biocompatibilidade e a biodistribuição de amostras variadas de fluidos magnéticos, vários testes biológicos têm sido realizados nos laboratórios de Genética e

Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – UnB. Como exemplo, podemos citar o FM, que contém nanopartículas magnéticas à base de ferrita de manganês recobertas com ácido cítrico ou tartarato (Lacava et al., 1999a,b); NPM à base de magnetita revestidas com (1) ácido dodecanóico e álcool etoxilado (Freitas et al., 2002), (2) ácido dimercaptosuccínico (DMSA) (Chaves et al., 2002), (3) dextrana (Lacava et al., 2002, 2004), (4) ácido cítrico (Garcia et al., 2002), (5) ácido poliaspártico (Sadeghiani et al., 2004), (6) ácido glucônico (Barbosa et al., 2004) ou NPM à base de ferrita de cobalto revestidas com citrato (Kückelhaus et al., 2003). Outros materiais magnéticos, como os magnetolipossomas (Garcia et al., 2002, Kückelhaus et al., 2003), também foram estudados pelo grupo.

Estas amostras têm sido investigadas por diferentes técnicas, como as de viabilidade celular, citometria, teste do micronúcleo, morfologia, ressonância magnética, absorção atômica, os quais mostram os diferentes níveis de biocompatibilidade/toxicidade e/ou biodistribuição diferenciada das amostras magnéticas. Os resultados obtidos evidenciaram que algumas destas amostras apresentaram alta toxicidade e mutagenicidade, dose e tempo dependentes (Lacava et al., 1999; Freitas et al., 2002; Chaves et al., 2002; Barbosa, 2004), enquanto outras amostras magnéticas apresentavam toxicidade leve e temporária (Garcia, 2002; Lacava, 2004; Sadeghiani, 2004), características desejáveis para aplicações biomédicas.

Pode-se concluir que cada amostra magnética apresenta peculiaridades nos parâmetros de biocompatibilidade e biodistribuição e, conseqüentemente, adequação para diferentes aplicações biomédicas. A síntese de novas amostras que viabilizam estas diferentes aplicações é uma das metas do nosso grupo de pesquisa. Por esta razão, no presente trabalho avaliamos uma nova amostra de fluido magnético, o qual foi desenvolvido a partir de NPM de maghemita recobertas com polifosfato.

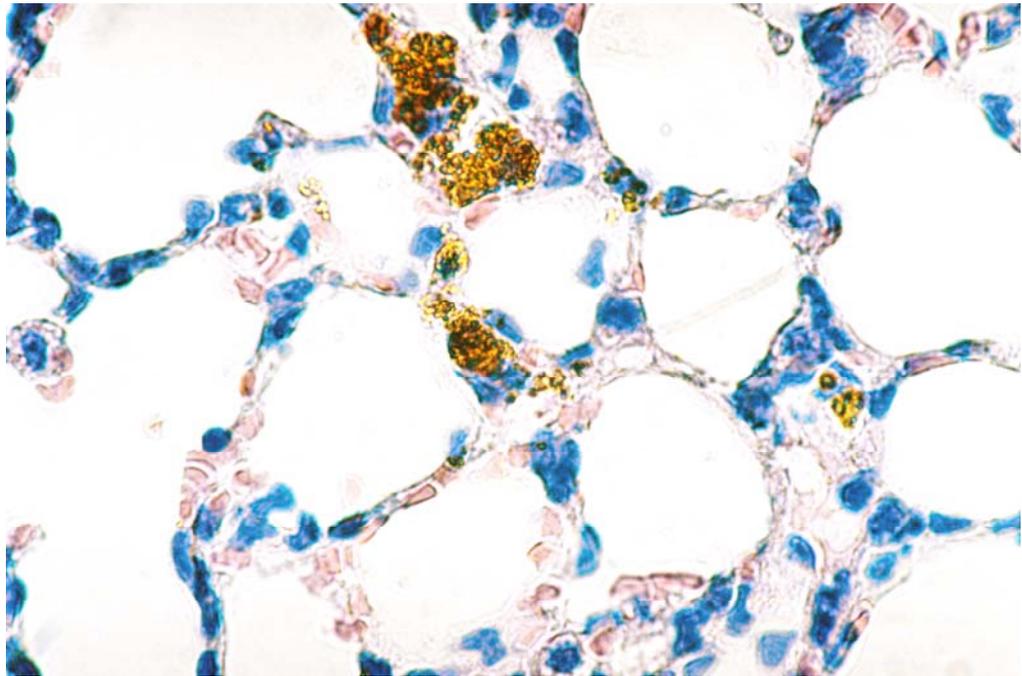


## **2. OBJETIVO**

Tendo o conhecimento de que (1) as nanopartículas magnéticas biocompatíveis têm potencial para inúmeras aplicações biomédicas importantes, como o tratamento do câncer por magnetohipertermia, integrar sistemas entregadores de fármacos para alvos específicos, agentes de contraste para ressonância magnética e (2) que novos materiais devem ser biologicamente testados antes de serem utilizados nestas aplicações, o presente trabalho tem como objetivo principal investigar os efeitos biológicos de uma nova amostra de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas com pilifosfato (FMF) em duas concentrações diferentes (FMF-1 e FMF-2), visando futuras aplicações biomédicas.

Para atingir este objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Avaliar a biocompatibilidade/toxicidade da amostra FMF por meio do teste de viabilidade das células peritoneais;
- Avaliar o potencial pró-inflamatório da amostra FMF por meio da análise citométrica do sangue periférico;
- Avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade da amostra FMF em células da medula óssea por meio do teste de micronúcleo e % EPC, respectivamente;
- Avaliar a biocompatibilidade/toxicidade da amostra FMF por meio de análise morfológica do pulmão, fígado e baço.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

### **3.1 Amostra**

A amostra de fluido magnético utilizada para a realização deste trabalho foi sintetizada e gentilmente cedida pela Dra. Emília Lima da Universidade Federal de Goiás. Este fluido foi desenvolvido à base de nanopartículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , diâmetro modal de 9,8 nm) recobertas por polifosfato (FMF). A concentração original da amostra de FMF utilizada neste estudo foi de  $1,4 \times 10^{16}$  partículas/cm<sup>3</sup> e a concentração de ferro de 0,36 mol/L.

#### **3.1.1 Caracterização das partículas de maghemita do FMF por Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Amostra FMF diluída 1000 vezes em soro fisiológico foi colocada sobre telas de microscopia eletrônica recobertas com Formvar. Após secarem por duas horas, as telas apropriadas foram analisadas e fotomicrografadas em um microscópio eletrônico JEOL 100CXII. Os diâmetros das partículas magnéticas (n=500) foram obtidos por análise em computador, utilizando-se o programa ImagePro 4.0. A distribuição das partículas foi conseguida utilizando-se o melhor ajuste lognormal.

### **3.2 Animais**

Neste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss, não isogênicos, fornecidos pelo biotério da FFCLRP, USP, Ribeirão Preto, SP. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Genética – ciclo claro/escuro de 12/12 horas – recebendo ração balanceada e água potável. Foram utilizados cinco animais para o grupo controle. Neste grupo, os animais receberam, via endovenosa,

50µL de soro fisiológico, utilizado como veículo para a diluição das amostras magnéticas administradas em animais. No momento da coleta, os animais eram mortos por deslocamento cervical.

Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo comitê de ética no uso animal. CEUA/63 – IB – UnB.

### **3.3 Tratamento dos animais FMF**

Para a avaliação da toxicidade em células peritoneais, os animais (n=5) foram tratados por injeção intraperitoneal com dose de 50 µL e 100 µL de FMF, contendo  $0,7 \times 10^{15}$  (FMF-1) e  $1,4 \times 10^{15}$  (FMF-2) partículas, respectivamente. Para os demais testes, os animais foram tratados, via endovenosa, com dose de 50 µL e 100 µL de FMF, contendo  $0,7 \times 10^{15}$  (FMF-1) e  $1,4 \times 10^{15}$  (FMF-2) partículas, respectivamente. As coletas de células/tecidos necessárias para os vários testes realizados foram feitas nos tempos de 30 minutos, 6h, 12h, 24h, 48h e sete dias após a administração do FMF. Nos animais tratados com FMF-2, o fluido foi aplicado lentamente, pois nesta concentração, a injeção rápida levava a morte imediata dos animais.

#### **3.3.1 Avaliação de toxicidade em células peritoneais**

Para realizar este teste, o peritônio de cada animal com FMF-1 e FMF-2 foi lavado, com auxílio de uma seringa descartável, com 10 mL de solução gelada de cloreto de sódio tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2. Após massagem da cavidade peritoneal, aproximadamente 8 mL do lavado peritoneal foi coletado em tubos Falcom. Estes tubos foram

mantidos em caixa de isopor contendo gelo para a manutenção da temperatura e centrifugadas por cinco minutos a 1000 RPM. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em um mL de PBS gelado. A solução foi homogeneizada e 40  $\mu$ L do lavado foi transferida para tubos Ependorff contendo 160  $\mu$ L de nigrosina a 0,05%, corante supravital do tipo aniônico que não penetra em células vivas (Douard; Hermier; Blesbois, 2000). A contagem procedeu-se em câmara de Neubauer, onde o valor bruto de células vivas encontradas foi dividido por quatro (referente ao número de retículos contados), multiplicado por cinco (referente à diluição utilizada) e, após, multiplicado por 10.000 (referente à profundidade da câmara).

### **3.3.2 Avaliação da contagem global de leucócitos**

Para a contagem global de leucócitos, foram pipetados 20 $\mu$ L de sangue em tubos Ependorff com 400 $\mu$ L de líquido diluidor onde o material foi homogeneizado por 20 minutos. O líquido diluidor era composto de 2,0mL de ácido acético glacial, 1,0mL de azul de metileno e água destilada q.s.p até o volume de 100,0mL. Após a homogeneização, 10 $\mu$ L da solução foi transferida para dentro dos retículos da câmara de Neubauer, onde se procedeu a contagem em quatro retículos laterais da câmara em microscópio de luz. A soma dos quatro retículos foi multiplicada pelo fator de cálculo (52,5) para expressar o total de células por microlitro.

### **3.3.3 Avaliação da contagem diferencial de leucócitos**

Para a realização da análise citométrica, esfregaços sanguíneos foram obtidos a partir da coleta por punção cardíaca nos tempos de 30 minutos, seis, 12, 24 e 48 horas e sete dias

após a administração do FMF. Depois da secagem, as lâminas foram fixadas em metanol por cinco minutos e coradas com Wright/Giemsa. A análise foi feita em microscopia de luz (100×) possibilitando, assim, a distinção do tipo celular sanguíneo (monócitos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos) e suas possíveis alterações. Foram contadas 500 células por animal.

### **3.3.4 Avaliação de genotoxicidade**

A genotoxicidade das amostras magnéticas foi avaliada por meio de contagem dos micronúcleos (MN). Os micronúcleos são estruturas presentes no citoplasma de células em divisão que possuem características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal quando avaliados ao microscópio de luz. Podem ser gerados espontaneamente ou em função de algum agente tóxico presente no organismo.

Para controle positivo da técnica de micronúcleo, cinco animais foram tratados com ciclofosfamida (40mg/Kg), agente sabidamente clastogênico, 24h antes da coleta. Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, as células da medula óssea foram retiradas dos fêmures dos animais tratados e controle, onde as epífises foram seccionadas, com 1mL de soro fetal bovino. O material foi homogeneizado com auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugado por cinco minutos a 1000 rpm; descartou-se o sobrenadante e com o sedimento, após homogeneização, foi feito um esfregaço em duas lâminas previamente lavadas e secas. Após a secagem das lâminas, procedeu-se a fixação com metanol, por cinco minutos, e a coloração com solução de tampão fosfato e Giemsa.

A contagem das células foi realizada em microscópio de luz com objetiva de imersão (100×), perfazendo um total de 4000 células, sendo 2000 policromáticas (EPC) e 2000

normocromáticas (ENC) por animal, tendo sido registrado o número de MN encontrados. Para cálculo do percentual de EPC (EPC%) foi também registrado o número de células em menor quantidade quando qualquer um dos tipos celulares (EPC ou ENC) atingiu a contagem de 2000 células. O percentual de células policromáticas (EPC %) foi calculado pela fórmula:

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

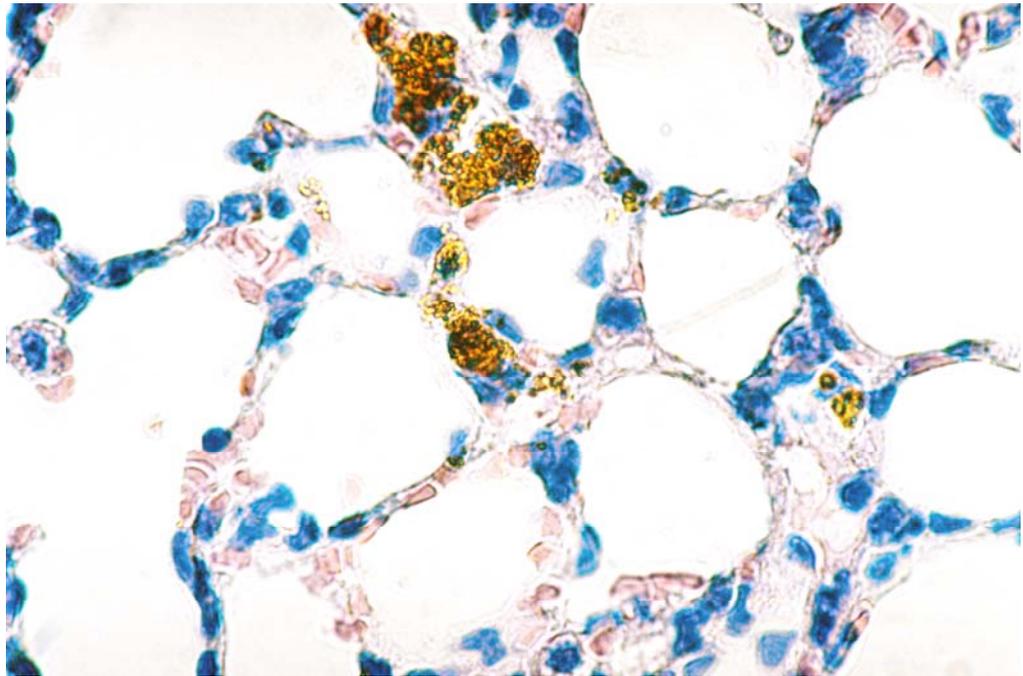
### **3.3.5 Avaliação histológica**

Trinta minutos, seis, 12, 24, 48 horas e sete dias após a injeção do FMF, os animais (N=3) foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos baço, pulmão e fígado retirados, fixados com paraformaldeído a 4% durante quatro horas, desidratados por meio de imersão seqüencial em soluções alcoólicas com percentual decrescente de água e embebidos em parafina. A seguir, os órgãos foram seccionados com 5µm de espessura e corados com vermelho rápido nuclear associados ao método de Perls ou hematoxilina-eosina (HE). As fotografias dos órgãos analisados foram tiradas em microscópio de luz, modelo Zeiss, com câmara acoplada modelo MC 80 DX.

### **3.4 Testes estatísticos**

Para determinar se os resultados obtidos nos experimentos apresentam diferenças estatisticamente significativas, foi utilizado o teste ANOVA – fator único, por meio de combinação entre dois fatores – para a contagem global e diferencial de leucócitos (Fisher) e para o teste de viabilidade das células peritoneais (Scheffe). Para a análise de micronúcleos

foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney que se aplica às amostras pequenas (n) e independentes. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ( $p < 0,05$ ).



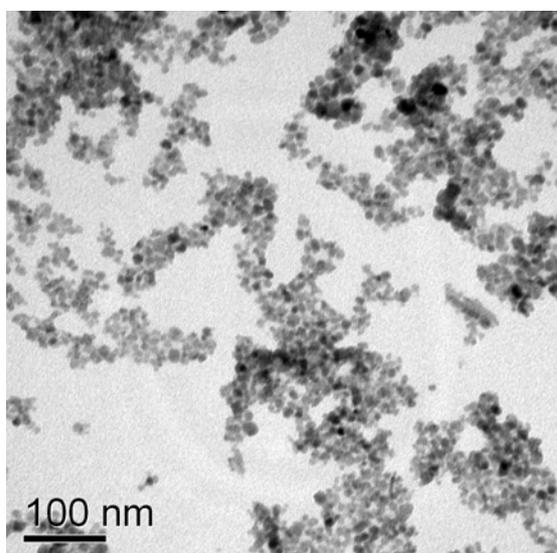
#### **4. RESULTADOS**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar efeitos biológicos de nanopartículas magnéticas de maghemita recobertas com polifosfato em duas concentrações: FMF-1 e FMF-2. Foram realizados testes de viabilidade peritoneal; contagem global de leucócitos e citometria do sangue periférico; contagem de micronúcleos nas células da medula óssea e foram analisados cortes histológicos de baço, pulmão e fígado. Os resultados obtidos estão ilustrados nas **Figuras 3 a 21**; resumidos nas tabelas 1 a 3 e detalhados nos anexos 1 a 6.

#### **4.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas**

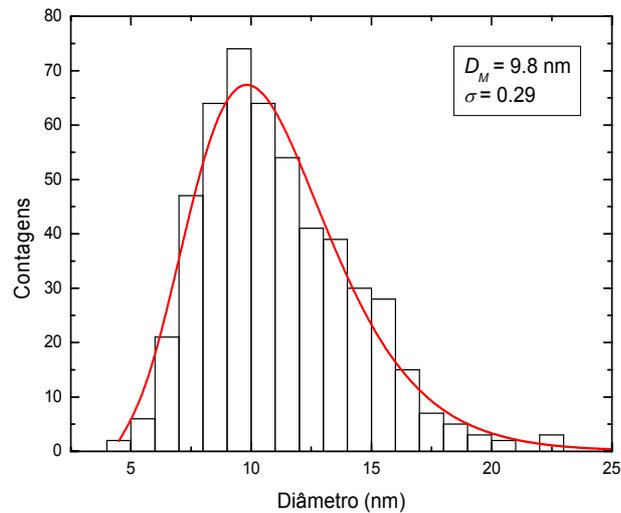
##### **4.1.1 Determinação do diâmetro das amostras do FMF**

A microscopia de transmissão (MET) foi utilizada para determinar o diâmetro das partículas de maghemita presentes na amostra de FMF, como ilustra a **Figura 1**.



**Figura 1** - Fotomicrografia eletrônica mostrando nanopartículas magnéticas da amostra FMF.

A distribuição lognormal dos diâmetros mostrou que as nanopartículas da amostra possuem diâmetro modal de aproximadamente 9,8 nm e desvio padrão de 0,29 (**Figura 2**).



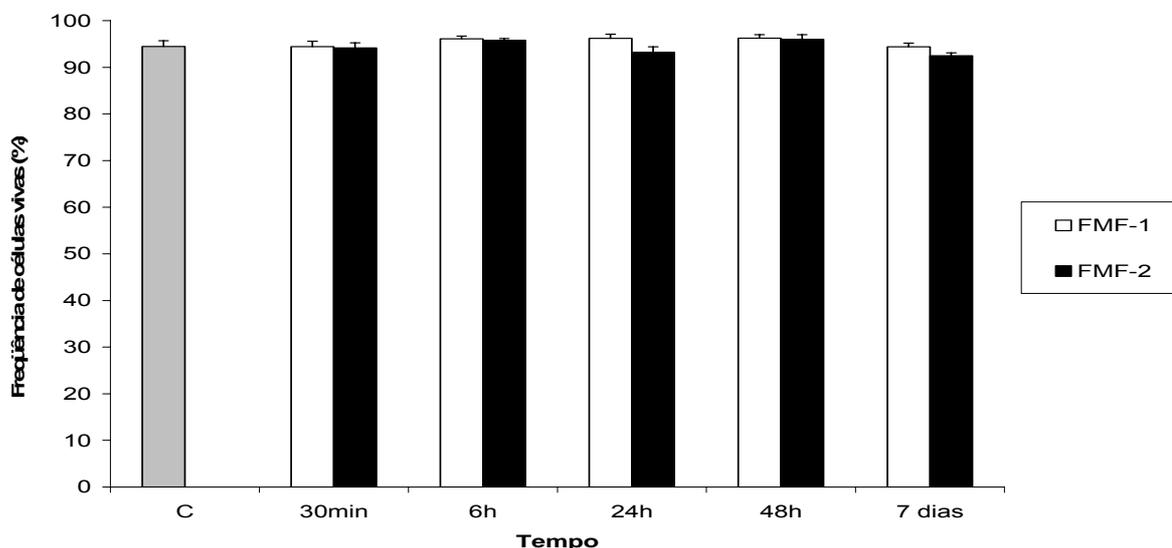
**Figura 2** – Histograma dos diâmetros das NPM obtidos por MET da amostra FMF. A linha contínua representa o melhor ajuste dos dados (Morais et al., 2002).

#### 4.2 Teste de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular é um dos métodos utilizados para avaliar a toxicidade das amostras magnéticas em peritônio, permitindo quantificar e distinguir células vivas e mortas por meio do uso da nigrosina. Com a nigrosina, as células vivas coram-se de cor amarelo brilhante e as mortas coram-se de marrom. O período de tempo utilizado para esta avaliação abrangeu de 30 minutos a sete dias após a injeção intraperitoneal do fluido magnético FMF, em ambas as concentrações (FMF-1 e FMF-2).

#### 4.2.1 Avaliação da viabilidade celular do FMF-1 e FMF-2

Os resultados revelaram que o tratamento com FMF-1 induziu um leve aumento na frequência de células vivas nos tempos de seis a 48 horas. Este aumento, entretanto, não é estatisticamente significativo (**Figura 3**). Já com a amostra FMF-2, houve um leve aumento na população de células vivas nos tempos de seis e 48 horas e uma ligeira diminuição nos tempos de 24 e sete dias. Contudo, estas alterações também não representaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, como mostra a **Figura 3**.



**Figura 3:** Efeito da administração intraperitoneal da amostra FMF-1 ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas) ou FMF-2 ( $1,4 \times 10^{15}$  partículas) sobre a viabilidade das células peritoneais. A barra indica o erro padrão. (C - controle).

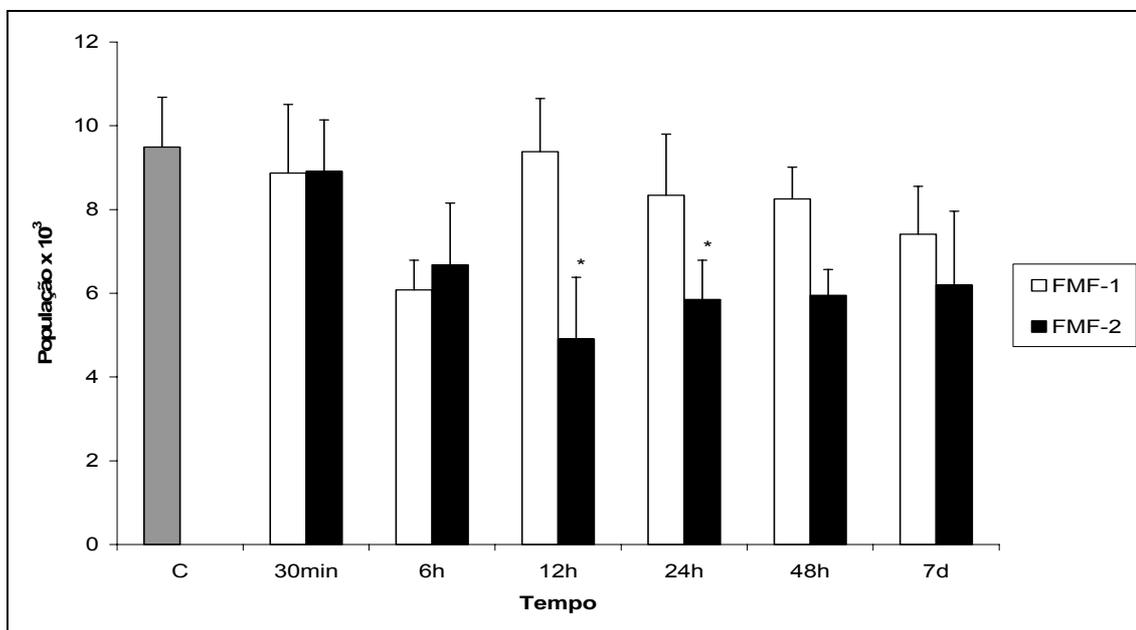
#### 4.3 Análise citométrica

A citometria é uma das análises utilizadas para avaliação dos efeitos citotóxicos dos fluidos magnéticos em sangue periférico. Os glóbulos brancos do sangue (linfócitos,

monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) foram quantificados na análise em microscopia de luz, sendo contadas 500 células em cada lâmina obtidas dos animais investigados.

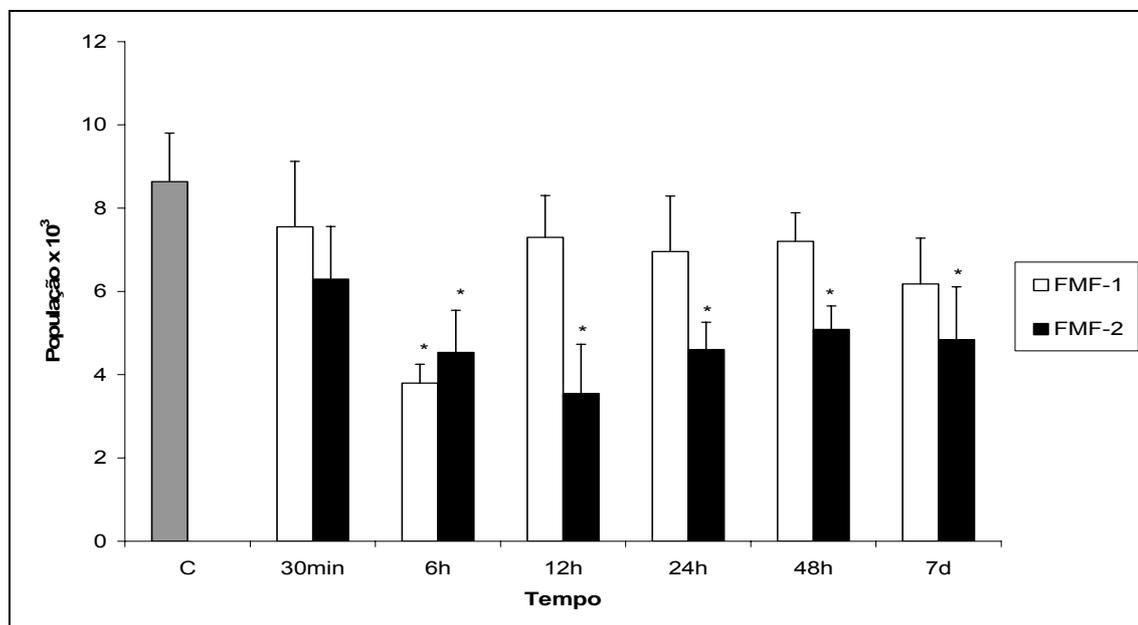
#### 4.3.1 Avaliação citométrica em animais tratados com FMF-1

O efeito pró-inflamatório da administração do FMF-1 foi verificado por meio da contagem das células do sangue periférico. A contagem global de leucócitos mostrou algumas variações ao longo do tempo. Em seis horas, por exemplo, houve um decréscimo nesta população. Contudo, não houve diferenças estatisticamente significativa em nenhum tempo analisado, quando comparado aos dados do grupo controle (**Figura 4**). A população de linfócitos, entretanto, sofreu um decréscimo estatisticamente significativo em seis horas, que foi normalizado nos tempos seguintes (**Figura 5**).



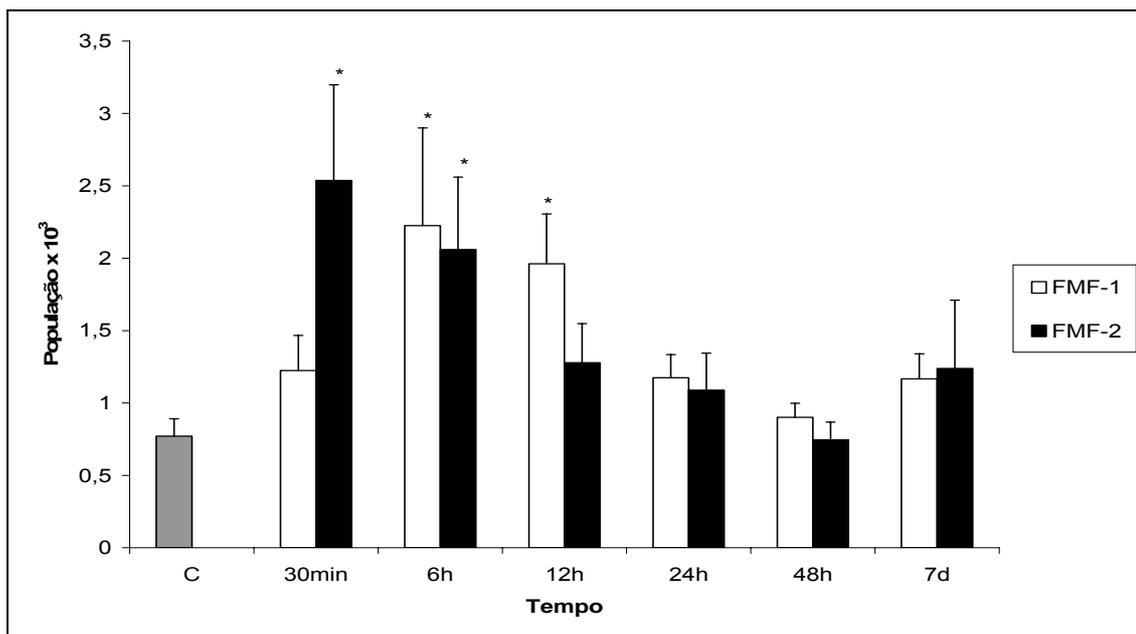
**Figura 4:** Contagem global de leucócitos de animais tratados com FMF-1 ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas) ou FMF-2 ( $1,4 \times 10^{15}$  partículas), em função do tempo de tratamento. \* aponta

diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). A barra indica o erro padrão. (C - controle).

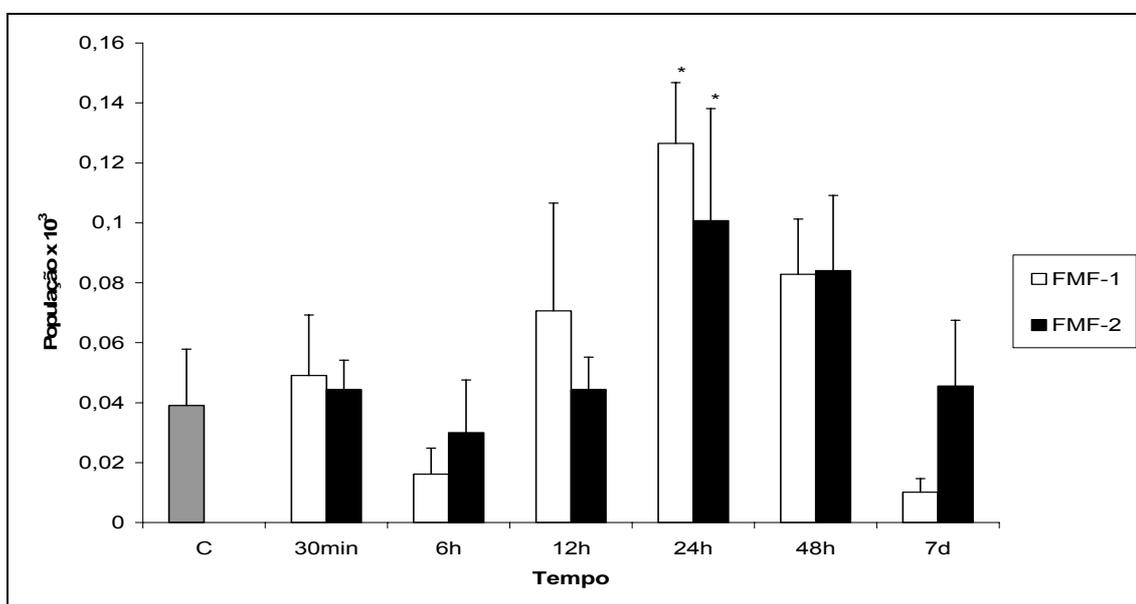


**Figura 5:** Contagem de linfócitos de animais tratados com FMF-1 ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas) ou FMF-2 ( $1,4 \times 10^{15}$  partículas), em função do tempo de tratamento. \* aponta diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). A barra indica o erro padrão. (C - controle).

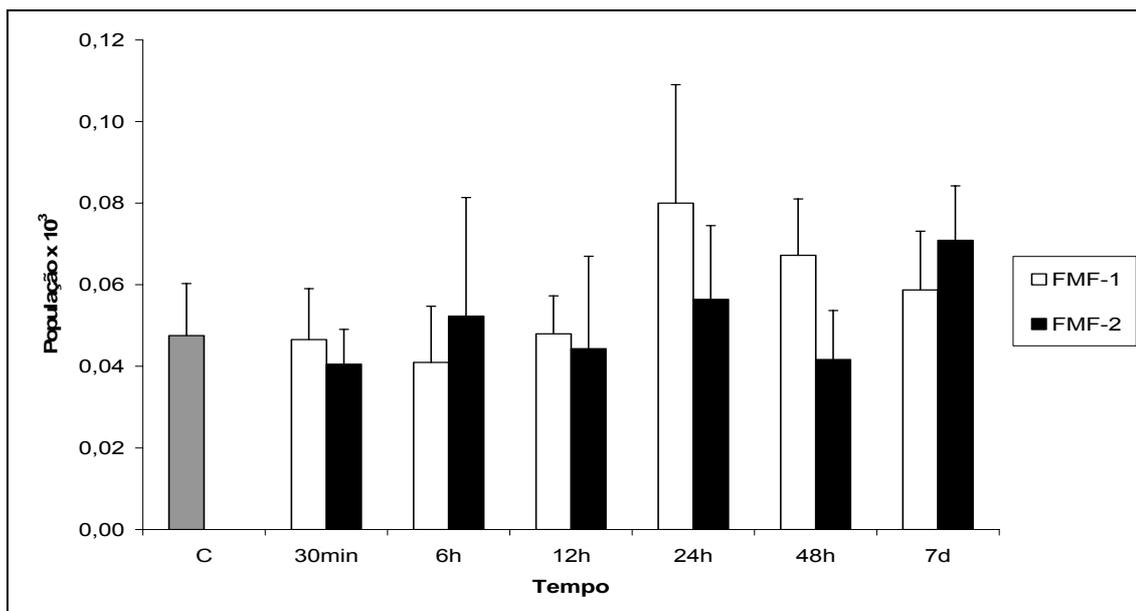
O efeito do FMF-1 também foi percebido na população de neutrófilos nos tempos de seis e 12 horas. Durante este período, os resultados mostraram um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (**Figura 6**). Já em relação à população de eosinófilos, observou-se muitas variações que culminam com um aumento estatisticamente significativo mais tardiamente, em 24 horas, normalizando no tempo seguinte (48 horas) e decrescendo em sete dias, quando comparado ao controle, porém, neste tempo, sem significância estatística (**Figura 7**). A população de monócitos foi a única que não sofreu alterações estatisticamente significativas, apesar das variações observadas ao longo dos tempos analisados (**Figura 8**). Não foram encontrados basófilos em nenhuma das lâminas analisadas.



**Figura 6:** Contagem de neutrófilos de animais tratados com FMF-1 ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas) ou FMF-2 ( $1,4 \times 10^{15}$  partículas), em função do tempo de tratamento. \* aponta diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). A barra indica o erro padrão. (C - controle).



**Figura 7:** Contagem de eosinófilos de animais tratados com FMF-1 ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas) ou FMF-2 ( $1,4 \times 10^{15}$  partículas), em função do tempo de tratamento. \* aponta diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). A barra indica o erro padrão. (C - controle).



**Figura 8:** Contagem de monócitos de animais tratados com FMF-1 ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas) ou FMF-2 ( $1,4 \times 10^{15}$  partículas), em função do tempo de tratamento. \* aponta diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). A barra indica o erro padrão. (C - controle).

#### 4.3.2 Avaliação citométrica em animais tratados com FMF-2

Os resultados do número total de leucócitos dos animais tratados com FMF-2 mostraram que, diferentemente da amostra FMF-1 (que tem cerca de metade de NP), ocorreram decréscimos que foram estatisticamente significativos apenas nos tempos de 12 e 24 horas após a aplicação da amostra (**Figura 4**). Estes dados são concomitantes com o decréscimo da população de linfócitos que abrangeu o período de seis horas a sete dias (**Figura 5**). A população de neutrófilos mostrou uma resposta rápida, aumentando significativamente em 30 minutos, permanecendo até seis horas após a administração do FMF-2. Nos tempos seguintes houve variações, porém não significativas (**Figura 6**). A população de eosinófilos, semelhante ao que aconteceu com FMF-1, aumentou estatisticamente 24 horas após o tratamento com FMF-2. O aumento permaneceu no tempo de 48 horas, e decresceu em

sete dias. Estas variações, entretanto, não mostraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (**Figura 7**). A população de monócitos, assim como foi observado com FMF-1, apresentou variações, mas não houve diferenças estatisticamente significantes ao longo dos tempos analisados (**Figura 8**).

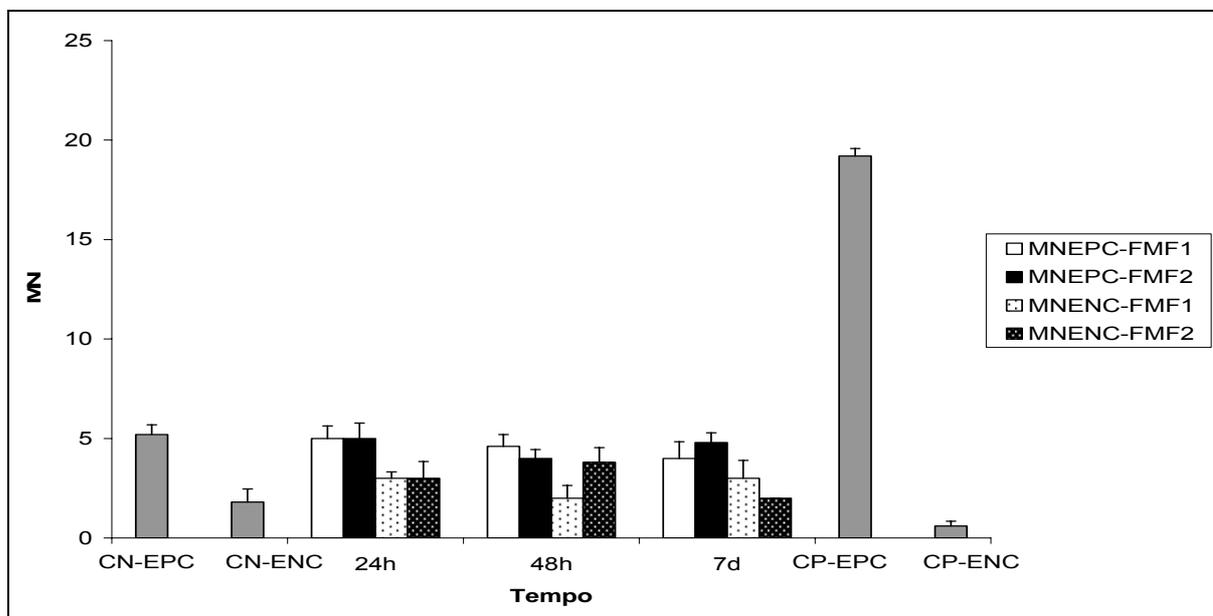
#### **4.4 Teste de micronúcleo**

O teste de micronúcleo em eritrócitos da medula óssea tem sido utilizado para avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos materiais magnéticos (Sadeghiani, 2004; Barbosa, 2004). Neste experimento, a avaliação foi realizada 24, 48 horas e sete dias após a administração endovenosa do FMF-1 ou FMF-2 e as análises foram realizadas por meio da contagem de 2000 eritrócitos normocromáticos e 2000 eritrócitos policromáticos.

##### **4.4.1 Avaliação de genotoxicidade do FMF-1 e FMF-2**

Os dados mostraram que, com a amostra FMF-1, ocorreu uma leve diminuição na quantidade de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos (EPC), 48 horas e sete dias após o tratamento, como mostra a **Figura 9**. Porém, em relação aos eritrócitos normocromáticos (ENC) o aumento ocorreu nos tempos de 24 horas e sete dias. Conforme demonstrado na **Figura 9**, foi observado na amostra FMF-2, uma diminuição na quantidade de micronúcleos nos EPC 48 horas após o tratamento, mostrando uma tendência a normalizar em sete dias. Nos ENC, o aumento ocorreu 24 e 48 horas após a administração do FMF-2. Todas estas pequenas alterações, entretanto, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais controle.

Nos controles positivos, a administração da ciclofosfamida (40mg/Kg) induziu a formação, em média, de 19 micronúcleos nos EPC. Nos ENC, entretanto, a ciclofosfamida praticamente não induziu a formação de micronúcleo (**Figura 9**).

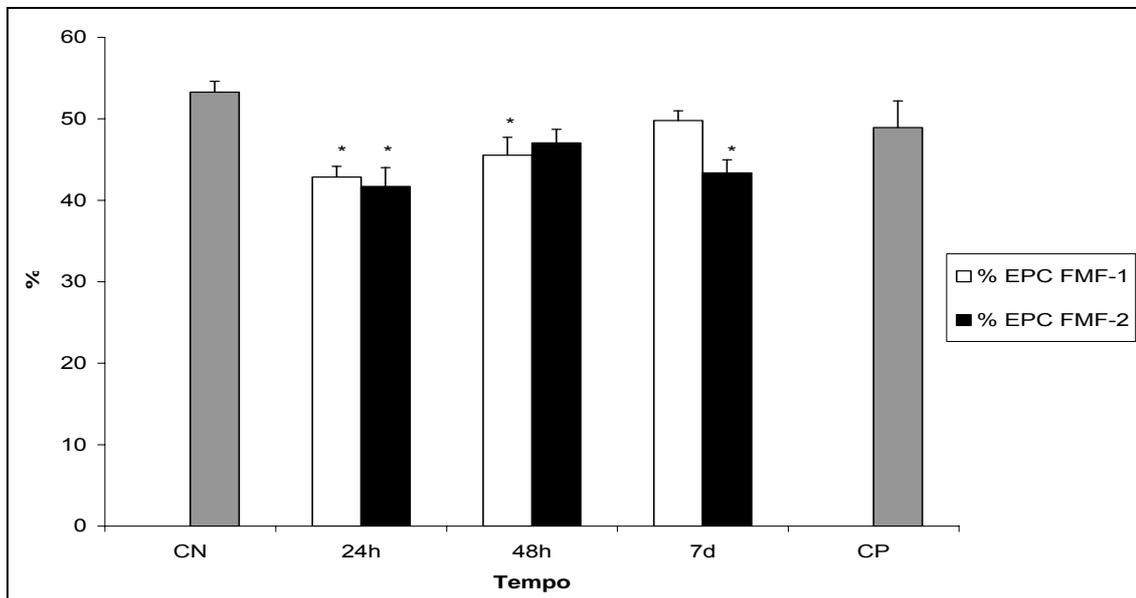


**Figura 9:** Efeito do tratamento da amostra FMF-1 ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas) ou FMF-2 ( $1,4 \times 10^{15}$  partículas), na quantidade de MN avaliados em 2000 células (ENC e EPC). A barra indica o erro padrão. (CN-EPC - controle negativo dos eritrócitos policromáticos; CN-ENC - controle negativo dos eritrócitos normocromáticos; CP-EPC - controle positivo dos eritrócitos policromáticos; CP-ENC - controle positivo dos eritrócitos normocromáticos).

#### 4.4.2 Avaliação de citotoxicidade de FMF-1 e FMF-2

O teste de MN mostrou citotoxicidade na porcentagem de EPC em ambos os tratamentos (**Figura 10**). Os animais que foram tratados com FMF-1 apresentaram decréscimo significativo na % EPC em 24 e 48 horas, normalizando no tempo seguinte. Já

nos animais tratados com FMF-2, o decréscimo ocorreu 24 horas e sete dias após o tratamento.



**Figura 10:** Efeito do tratamento da amostra FMF-1 ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas) ou FMF-2 ( $1,4 \times 10^{15}$  partículas), na % de EPC. A barra indica o erro padrão. (CN = controle negativo; CP = controle positivo).

#### 4.5 Histologia

Objetivando avaliar os efeitos morfológicos das amostras magnéticas, foram analisados cortes do pulmão, fígado e baço de animais controle e tratados com FMF-1 e FMF-2, nos tempos de 30 minutos a sete dias. Os tecidos foram submetidos à coloração de hematoxilina e eosina. A hematoxilina é basófila, ou seja, tem afinidade por substâncias básicas como, por exemplo, o núcleo. Já a eosina é acidófila e tem afinidade por substâncias ácidas, como o citoplasma. Para visualizar o ferro (endógeno ou proveniente das nanopartículas magnéticas), os cortes foram submetidos ao método de Perls associados à

coloração pelo vermelho rápido nuclear, procedimento em que os núcleos celulares apresentam coloração vermelha forte, o citoplasma, cor rosa clara, enquanto os agregados de ferro podem adquirir coloração marrom dourada ou azul brilhante.

Os cortes de pulmão dos animais do grupo controle apresentaram alvéolos de contornos regulares, capilares exibindo calibre normal contendo hemácias, vasos sanguíneos e bronquíolos de aspecto e tamanho normais. Nos cortes analisados não foram visualizados agregados de coloração azul ou marrom, qualquer que tenha sido o corante utilizado (**Figuras 11a, 11b e 11c**).

Os cortes de fígado dos animais do grupo controle apresentaram o parênquima bem preservado com a cápsula de tecido conjuntivo íntegra e lóbulos de estrutura normal. Entretanto, alguns lóbulos hepáticos apresentaram, próximo à veia centro-lobular, pequenos infiltrados inflamatórios (**Figura 16a**) de mononucleares. Nos cortes também não foram observados agregados de coloração azul ou marrom nas colorações HE ou Perls (**Figura 16b e 16c**).

O baço dos animais controle não apresentou alterações histológicas (**Figura 19a e 19b**). Nas observações, a polpa branca, constituída por tecido linfóide, foi claramente diferenciada da polpa vermelha, rica em vasos sanguíneos. Diferentemente dos cortes do pulmão e do fígado, na polpa vermelha do baço de animais controle foi observada uma quantidade variável de pequenos aglomerados de coloração azul brilhante (**Figura 19c**).

Para avaliar aspectos da biodistribuição das NP do FMF nos três órgãos investigados, a quantidade de aglomerados de nanopartículas encontrados nos cortes analisados foi marcada com sinais (+), (++) e (+++), respectivamente para quantidade pequena, média e grande de

aglomerados de NP. No baço dos animais controle, essa quantidade era equivalente ao sinal (+).

As tabelas 2 e 3 mostram, resumidamente, os resultados desta quantificação bem como os resultados das análises histológicas para os grupos controle e tratados com FMF-1 e FMF-2.

#### 4.5.1 Efeito histológico em animais tratados com FMF-1

##### 4.5.1.1 Pulmão

Alterações histológicas foram observadas no pulmão de alguns animais tratados com FMF-1, com exceção dos tempos trinta minutos e seis horas. Foi possível observar no tempo de trinta minutos dispersão de pequenos aglomerados de nanopartículas magnéticas (++) dentro dos capilares dos septos alveolares, como ilustrados nas **Figuras 12a e 13a**. Já em seis horas os aglomerados de NP estavam maiores, em menor número e, portanto, não homogeneamente distribuídos pelo corte, como observado no tempo de 30 minutos (**Figura 12b e 13b**). De qualquer forma, a quantidade de NP encontrada foi semelhante ao tempo anterior (++) . Os resultados da análise feita 12 horas após a aplicação de FMF-1 foram semelhantes aos do tempo de 30 minutos, ou seja, o tecido tem aspecto normal, apresentando, em um animal, espessamento na parede dos septos alveolares em poucas áreas (**Figura 12c**). Diferem, entretanto, não só a quantidade, como também o tamanho (maior) dos aglomerados de nanopartículas visualizados nos capilares (+++) (**Figura 13c**). Espessamento mais intenso nas paredes alveolares foi observado nos cortes dos três animais 24 horas após a aplicação do fluido FMF-1, conforme ilustrado na **Figura 12d**. Os aglomerados de nanopartículas observados dentro das paredes espessas dos capilares estavam em quantidades menores que

no tempo anterior (++) (**Figura 13d**). No tempo seguinte, 48 horas, o espessamento ainda continuou a ser observado em dois animais, porém consideravelmente reduzido em relação ao que foi notado em 24 horas (**Figura 12e**). As nanopartículas se encontravam mais aglomeradas e em quantidade semelhante ao visto no tempo de 12 horas (+++) (**Figura 13e**). Sete dias após a administração do fluido, os cortes pulmonares apresentaram, em dois animais, uma grande redução no espessamento dos septos alveolares na maioria das áreas analisadas (**Figura 12f**). Os aglomerados de NP eram menores, mais dispersos e em quantidade menor ao observado em 48 horas (++) (**Figura 13f**).

#### **4.5.1.2 Fígado**

No fígado, a amostra FMF-1 não causou alterações histológicas, exceto pela presença de um leve infiltrado inflamatório nos tempos de 30 minutos e seis horas (um animal/tempo), (**Figuras 17a e 17b**), semelhante ao que foi observado no fígado de animais controle. Durante este período, pequenos aglomerados de nanopartículas (++) foram observados nos capilares de todo o parênquima (**Figura 17c**). Nos demais tempos (12 horas a sete dias), não foi observada nenhuma alteração morfológica ao microscópio de luz nos cortes analisados, embora os aglomerados de NP fossem maiores e em maior quantidade (+++) (**Figura 17d**).

#### **4.5.1.3 Baço**

Nenhuma alteração histológica foi observada no baço dos animais tratados com FMF-1. Os aglomerados de NP foram evidenciados em ambas as colorações. Estes, até o tempo de 48 horas, foram visualizados mais abundantemente na polpa vermelha (**Figuras 20a e 20b**). Porém, em sete dias, os aglomerados eram observados tanto na polpa vermelha quanto entre as células da polpa branca. (**Figuras 20c e 20d**). Durante todos os tempos analisados (30

minutos a sete dias), as NP encontravam-se dispersas em pequenos aglomerados em uma quantidade semelhante à quantidade encontrada no baço do grupo controle (+).

## **4.5.2 Efeito histológico em animais tratados com FMF-2**

### **4.5.2.1 Pulmão**

Alterações histológicas no pulmão também foram evidenciadas com a amostra FMF-2. Observou-se 30 minutos após a administração do fluido, nos cortes histológicos analisados, processo inflamatório ao redor de veia (não ilustrado) e espessamento dos septos alveolares em algumas regiões de um animal (**Figuras 14a e 15a**). As nanopartículas se encontraram mais aglomeradas dentro dos capilares e em quantidade (++) . Seis horas após o tratamento, o espessamento em algumas áreas permaneceu e os aglomerados de nanopartículas magnéticas foram evidenciados em vênulas (**Figura 14b**), bem como dispersos nos capilares dos septos alveolares (**Figura 15b**). Maior quantidade de NP foi observada neste tempo (+++). No período que abrange 12 a 24 horas, as observações foram semelhantes às encontradas com a amostra FMF-1. Dois animais, um em cada tempo, apresentaram espessamento na parede dos septos alveolares (**Figura 14c**), sendo que em 24 horas o espessamento foi mais intenso em algumas áreas (**Figura 14d**). As nanopartículas se encontraram em pequenos aglomerados dentro dos capilares e dispersos por todo o corte analisado (+++) (**Figuras 15c e 15d**). Os resultados encontrados em 48 horas e sete dias após o tratamento, foram muito semelhantes aos encontrados com FMF-1, ou seja, houve uma nítida redução no espessamento das paredes dos septos alveolares, como mostra a **Figura 14e**. As **Figuras 15e e 15f** ilustram as regiões que permaneceram espessas nos cortes analisadas. A quantidade de NP encontradas nos

capilares dos septos alveolares diminuiu (++) em relação aos tempos anteriores de 12 e 24 horas.

#### **4.5.2.2 Fígado**

No fígado dos animais tratados com FMF-2, assim como foi observado nos animais tratados com FMF-1, não houve alterações histológicas, exceto pela presença de um leve infiltrado inflamatório nos tempos 30 minutos, 48 horas e sete dias, em um animal por cada tempo analisado (**Figuras 18a, 18b e 18c**, respectivamente). Nos cortes foram observados pequenos aglomerados de nanopartículas (++) nos tempos de 30 minutos e seis horas (**Figura 18d**). Nos tempos seguintes (12, 24, 48 horas e sete dias), os aglomerados observados eram maiores (+++) e se encontravam dispersos por todo o parênquima, como mostra a **Figura 18e**.

#### **4.5.2.3 Baço**

No baço dos animais tratados com FMF-2, assim como foi verificado no baço dos animais tratados com FMF-1, não foram observadas alterações histológicas. Aglomerados de NP foram visualizados essencialmente na polpa vermelha até o tempo de 24 horas (**Figura 21a e 21b**). Após este tempo, os aglomerados também foram vistos na polpa branca (**Figura 21c e 21d**). Entretanto, o que difere a amostra FMF-1 da FMF-2, em todos os tempos investigados, é a quantidade maior de aglomerados de nanopartículas encontradas na amostra FMF-2 (++)).

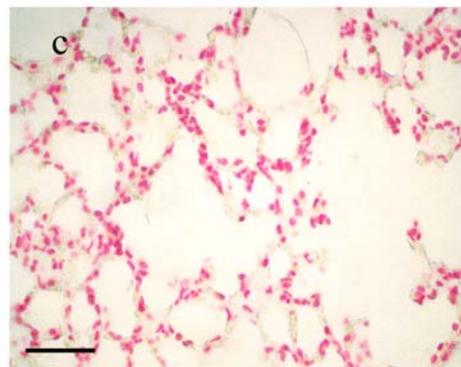
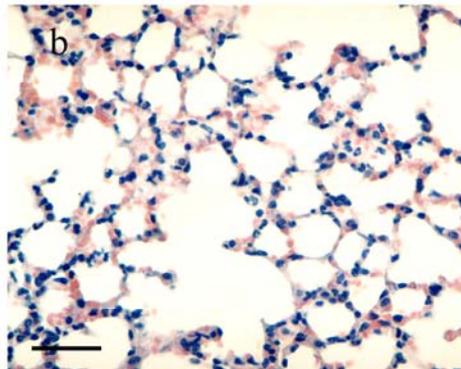
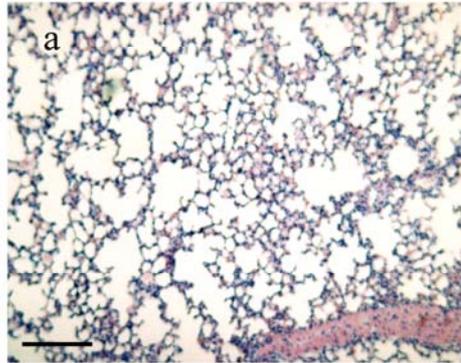


Figura 11: Fotomicrografia de pulmão de animais controle. a) (H&E, 10×); b) (H&E, 40×); c) (Perls, 40×). O tamanho da barra corresponde a 20µm.

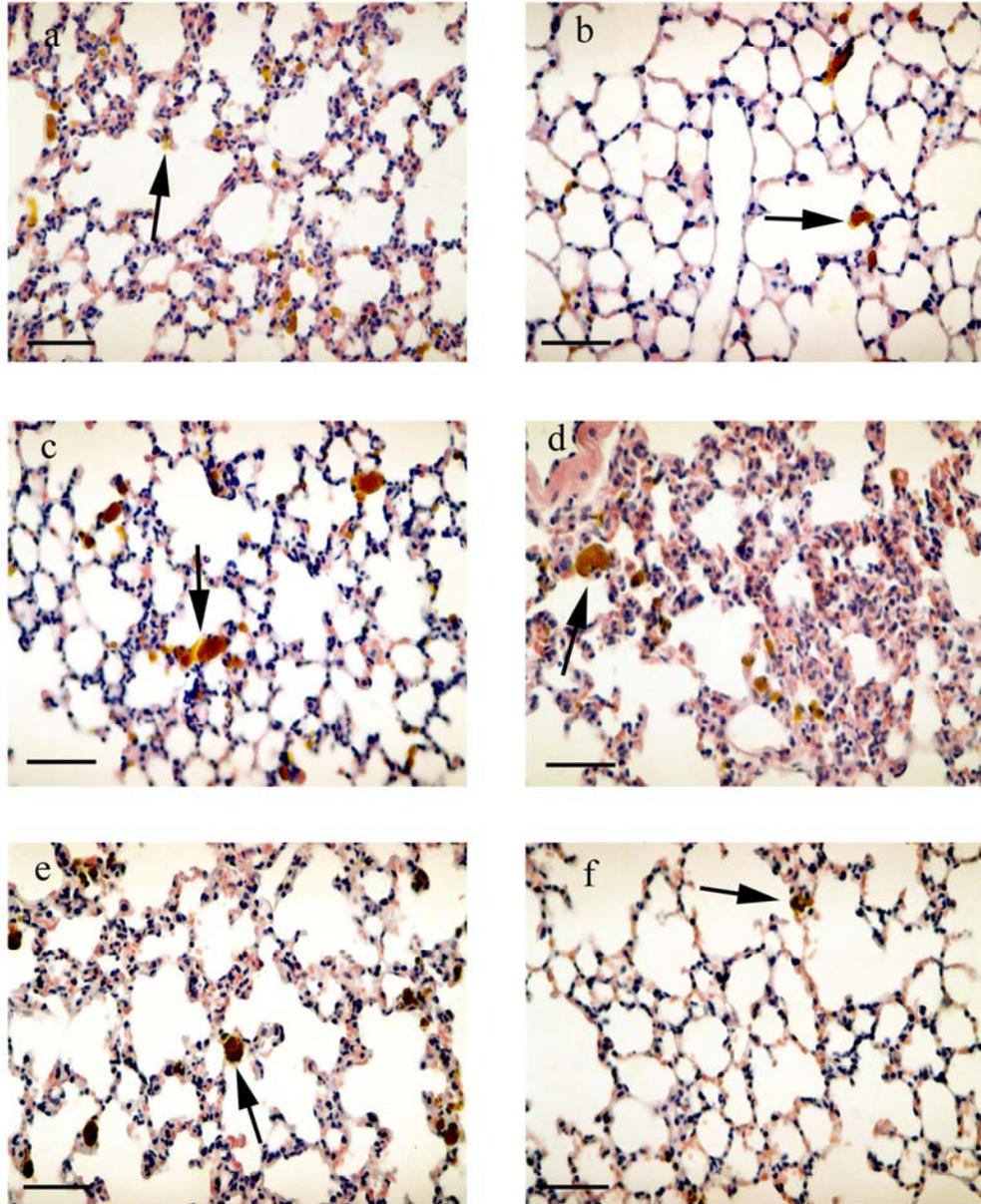


Figura 12: Fotomicrografia de pulmão de camundongos tratados com FMF-1. a) 30 minutos (H&E, 40×); b) 6 horas (H&E, 40×); c) 12 horas (H&E, 40×); d) 24 horas (H&E, 40×); e) 48 horas (H&E, 40×); f) 7 dias (H&E, 40×). As setas indicam aglomerados de nanopartículas; O tamanho da barra corresponde a 20µm.

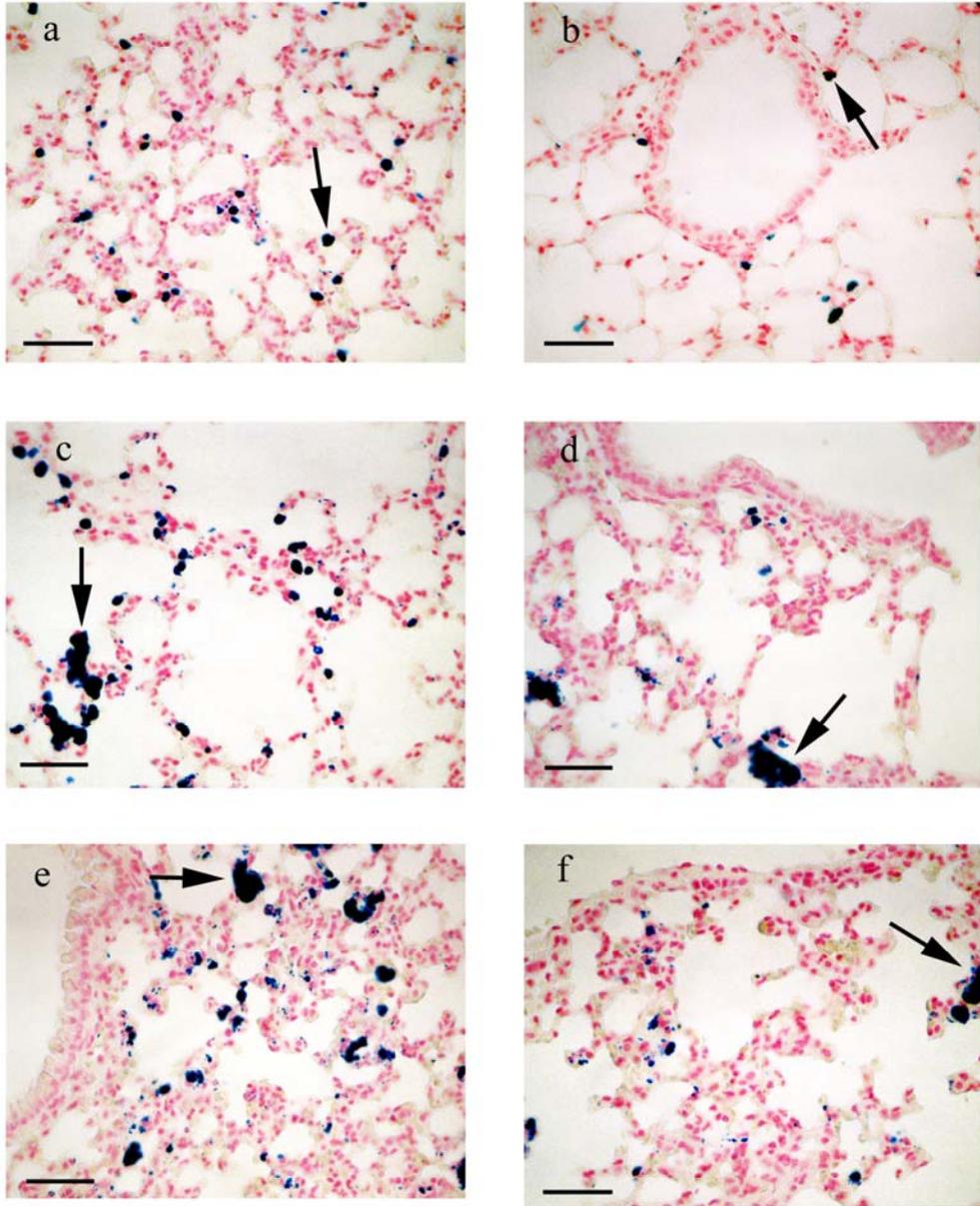


Figura 13: Fotomicrografia de pulmão de camundongos tratados com FMF-1. a) 30 minutos (Perls, 40×); b) 6 horas (Perls, 40×); c) 12 horas (Perls, 40×); d) 24 horas (Perls, 40×); e) 48 horas (Perls, 40×); f) 7 dias (Perls, 40×). As setas indicam aglomerados de nanopartículas. O tamanho da barra corresponde a 20µm.

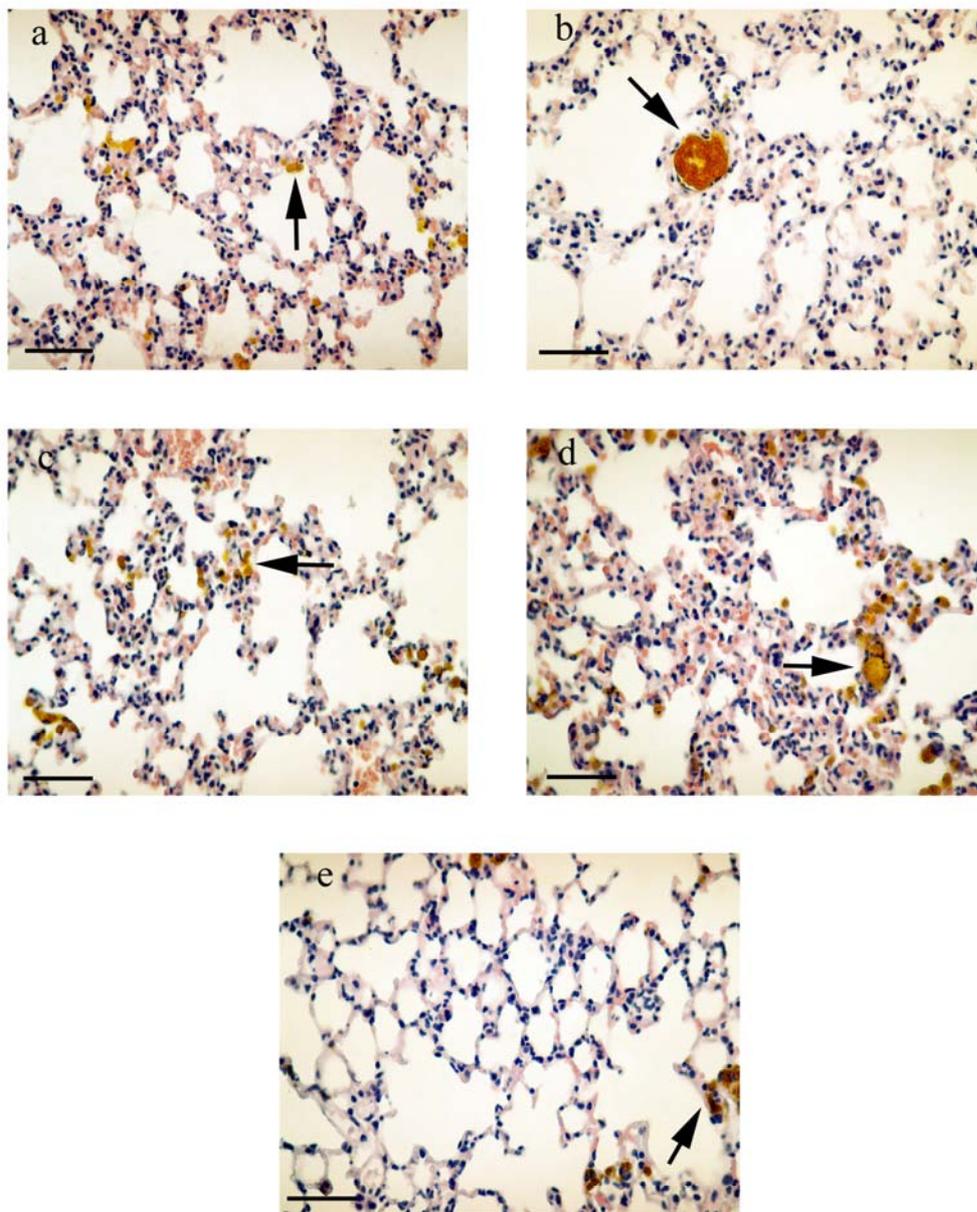


Figura 14: Fotomicrografia de pulmão de camundongos tratados com FMF-2; a) 30 minutos (H&E, 40×); b) 6 horas (H&E, 40×); c) 12 horas (H&E, 40×); d) 24 horas (H&E, 40×); e) 7 dias (H&E, 40×); As setas indicam aglomerados de nanopartículas; O tamanho da barra corresponde a 20 $\mu$ m.

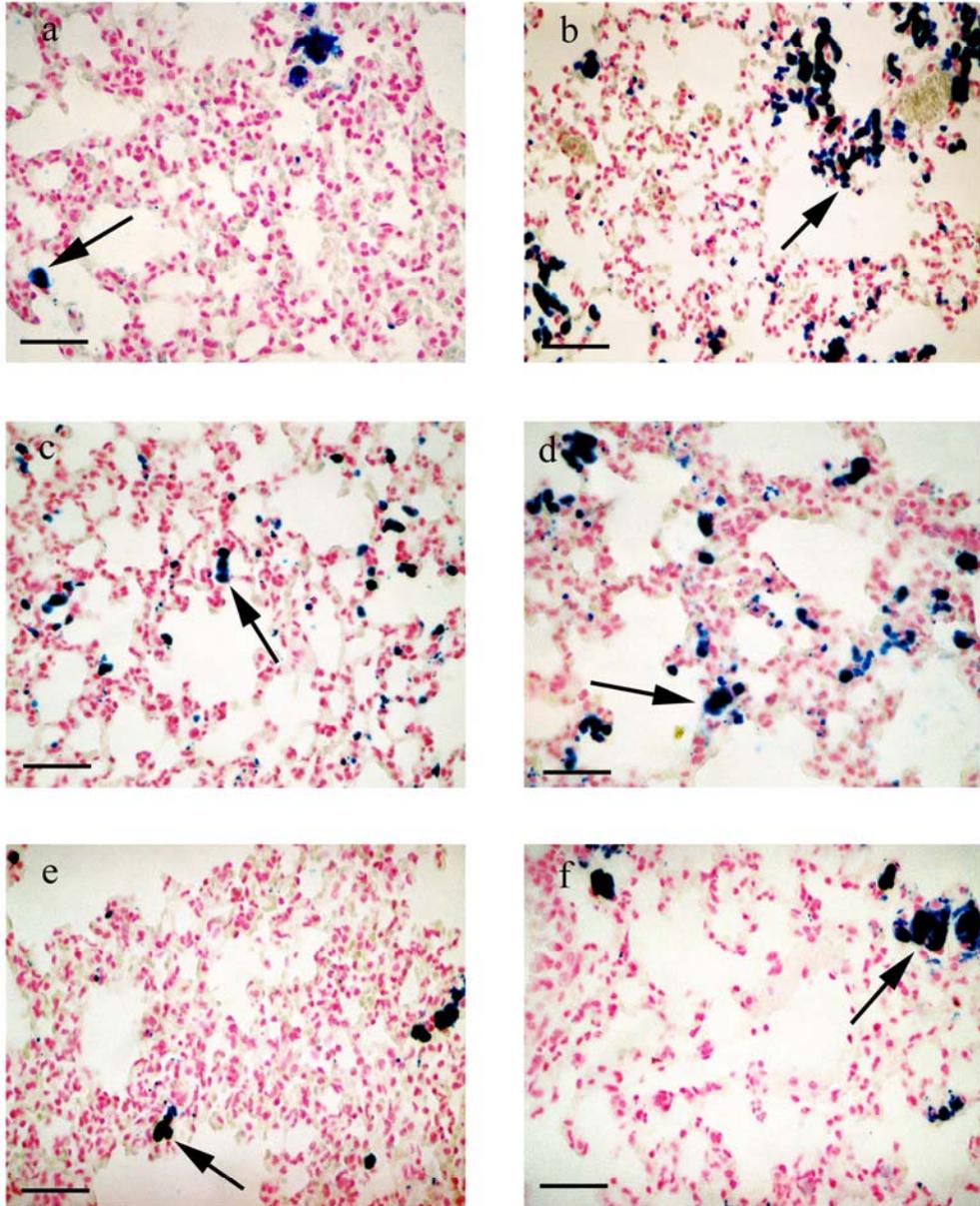


Figura 15: Fotomicrografia de pulmão de camundongos tratados com FMF-2. a) 30 minutos (Perls, 40×); b) 6 horas (Perls, 40×); c) 12 horas (Perls, 40×); d) 24 horas (Perls, 40×); e) 48 horas (Perls, 40×); f) 7 dias (Perls, 40×). As setas indicam aglomerados de nanopartículas; O tamanho da barra corresponde a 20 $\mu$ m.

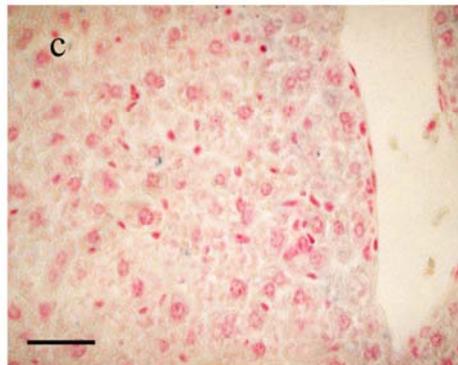
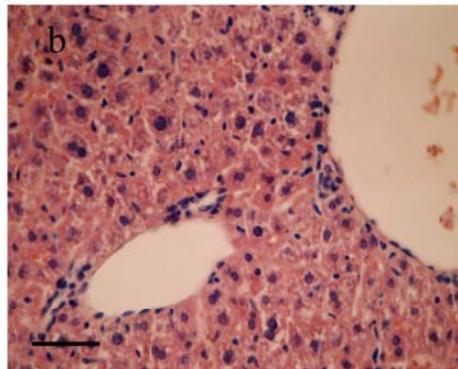
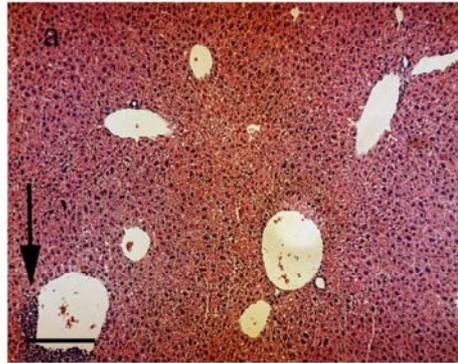


Figura 16: Fotomicrografia de fígado de camundongos controle. a) (H&E, 10×); b) H&E, (40×); c) (Perls, 40×). Seta mostrando infiltrado inflamatório próximo a veia. A seta na figura (a) indica infiltrado inflamatório. O tamanho da barra corresponde a 20 $\mu$ m.

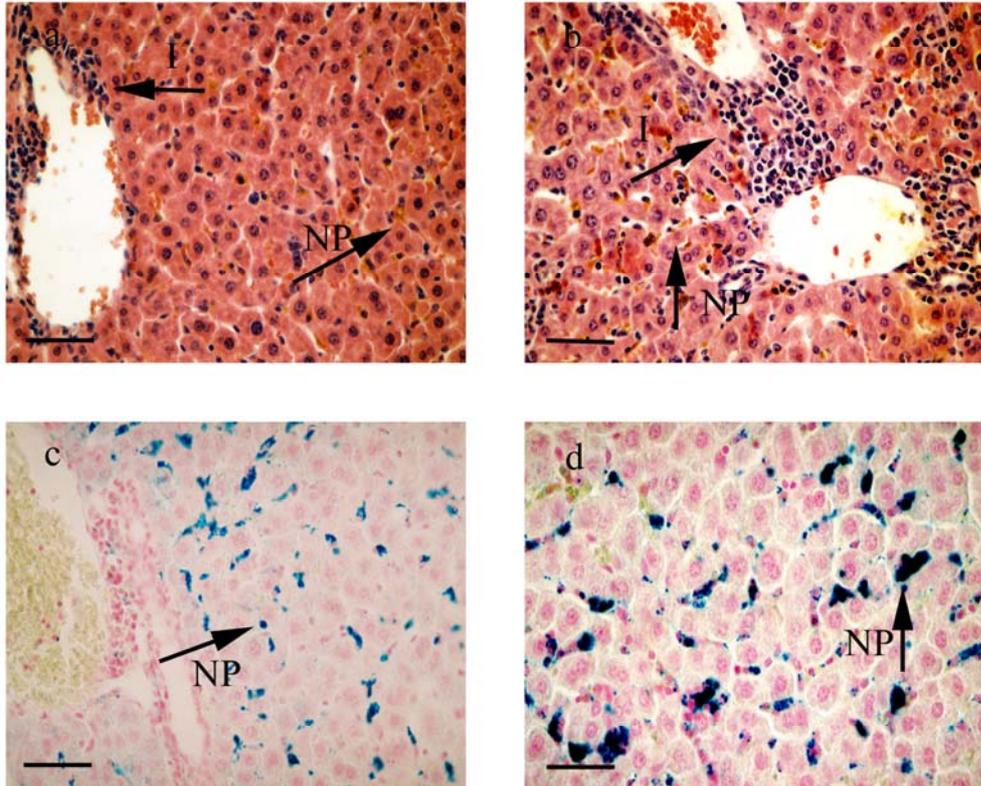


Figura 17: Fotomicrografia de fígado de camundongos tratados com FMF-1. a) 30 minutos (H&E , 40×); b) Seis horas (H&E , 40×); c) 30 minutos (Perls , 40×); d) 12 horas (Perls , 40×). As setas (I) indicam infiltrado inflamatório; As setas (NP) indicam aglomerados de nanopartículas; O tamanho da barra corresponde a 20µm.

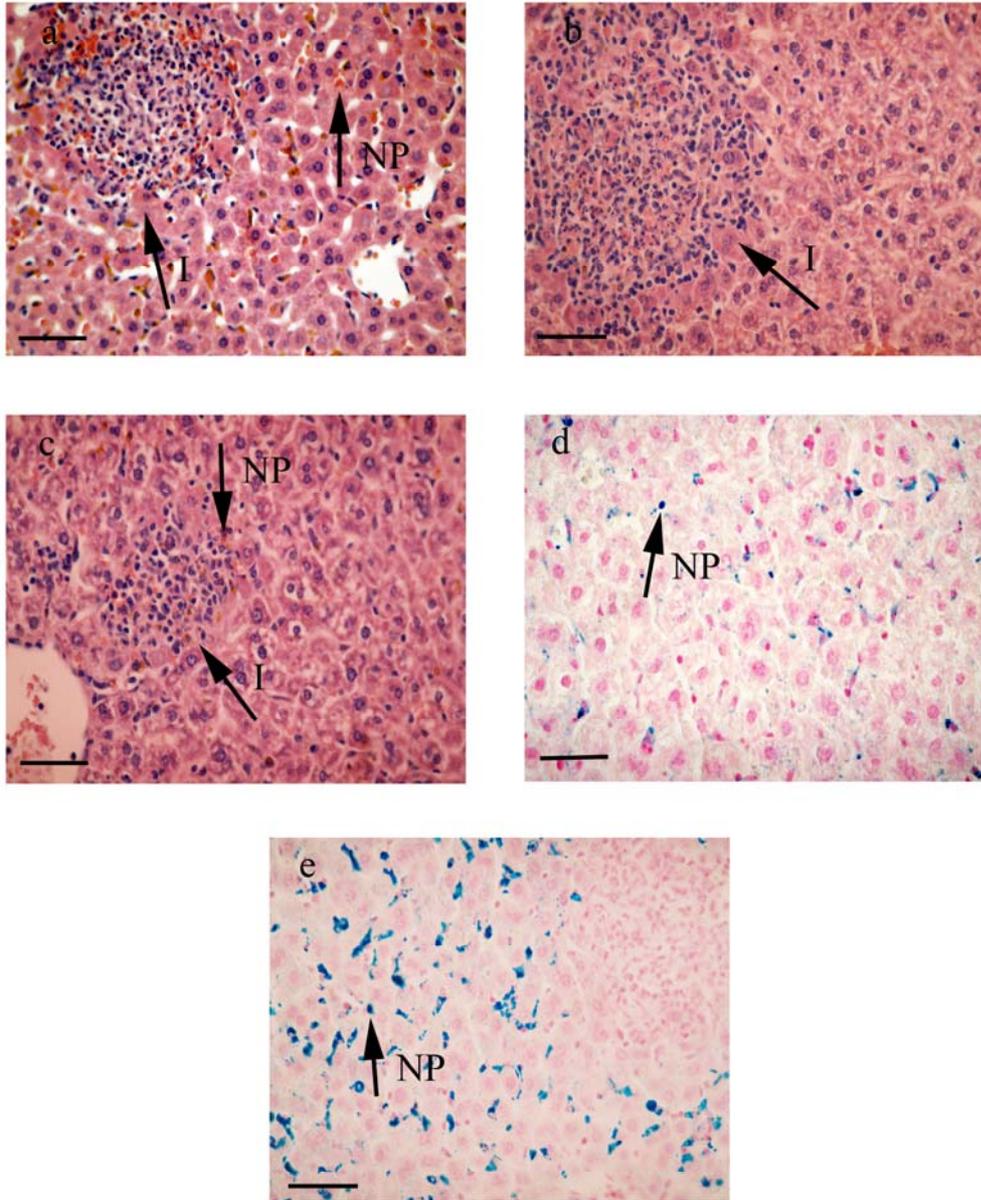


Figura 18: Fotomicrografia de fígado de camundongos tratados com FMF-2. a) 30 minutos (H&E , 40×); b) 48 horas (H&E , 40×); c) 7 dias (H&E , 40×); d) 30 minutos (Perls , 40×); e) 48 horas (Perls , 40×). As setas (I) indicam infiltrado inflamatório; As setas (NP) indicam aglomerados de nanopartículas. O tamanho da barra corresponde a 20 $\mu$ m.

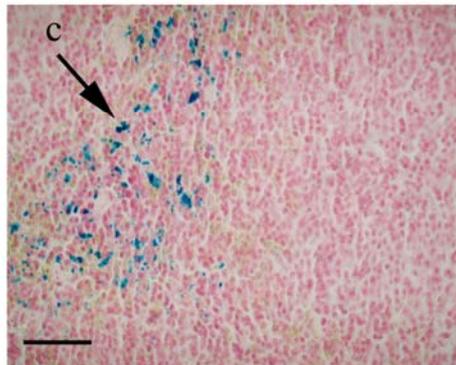
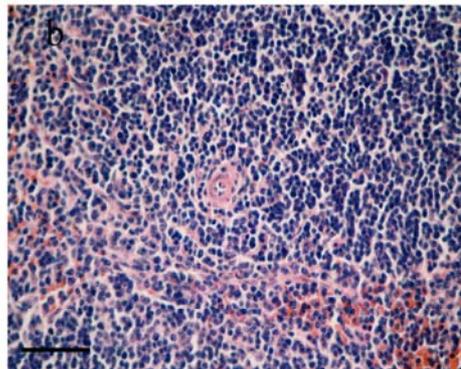
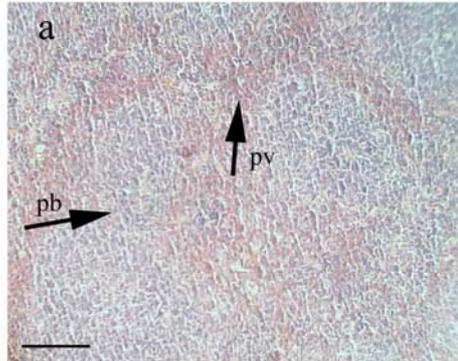


Figura 19: Fotomicrografias de baço de camundongos controle: a) (H&E, 10×); b) (H&E, 40×); c) (Perls, 40×); As setas na figura (a) indicam polpa branca (pb) e polpa vermelha (pv); A seta na figura (c) indica presença de ferro. O tamanho da barra nas figuras corresponde a 20µm.

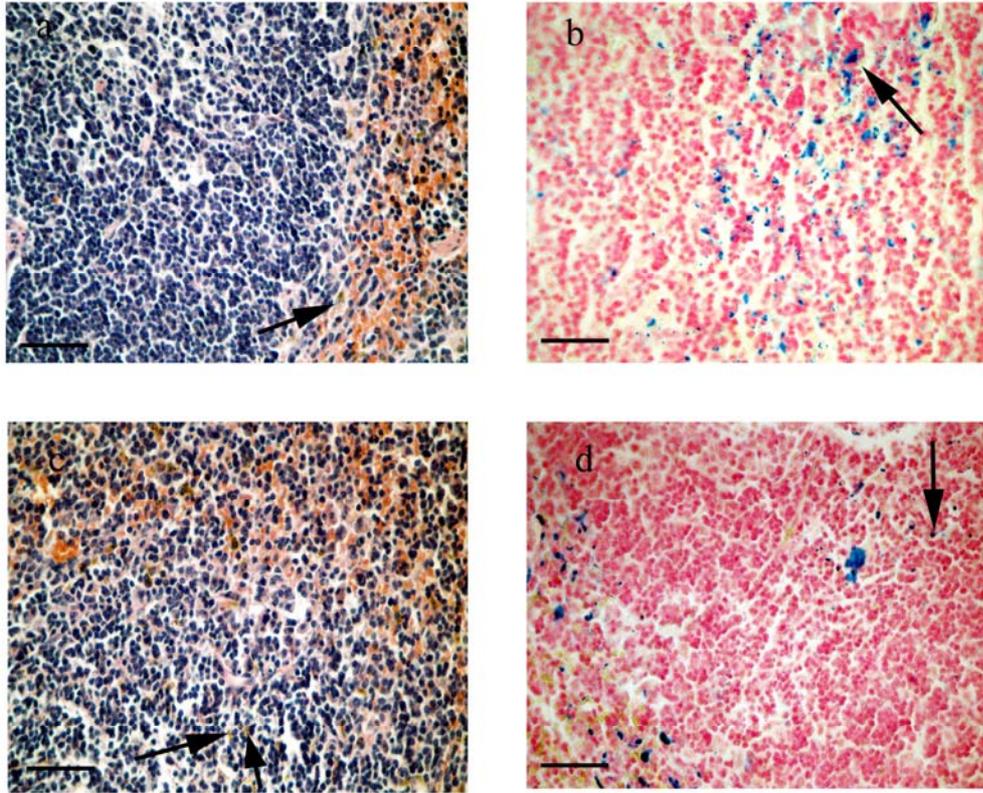


Figura 20: Fotomicrografias de baço de camundongos tratados com FMF- 1: a) 48 horas (H&E, 40×); b) 48 horas (Perls, 40×); c) 7 dias (H&E, 40×); d) 7 dias (Perls, 40×). As setas indicam aglomerados de nanopartículas. O tamanho da barra corresponde a 20µm.

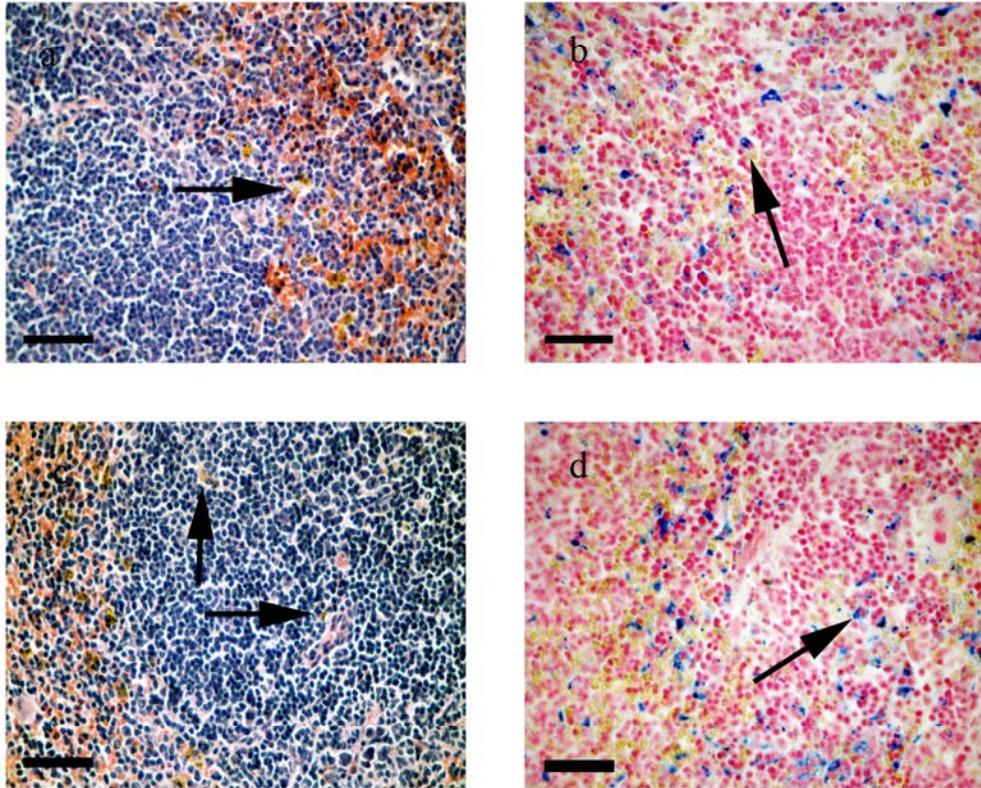


Figura 21: Fotomicrografias de baço de camundongos tratados com FMF- 2: a) 24 horas (HE, 40×); b) 24 horas (Perls, 40×); c) 7 dias (HE, 40×); d) 7 dias (Perls, 40×). As setas indicam aglomerados de nanopartículas. O tamanho da barra corresponde a 20µm.

**Tabela 1** – Resultado dos testes de viabilidade, micronúcleo e citometria dos animais tratados com FMF-1 ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas) e FMF-2 ( $1,4 \times 10^{15}$  partículas).

	FMF-1	FMF-2
<b>Viabilidade</b>	S.A	S.A
<b>Micronúcleo</b>	<b>ENC</b>	S.A
	<b>EPC</b>	S.A
<b>EPC%</b>	↓24h* ↓48h*	↓24h* ↓7d*
	<b>C.G</b>	S.A
<b>Citometria</b>	<b>Linfócitos</b>	↓6h* ↓12h* ↓24h* ↓48h* ↓7d*
	<b>Neutrófilos</b>	↑6h* ↑12h*
	<b>Eosinófilos</b>	↑24h*
	<b>Monócitos</b>	S.A.

(ENC – eritrócito normocromático; EPC – eritrócito policromático; EPC% - percentual de eritrócito policromático; C.G. – contagem global de leucócitos; Linf. – linfócitos; Neut. – neutrófilos; Eos. – eosinófilos; Mono. – monócitos; S.A. – sem alteração; ↓ - diminuição; ↑ - aumento; \* - diferença estatisticamente significativa).

**Tabela 2** – Resultados das análises morfológicas dos animais controle.

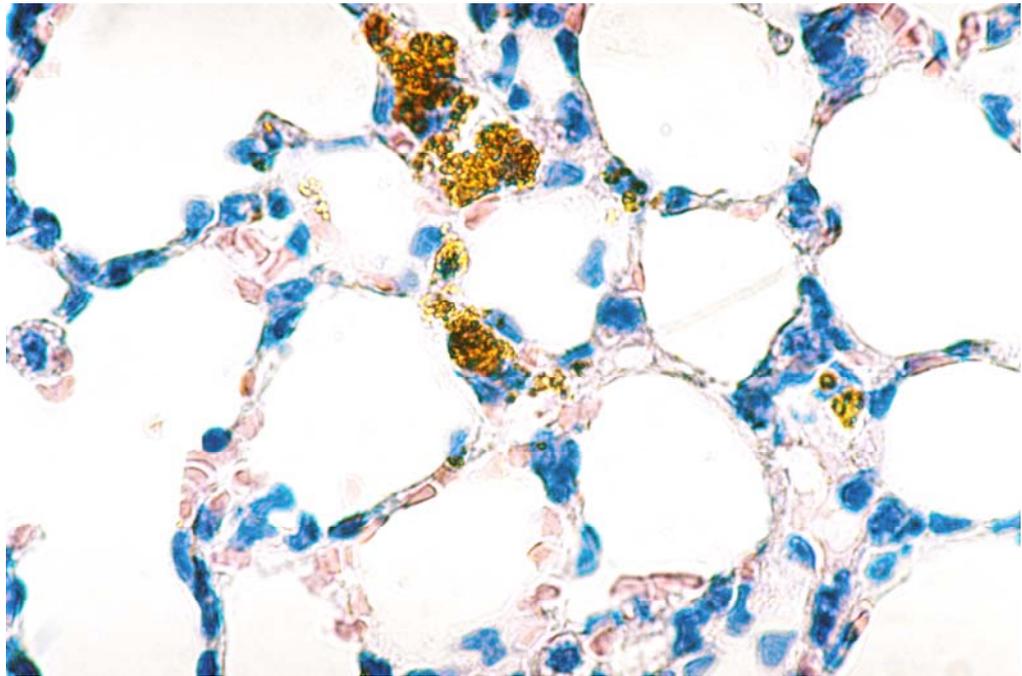
<b>Controle</b>	<b>HE</b>	<b>Perls</b>
Baço	S.A.	(+)
Pulmão	E. (1)	-
Fígado	I. (1)	-

(S.A. – sem alteração; E – espessamento; I – infiltrado inflamatório; ( ) na coloração de HE - quantidade de animais com alteração; ( ) na coloração de Perls – valores subjetivos relativos a pequeno, intermediário e grande número de agregados de NPM em relação ao grupo controle).

**Tabela 3** – Resultados das análises morfológicas dos animais tratados com FMF-1 ( $0,7 \times 10^{15}$  partículas) e FMF-2 ( $1,4 \times 10^{15}$  partículas).

	<b>Tempos</b>	<b>HE</b>		<b>Perls</b>	
		<b>FMF-1</b>	<b>FMF-2</b>	<b>FMF-1</b>	<b>FMF-2</b>
<b>Pulmão</b>	30min	E (1)	I, E (1)	(+ +)	(+ +)
	6h	I (1)	E (1)	(+ +)	(+ + +)
	12h	E (1)	E (1)	(+ + +)	(+ + +)
	24h	E (3)	E (1)	(+ +)	(+ + +)
	48h	E (2)	E (1)	(+ + +)	(+ +)
	7d	E (2)	E (1)	(+ +)	(+ +)
<b>Fígado</b>	30min	I (1)	I (1)	(+ +)	(+ +)
	6h	I (1)	S.A.	(+ +)	(+ +)
	12h	S.A.	S.A.	(+ + +)	(+ + +)
	24h	S.A.	S.A.	(+ + +)	(+ + +)
	48h	S.A.	I (1)	(+ + +)	(+ + +)
	7d	S.A.	I (1)	(+ + +)	(+ + +)
<b>Baço</b>	30min	S.A.	S.A.	(+)	(+ +)
	6h	S.A.	S.A.	(+)	(+ +)
	12h	S.A.	S.A.	(+)	(+ +)
	24h	S.A.	S.A.	(+)	(+ +)
	48h	S.A.	S.A.	(+)	(+ +)
	7d	S.A.	S.A.	(+)	(+ +)

(S.A. – sem alteração; E – espessamento; I – infiltrado inflamatório; ( ) na coloração de HE - quantidade de animais com alteração; ( ) na coloração de Perls – valores subjetivos relativos a pequeno, intermediário e grande número de agregados de NPM em relação ao grupo controle).



## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos a biocompatibilidade/toxicidade de uma amostra de fluido magnético constituído de nanopartículas magnéticas à base de maghemita recobertas com polifosfato (FMF) em duas concentrações diferentes: FMF-1 e FMF-2 correspondendo a  $0,7 \times 10^{15}$  partículas em 50  $\mu\text{L}$  e  $1,4 \times 10^{15}$  partículas em 100  $\mu\text{L}$ , respectivamente. A amostra foi selecionada porque a cobertura com fosfato, molécula abundante nos seres vivos, confere potencial de biocompatibilidade às nanopartículas, pré-requisito para que possam ser consideradas candidatas potenciais para mediar aplicações biomédicas, como a magnetotermocitólise ou carreamento de drogas.

### **5.1 Considerações sobre a amostra de polifosfato**

É importante conhecer os parâmetros físicos e químicos tanto dos fluidos magnéticos quanto das nanopartículas para compreender o seu mecanismo de ação e eficiência para aplicações biomédicas (Bahadur; Giri, 2003).

A microscopia eletrônica de transmissão é instrumento importante para determinar a distribuição do diâmetro das partículas em fluido magnético. O diâmetro médio das partículas apresenta influência direta sobre suas propriedades fisicoquímicas e farmacocinéticas: tempo de permanência, na velocidade com que atravessam a barreira endotelial e no seu reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear (Berry; Curtis, 2003). De forma geral, diâmetros reduzidos e monodispersão podem facilitar uma rápida distribuição do material magnético no organismo. A amostra FMF usada neste trabalho possui 9,8 nm de diâmetro, tamanho muito similar a outras amostras de fluido magnético já testadas (Lacava et al., 2002, 2003; Sadeghiani et al., 2005). Diâmetros na faixa de 4 a 10 nm, além de apresentarem aspectos favoráveis à biodistribuição, respondem adequadamente a campos magnéticos, ainda

que externos ao organismo e, portanto, são ideais para aplicações biomédicas. De qualquer maneira, materiais magnéticos utilizando partículas de diâmetro maior também têm sido usados em aplicações biomédicas, tais como partículas de 100nm e 50nm (Hughes, 2005).

A natureza química das partículas também é um fator importante a ser considerado. Resultados prévios revelaram que cada tipo de NPM apresenta comportamento diferente. FM composto de ferrita de manganês (Lacava et al., 1999 a,b), de magnetita (Garcia et al., 2002) e de ferrita de cobalto (Kückelhaus et al., 2003) foram recobertas com ácido cítrico resultando em efeitos biológicos diferentes. As NP de ferrita de manganês induziram genotoxicidade e reações inflamatórias severas. O mesmo não aconteceu com as nanopartículas de magnetita onde só foi observado um leve processo inflamatório, mas alta letalidade. Já a amostra de ferrita de cobalto gerou uma leve citotoxicidade. Os resultados obtidos sugerem que a composição química das NPM influenciou diretamente nos efeitos biológicos observados. Nossa amostra era baseada em nanopartículas de maghemita. Testes com nanopartículas à base de magnetita são abundantes (Lacava et al., 2002, 2003, 2004, Chaves et al., 2005, Guedes et al., 2004, Garcia et al., 2002, Freitas et al., 2003), mas, até onde é de nosso conhecimento testes *in vivo* com NP de maghemita se restringem aos deste trabalho e aos realizados com NP de maghemita recobertas com citrato (Brugin, informação pessoal). A vantagem em se utilizar NP a partir de maghemita em relação às de magnetita seria a de que a maghemita já está na forma oxidada e, portanto, com potencial menor em causar toxicidade aos tecidos. Foi constatado que NP de maghemita recobertas com citrato causaram toxicidade menor do que as NP de magnetita recobertas com citrato (Brugin, informação pessoal). Corroboram este fato os achados de Sonvico e colaboradores (2005) com testes *in vitro* com nanopartículas de maghemita recobertas com folato em que foram constatados toxicidade branda e temporária.

Um fator relevante para a utilização de NPM em aplicações biológicas é a cobertura destes materiais. A cobertura é um fator estabilizante para o fluido, pois permite que as partículas não se aglomerem e nem se precipitem em meio líquido. Trabalhos anteriores mostraram diferentes efeitos biológicos das NP dependendo do tipo de cobertura. NP de magnetita foram recobertas com diferentes materiais: ácido glucônico (Barbosa, 2004), ácido cítrico (Garcia, 2002), ácido poliaspártico (Sadeghiani, 2004) e os resultados quanto à biodistribuição e quanto aos efeitos biológicos foram diferentes. A amostra em que as NP eram recobertas por ácido glucônico revelou alterações morfológicas no pulmão, citotoxicidade e genotoxicidade significantes. Porém, as NP recobertas com ácido cítrico e ácido poliaspártico apresentaram baixa genotoxicidade e citotoxicidade sugerindo serem amostras biocompatíveis para aplicações biomédicas. Nosso trabalho foi realizado com NP recobertas com polifosfato que apresentaram baixa citotoxicidade, ausência de genotoxicidade, alterações citométricas tempo e dose dependentes, além de afinidade por pulmão, fígado e baço. O fosfato é um radical constituído de um átomo de fósforo e quatro de oxigênio. Foi escolhido para a cobertura das NP porque o fósforo é o segundo elemento mineral mais abundante no organismo, desempenhando ampla gama de funções essenciais. Entre outras, NP recobertas por polifosfato poderiam ser preferencialmente atraídas para células com alta taxa metabólica, como as do câncer, funcionando como carreadores específicos de quimioterápicos ou possibilitando terapias alternativas, como a magnetohipertermia.

## **5.2 Considerações sobre o ferro**

As NP utilizadas neste trabalho apresentam ferro em sua constituição, razão pela qual é pertinente tecer algumas considerações sobre seu metabolismo. O ferro é um elemento

essencial para a vida humana por se tratar de um componente indispensável para as atividades de muitos processos metabólicos, uma vez que proteínas que contêm ferro catalisam reações que envolvem metabolismo de energia, síntese de DNA, (Kwok; Richardson, 2002; Richardson, 2002), dentre outros.

A maioria do ferro encontrado em humanos está presente nas moléculas de hemoglobina (heme) ou armazenada na forma de hemossiderina e ferritina (Huang, 2003). A ferritina, então, funciona controlando a viabilidade do ferro para o uso celular bem como protegendo a célula de efeitos deletérios (Lindsay et al., 2003). Estas são sintetizadas em grande quantidade nos hepatócitos e no baço (Pereira; Pereira; Sousa, 1999). A estocagem é muito importante, pois a maior parte do ferro é reciclada para suprir a acelerada eritropoiese do organismo de indivíduos saudáveis. A transferrina é a proteína responsável por transportar o ferro presente no plasma e fluido extracelular (Emerit; Beaumont; Trivin, 2001). Este ferro está primariamente a caminho da medula óssea para a incorporação do heme (Rappaport, 1990). A regulação do ferro no organismo é controlada basicamente pela absorção. Quando as reservas estão depletadas há um mecanismo que aumenta a absorção do ferro pelas células intestinais. Por outro lado, quando há excesso de reservas, as células do intestino provocam um "bloqueio" na absorção (Filho; Ferreira, 2002).

Embora o ferro seja essencial, níveis elevados podem levar à citotoxicidade resultando na produção de radicais hidroxila e superóxido, que atacam membranas celulares, proteínas e DNA (Emerit; Beaumont; Trivin, 2001). Uma das preocupações em relação ao uso de NPM para aplicações biomédicas é a respeito da eliminação deste material. Neste trabalho, as análises mostraram não ter tido alterações severas com a presença das NPM em ambas as concentrações, o que sugere que o ferro liberado da maghemita foi incorporado pela ferritina

ou se ligou à transferrina, não ocasionando produção excessiva de radicais livres e, conseqüentemente, danos ao organismo.

### **5.3 Considerações sobre o teste de viabilidade**

De acordo com a literatura, as células predominantes na cavidade peritoneal são os macrófagos (Nishi et al., 1986 apud Lacava et al., 1999). Na avaliação do potencial tóxico de FMF, realizada na cavidade peritoneal, foi possível observar que, em ambas as concentrações, não houve alteração estatisticamente diferente na frequência de células vivas comparada aos valores do grupo controle. Estes resultados indicam que a amostra de FMF não afeta a viabilidade das células peritoneais. Diferentemente da amostra FMF, amostra de NP de magnetita recobertas com ácido poliaspártico mostrou um moderado grau de toxicidade (Sadeghiani, 2004). Também difere dos resultados encontrados nos estudos de FM com NP de magnetita recobertas com carboximetil dextrana que induziram significativa diminuição da viabilidade dos macrófagos peritoneais de 15 minutos até 48 horas, só retornando aos valores normais sete dias após a injeção intraperitoneal (Guedes et al., 2005).

É interessante salientar que a viabilidade no peritônio depende também da migração das células fagocitárias peritoneais para outros órgãos e tecidos do organismo, bem como da migração das células do sangue periférico para a cavidade peritoneal.

### **5.4 Considerações sobre a análise citométrica**

Os exames hematológicos expressam as condições do sangue periférico em certo momento da vida de um indivíduo, sendo os mais utilizados na prática clínica por serem práticos e econômicos. O hemograma completo avalia todos os componentes celulares:

glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas. Para avaliar efeitos citotóxicos da amostra FMF, este trabalho se ateve apenas às contagens global e diferencial de leucócitos, células que têm como principal função, a defesa do organismo contra agentes infecciosos e substâncias estranhas.

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

A contagem de leucócitos constitui uma ferramenta importante em análises patológicas, pois, por meio dos resultados, é possível identificar processos inflamatórios, alérgicos, parasitários, entre outros (Garcia, 2002). Tem se revelado também de grande importância na avaliação de novos materiais nanobiotecnológicos, incluindo-se fluidos magnéticos e magnetolipossomas (Garcia et al., 2002; Kückelhaus et al., 2003).

Neste estudo, a amostra FMF-1 não induziu diferença significativa na população de leucócitos quando comparados ao grupo controle. Em seis horas a população de linfócitos diminuiu significativamente, porém, no mesmo período de tempo, houve um aumento na população de neutrófilos o que explica não ter havido alteração no número global de leucócitos. Por outro lado, a diminuição na contagem global de leucócitos (leucopenia) após aplicação da amostra FMF-2 foi significativa, pois enquanto o número de linfócitos diminuiu em todos os tempos analisados (sendo significativa de 6 horas a sete dias), esta diminuição não foi suficientemente balanceada pelo aumento dos outros tipos celulares. Este resultado sugere que com a injeção de  $1,4 \times 10^{15}$  partículas, a amostra FMF-2 tem potencial pró-

inflamatório. A diferença entre FMF-1 e FMF-2 denota a importância da concentração de nanopartículas administradas nas aplicações biomédicas.

A contagem diferencial ou específica é feita em esfregaço sanguíneo, com a finalidade de contar, em valores percentuais, as várias células da série branca (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) circulantes no sangue periférico (Valle, 2001). Diferentemente de humanos, a população mais abundante no sangue dos camundongos é a de linfócitos. É por esta razão que, como citado acima, a população de linfócitos foi a responsável pelas alterações significativas na população total de leucócitos, ainda que as populações de outros tipos leucocitários tenham apresentado alteração em algumas das observações realizadas após administração de FMF (Lacava et al., 1999b). É interessante notar que após a aplicação de FMF-2, a população de linfócitos foi a única a permanecer alterada até sete dias após aplicação. Trabalhos anteriores mostraram que após sete dias, as alterações citométricas induzidas por NPM não mais eram observadas (Garcia et al., 2002; Sadeghiani, 2004).

Dentre os leucócitos, os neutrófilos desempenham um papel importante na defesa do organismo contra infecção microbiana. Sob exposição de produtos derivados de bactérias ou mediadores inflamatórios, os neutrófilos exercem várias funções especializadas incluindo quimiotaxia, fagocitose e morte microbiana (Moraes; Downey, 2003). A frequência da população de neutrófilos após injeção da amostra FMF-1, além de ter aumentado em seis horas, aumentou também em 12 horas. Já com a amostra de maior concentração, o aumento na frequência de neutrófilos ocorreu de 30 minutos a seis horas. Estes dados revelam a ocorrência de um processo inflamatório temporário, visto que nos tempos seguintes a frequência destas células foi normalizada.

Por outro lado, os eosinófilos possuem granulações específicas muito características, menos numerosas e bem maiores do que as dos neutrófilos. Coram-se muito bem por corantes ácidos, como a eosina, por isso o nome que recebem (Lorenzi, 2003). Quando uma substância estranha entra no corpo, ela é detectada pelos linfócitos e neutrófilos, que liberam substâncias que atraem os eosinófilos para a área. Os eosinófilos então liberam grânulos citoplasmáticos cujo conteúdo é o principal mediador das reações alérgica (Abbas; Lichtman; Pober, 2003). Eosinofilia é o aumento anormal de eosinófilos no sangue. Este aumento normalmente indica uma resposta a substâncias que causam reação alérgica (alergenos) ou presença de parasitas (helmintos). No presente trabalho, as amostras FMF-1 e FMF-2 induziram eosinofilia temporária 24 horas após tratamento, sugerindo uma resposta alergênica do organismo frente a um corpo estranho, as nanopartículas recobertas por polifosfato, independentemente da concentração do material magnético investigada.

Todos os efeitos citométricos observados após administração da amostra FMF, em ambas as concentrações, são tempo e dose dependentes, a exemplo de trabalhos anteriores (Garcia, 2002; Sadeghiani, 2004).

## **5.5 Considerações sobre o teste de Micronúcleo**

O micronúcleo (MN) é um pequeno fragmento nuclear que se separa do material genético durante o processo de divisão celular em consequência de alterações estruturais espontâneas, alterações induzidas experimentalmente ou, ainda, de falhas no fuso celular (Gay et al., 1991; Evans, 1997). Quando os eritrócitos expulsam seus núcleos, durante a fase de maturação de eritroblastos a eritrócitos, os pequenos fragmentos nucleares podem ficar retidos dentro da célula (Freitas et al., 2002). A frequência de MNs em eritrócitos pode, em

conseqüência, indicar o dano citogenético causado *in vivo* por agentes mutagênicos (Schmid, 1975; Evans, 1997). O teste de MN é considerado confiável quando efetuado em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos (Schmid, 1975), como usado neste trabalho, eritrócitos e linfócitos do sangue periférico e em células esfoliadas, como a da mucosa bucal (Diaz et al., 1990).

Testes de MN têm sido freqüentemente utilizados para o estudo dos efeitos genotóxicos e citotóxicos de materiais magnéticos (Freitas et al., 2002; Garcia et al., 2002; Kückelhaus, 2003; Barbosa, 2004; Sadeghiani, 2004). No presente trabalho, o teste de MN foi realizado em camundongos tratados com a amostra magnética FMF, nas duas diferentes concentrações, 24 e 48 horas e sete dias após a injeção endovenosa. Nos controles e após tratamento que não afetam o estágio proliferativo da medula óssea, a relação esperada entre células policromáticas (EPC) e normocromáticas (ENC) é de aproximadamente 1:1 (Schmid, 1975; Gay et al., 1991) e qualquer desvio desta proporção pode significar efeito citotóxico do tratamento. Constatada pela diminuição do índice de EPC, a amostra FMF induziu uma citotoxicidade temporária, quando comparada ao grupo controle, em ambas as concentrações. Este efeito citotóxico foi também verificado nas primeiras 48 horas após tratamentos com outras amostras magnéticas e em análises posteriores, com sete, 15 ou 28 dias não mais foi constatado (Garcia et al., 2002). Embora este seja um resultado aparentemente negativo, mostra um efeito esperado quando animais são submetidos a agentes externos. Embora tenha ocorrido efeito citotóxico, não foi observado genotoxicidade, constatado pela não formação de micronúcleos, mesmo na amostra de maior concentração (FMF-2). Estes dados representam um resultado amplamente favorável em relação à amostra de FMF, conforme relatado para outras amostras magnéticas (Kückelhaus et al., 2003).

Nos experimentos de MN, a ciclofosfamida foi utilizada como controle positivo para confirmar a eficácia da técnica. Este agente clastogênico induziu a formação de MN nos eritrócitos policromáticos, mas não o fez nos normocromáticos, conforme esperado, já que apenas os policromáticos ainda tinham núcleo no momento da administração do FMF.

No presente teste foram utilizados camundongos fêmeas jovens para a investigação dos MNs. Ainda que Gay e colaboradores (1991) tenham recomendado que o teste de MN seja realizado em animais jovens de ambos os sexos, Holmstrom (1988) relatou indução similar de micronúcleos em ambos os sexos para uma grande maioria de mutágenos. Além disso, em estudos de monitoramento de população humana exposta a mutágenos, geralmente não são encontradas diferenças sexuais quanto à frequência de alterações genéticas (Bonassi et al., 1994; Cruz et al., 1994), referências que justificam o uso exclusivo de fêmeas em nosso trabalho.

## **5.6 Considerações sobre o teste morfológico**

A análise morfológica revelou que o fluido magnético FMF, em ambas as concentrações, se dirige para o baço, pulmão e fígado, o que foi constatado pela presença de aglomerados de NP nestes órgãos. Vale dizer que estes três órgãos foram escolhidos para a análise morfológica por serem os mais afetados pela presença de NPM, conforme estudos anteriores (Garcia, 2002; Chaves et al., 2002, Sadeghiani, 2004).

Os aglomerados de NP observados eram de tamanho e forma variados e foram facilmente identificados em microscopia de luz, tanto nos tecidos corados com HE, como com Perls. A aglomeração de NPM em vários tecidos do camundongo já foi relatada em outros estudos (Chaves et al., 2002; Lacava, et al., 2003; Kückelhaus, 2003). Em relação aos

aglomerados encontrados no parênquima do fígado e baço tem sido sugerido que as NPM ao serem capturadas por células do SFM, perdem parcial ou totalmente a cobertura e, desta maneira, sem a repulsão estérica existente entre elas, acabam perdendo a estabilidade e aglomerando (Kückelhaus, 2003).

A quantidade de aglomerados de NPM era diferente não só entre os órgãos analisados, como também em função do tempo. Verificou-se no pulmão dos animais tratados, uma grande quantidade de nanopartículas aglomeradas em veias maiores e nos capilares dos septos alveolares. A grande quantidade de capilares pulmonares pode ser outro fator importante na formação de agregados, pois, retendo as NPM, permitiria maior contato entre as moléculas de polifosfato que as recobrem, inclusive levando à polimerização de grupos fosfatos pertencentes a diferentes partículas. De qualquer maneira, a natureza da cobertura é fator importante a ser considerado na afinidade de FMF pelo pulmão porque nem todos os FM investigados tiveram suas NPM formando aglomerados neste órgão, como é caso das NP de magnetita revestidas por dextrana (Lacava, 2004). A quantidade de aglomerados de NP é proporcional à concentração de NP administrada, sendo mais numerosos já a partir de seis horas nos animais tratados com a concentração de  $1,4 \times 10^{15}$  partículas (FMF-2), proporção só atingida em 12 horas nos animais tratados com FMF-1. O tratamento com FMF levou ao espessamento de algumas áreas do corte pulmonar. O septo interalveolar, assim como todo alvéolo, é delimitado por pneumócitos tipo I, que são células pavimentosas altamente achatadas, intercaladas com pneumócitos tipo II. Septos interalveolares espessos abrigam vasos sanguíneos e elementos do tecido conjuntivo incluindo macrófagos (Gartner; Hiatt, 2002). Nos animais tratados, além do espessamento, um ligeiro infiltrado inflamatório foi observado em algumas regiões do pulmão, tendo sido estas as alterações morfológicas encontradas neste órgão.

No fígado, foram encontrados aglomerados de NP do FMF, a exemplo do que foi observado para nanopartículas de magnetita recobertas com citrato e dextrana (Garcia, 2002). Neste órgão, entretanto, os aglomerados estavam mais dispersos que no pulmão. É interessante observar que a quantidade de aglomerados de NP no fígado parece aumentar à medida que diminuem no pulmão, sugerindo que com o passar do tempo as NP deixam o pulmão e são capturados pelo fígado. Um leve infiltrado inflamatório também foi observado no fígado de alguns animais tratados. Este resultado mostra que a afinidade das NPM para estes órgãos (pulmão e fígado) acarreta em um processo inflamatório temporário, não severo, visto que em sete dias a situação foi normalizada.

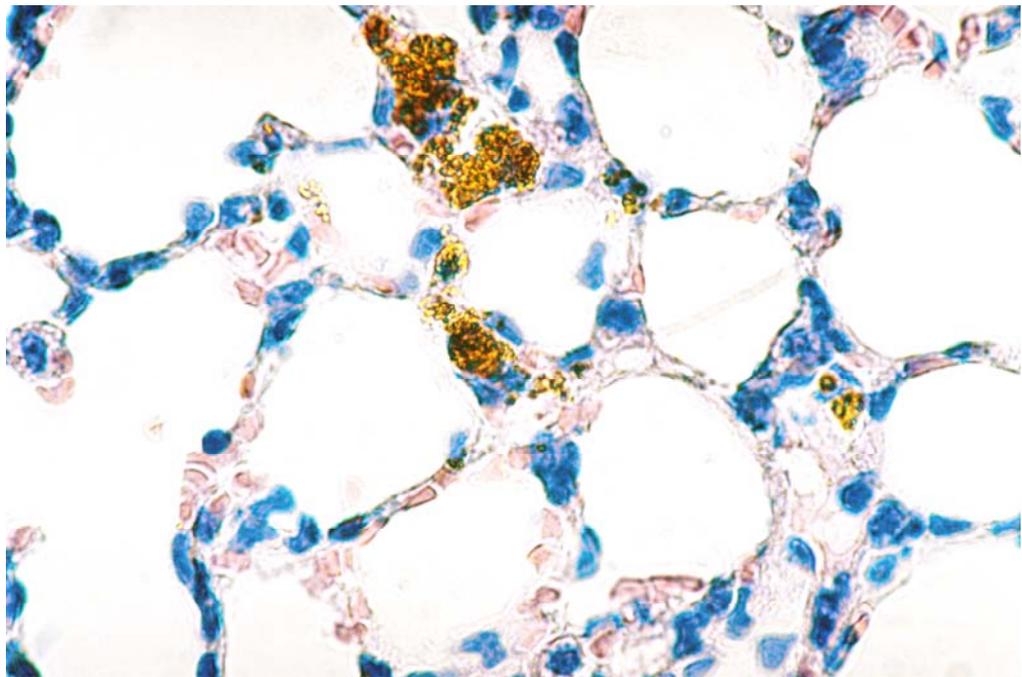
No baço, a quantidade de NP visualizadas foi menor quando comparada ao pulmão e fígado. O baço é o maior órgão linfóide do corpo e está subdividido em polpa vermelha e polpa branca. Na polpa vermelha, este órgão desempenha uma de suas principais funções que é de fagocitar hemácias senescentes, e assim, o ferro presente nestas hemácias é liberado para ser reaproveitado posteriormente.

Quando os animais controle foram submetidos à coloração de Perls, apareceram estruturas com aspecto e coloração semelhantes aos aglomerados de partículas magnéticas. Tais estruturas, abundantes no baço, evidenciam a presença de ferro endógeno, o que interfere na identificação das partículas magnéticas. Mesmo o uso do método de Perls, específico para  $Fe^{2+}$ , não possibilitou esta diferenciação. Entretanto, foi possível visualizar que nos animais tratados com  $1,4 \times 10^{15}$  (FMF-2) a quantidade de aglomerados era maior quando comparados ao grupo controle, o que evidenciou a presença de NPM neste órgão. O mesmo não aconteceu com os animais tratados com a menor concentração. A quantidade de aglomerados observados nestes animais eram semelhantes aos animais controles.

A quantidade menor de aglomerados de NPM encontrada no baço em relação ao pulmão e fígado é um fato interessante, pois como observado em outras amostras, como NP de magnetita recobertas por dextrana ou citrato, a afinidade das mesmas para este órgão pode ser grande (Lacava, 1999; Garcia, 2002). Com base nestes trabalhos anteriores, entretanto, é possível imaginar que aos poucos as NP do pulmão se dirigem para o fígado e deste órgão para o baço (Lacava et al., 2004). Observações por períodos de tempo maiores poderiam esclarecer esta idéia.

No presente trabalho não foi feito estudo da biodistribuição de FMF por análise de ressonância magnética o que impossibilitou detectar a presença das NPM em outros órgãos. Trabalhos anteriores utilizaram desta técnica para observar a biodistribuição das NPM nos mais diferentes tecidos (Garcia, 2002; Lacava, 2004; Sadeghiani, 2004). Pulmão, fígado e baço são usualmente os órgãos alvo das NP de magnetita nos camundongos. A similaridade nos estudos da biodistribuição realizados com ressonância magnética e com histologia (Lacava, 2002; Sadeghiani, 2004) sugerem que as NP de magnetita investigadas no presente trabalho têm afinidade importante com os três referidos órgãos. É interessante salientar que as diferenças na biodistribuição das nanopartículas investigadas até o momento demonstram que existe um comportamento biológico diferente dependendo do tipo de núcleo e do tipo de cobertura das amostras investigadas.

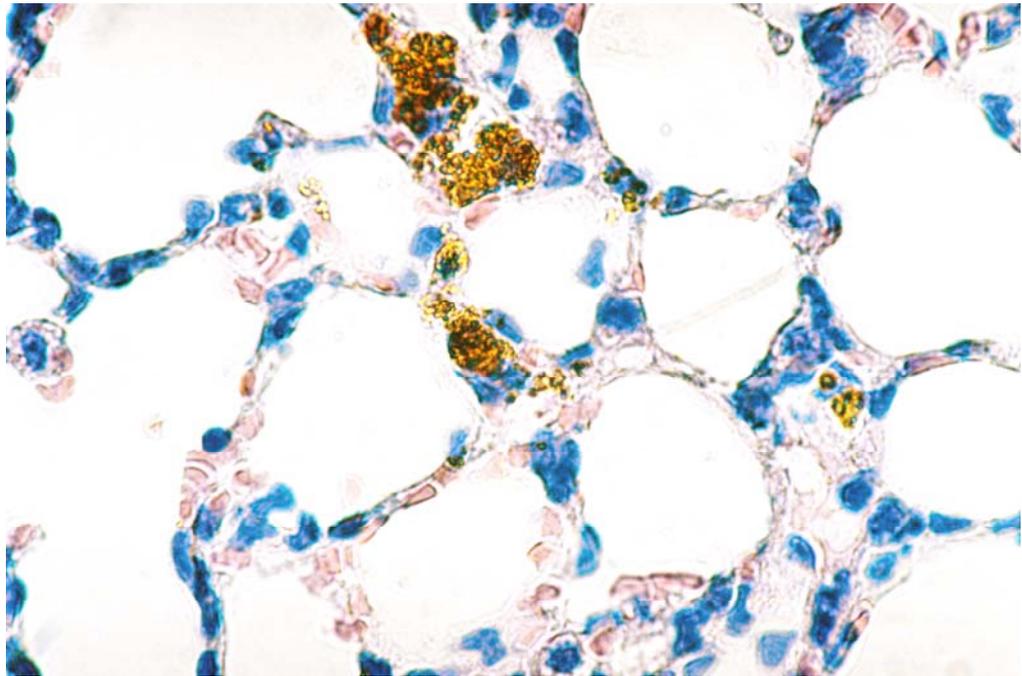
Apesar da observação de agregados de NPMs em todos os órgãos analisados, não foi detectada em qualquer um deles alteração morfológica, exceto pela presença de infiltrados inflamatórios também visualizados em animais controle e espessamento temporário dos septos alveolares. Este fato é um indicativo a mais de que as amostras testadas possuem biocompatibilidade adequada para aplicações biomédicas.



## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, que teve como objetivo investigar os efeitos biológicos de nova amostra de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas com polifosfato (FMF) em duas concentrações diferentes (FMF-1 e FMF-2), permitem concluir que:

- A amostra FMF não afeta a viabilidade de células peritoneais, como verificado pelo teste de exclusão da nigrosina;
- A amostra FMF induz brando e temporário processo inflamatório, como verificado pela análise citométrica nas células de sangue periférico;
- A amostra FMF apresenta baixa citotoxicidade nas células da medula óssea, como verificado pelo teste de micronúcleo;
- Este teste também revela que a amostra FMF, em ambas as concentrações, não apresenta genotoxicidade nas células da medula óssea;
- As nanopartículas da amostra FMF aglomeram nos tecidos investigados, pulmão, fígado e baço;
- Ainda que suas nanopartículas tenham formado aglomerados, a amostra FMF, nas duas concentrações, não ocasiona alterações morfológicas severas no período de sete dias;
- Nos pulmões a amostra FMF induziu espessamento nas paredes dos septos alveolares;
- A toxicidade induzida pela amostra FMF é tempo e dose dependente;
- A afinidade na distribuição do FMF possibilita seu emprego em tratamentos órgão-específico;
- A amostra FMF apresenta biocompatibilidade adequada e, assim, potencial para uso no processo de magnetotermocitólise e sistemas entregadores de drogas.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

AKTAS, M.; DE JONG, D.; NUYTENS, J. J.; ZEE, J. V. D.; WIELHEESEN, D. H. M.; BATMAN, E.; BURGER, C. W.; ANSINK, A. C. Concomitant radiotherapy and hyperthermia for primary carcinoma of the vagina: A cohort study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 2006.

ATAMAN-ÖNAL, Y.; MUNIER, S.; GANÉE, A.; TERRAT, C.; DURAND, P.; BATTAIL, N.; MARTINON, F.; LE GRAND, R.; CHARLES, M.; DELAIR, T.; VERRIEER, B. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. **Journal of Controlled Release**. v. 112, p. 175-185, 2006.

BAHADUR, D.; GIRI, J. Biomaterials and magnetism. **Sādhanā**. v. 28, p. 639-656, 2003.

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

BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 13, p.198-206, 2003.

BONASSI, S.; CEPPI, M.; FONTANA, V.; MERLO, F. Multiple regression analysis of cytogenetic human data. **Mutation Research**. v. 313, p. 69-80, 1994.

BRETCANUA, O.; VERNÉ, E.; CÖISSON, M.; TIBERTO, P.; ALLIAC, P. Magnetic properties of the ferrimagnetic glass-ceramics for hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 305, p. 529–533, 2006.

BYSTRZEJEWSKI, M.; HUCZKO, A.; LANGE, H. Arc plasma route to carbon-encapsulated magnetic nanoparticles for biomedical applications. **Sensors and Actuators**. v. 109, p. 81-85, 2005.

CHATTERJEE, J.; BETTGE, M.; HAIK, Y.; CHEN, C. J. Synthesis and characterization of polymer encapsulated Cu–Ni magnetic nanoparticles for hyperthermia applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 293, p. 303–309, 2005.

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

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

CRUZ, A. D.; MCARTHUR, A. G.; SILVA, C. C.; CURADO, M. P.; GLICKMAN, B. W. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking and cesium – 137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. **Mutation Research**. v. 313, p. 57-68, 1994.

DEGER, S.; BOEHMER, D.; TÜRK, I.; ROIGAS, J.; BUDACH, V.; LOENING, S. A.; Interstitial hyperthermia using self-regulating thermoseeds combined with conformal radiation therapy. **European Urology**. v. 42, p. 147-153, 2002.

DIAZ, S.; FONSECA, G.; FERNANDES, I. Analysis of lymphocyte and oral mucosa cell micronuclei in Cuban paint industry workers. **Hereditas**. v. 113, p. 77-80, 1990.

DOUARD, V.; HERMIER, V.; BLESBOIS, E. Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. **Biology of Reproduction**. v. 63, p. 1450-1456, 2000.

EMERICH, D. F.; THANOS, G. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. **Biomolecular Engineering**. v. 23, p. 171-184, 2006.

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

EVANS, H. J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test a personal view. **Mutation Research**, v. 392, p. 5-10, 1997.

FILHO, A. M. B.; FERREIRA, L. O. C. Alterações hematológicas e gravidez. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.24, n.1, 2002.

FORTINA, P.; KRICKA, L. J.; SURREY, S.; GRODZINSKI, P.; Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. **Trends in Biotechnology**. v.23, n.4, 2005.

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

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

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

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

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

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas Colorido de Histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora, 2002.

GAY, R. M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; TELEONE, M.; NETO, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese – métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: SBG, p. 91-96, 1991.

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

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

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

HOLMSTROM, M. Sex differences in the micronucleus test: true or false. **Mutagenesis**. v. 3, p. 177-118, 1988.

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

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

ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 100, n. 1, p. 1-11, 2005.

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

KÜCKELHAUS, S. A. S.; GARCIA, V. A. P.; LACAVAL, L. M.; AZEVEDO, R. B.; LACAVAL, Z. G. M.; SILVA, O.; LIMA, E. C. D.; FIGUEIREDO, F.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C. Biological investigation of a citrate – coated cobalt – ferrite – based magnetic fluid. **Journal of applied physics**. v. 93, p. 6707-6708, 2003.

LACAVAL, L. M.; LACAVAL, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; CHAVES, S. B.; GARCIA, V. A. P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid

intravenously administered in mice. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 252, p. 367-369, 2002.

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

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

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

LACAVA, Z. G. M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. The use of magnetic nanoparticles in drug delivery systems: nanoparticles interactions with cells. *In press*, 2007

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

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

LACAVA, Z. G. M. Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. In **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006.

LAMMERS, T.; PESCHKE, P.; KÜHLEIN, R.; SUBR, V.; ULBRICH, K.; DEBUS, J.; HUBER, P.; HENNINK, W.; STORM, G. Effect of radiotherapy and hyperthermia on the tumor accumulation of HPMA copolymer-based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**. 2006, doi: 10.1016/j.jconrel.2006.10.032

LEE, C. W.; HUANG, K. T.; WEI, P. K.; YAO, Y.D. Conjugation of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with single strand oligonucleotides. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 304, p. 412-414, 2006.

LINDSAY, S. BROSNAHAN, D.; LOWERY JR, T. J.; CRAWFORD, K.; WATT, G. D. Kinetic studies of iron deposition in horse spleen ferritin using O<sub>2</sub> as oxidant. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1621, p. 57-66, 2003.

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

MA, M.; WU, Y.; ZHOU, J.; SUN, Y.; ZHANG, Y.; GU, N. Size dependence of specific power absorption of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles in AC magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 268, p. 33-39, 2004.

MEDEIROS, E. S.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. Nanotecnologia. In **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociência e nanotecnologia. In **Parceiras Estratégicas. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**. n. 18, Brasília: CGEE, 2004.

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

MORAIS, P. C.; SKEFF NETO, K.; GRAVINA, P. P.; FIGUEIREDO, L. C.; DA SILVA, M. F.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; SILVA, L. P.; DE CUYPER, M. Birefringence and transmission electron microscopy of monolayer and bilayer magnetoliposomes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 252, p. 418-420, 2002.

NISHI, Y.; HASEGAWA, M. M.; OHKAWA, Y.; INUI, N.; **Cancer Research**. V. 46, p. 3341, 1986.

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

RAPPAPORT, S. I. **Introdução à hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1990.

RAU, B.; WUST, P.; TILLY, W.; GELLERMANN J.; HARDER, C.; RIESS H.; BUDACH, V.; FELIX, R.; SCHLAG, P. M. Preoperative radiochemotherapy in locally advanced or recurrent rectal cancer: regional radiofrequency hyperthermia correlates with clinical parameters. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**. v. 48, n. 2, p. 381-391, 2000.

RHEINLÄNDER, T.; KÖTITZ, R.; WEITSCHIES, W.; SEMMLER, W. Magnetic fractionation of magnetic fluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 219, p. 219-228, 2000.

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

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

SADEGHIANI, N.; BARBOSA, L. S.; SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface-coated with polyaspartic acid. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 266-468, 2005.

SANTANA, J. F. B.; SOLERA, M. A. G.; DA SILVA, S. W., GUEDES, M. H.; LACAVAL, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. Investigation of the interaction between magnetic nanoparticles surface-coated with carboxymethyl dextran and blood cells using Raman spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 289, p. 452-454, 2005.

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

SILVEIRA L. B. **Estudos de propriedades magnéticas de fluidos e nanocompósitos magnéticos biocompatíveis**. Tese de Doutorado em Física, UnB - Universidade de Brasília, 2006.

SONVICO, F.; MORNET, S.; VASSEUR, S.; DUBERNET, C.; JAILLARD, D.; DEGROUARD, J.; HOEBEKE, J.; DUGUET, E.; COLOMBO, P.; COUVREUR, P. Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro. **Experiments Bioconjugate Chemistry**. v. 16, p. 1181-1188, 2005.

STAUFFER, P. R. Evolving technology for thermal therapy of cancer. **International Journal of Hyperthermia**. v. 21, n. 8, p. 731-744, 2005.

SUZUKI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T.; WAKABAYASHI, T.; YOSHIDA, J.; TAKAHASHI, M. Development of a target-directed magnetic resonance contrast agent using monoclonal antibody-conjugated magnetic particles. **Brain Tumor Pathology**. v. 13, p. 127-132, 1996.

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

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

VASANTHAN, A.; MITSUMORI, M.; PARK, J. H.; ZHI-FAN, Z.; YU-BIN, Z.; OLIYNYCHENKO, P.; TATSUZAKI, H.; TANAKA, Y.; HIRAOKA, M. Regional hyperthermia combined with radiotherapy for uterine cervical cancers: a multi-institutional prospective randomized trial of the international atomic energy agency. **Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**. v. 61, n. 1, p. 145-153, 2005.

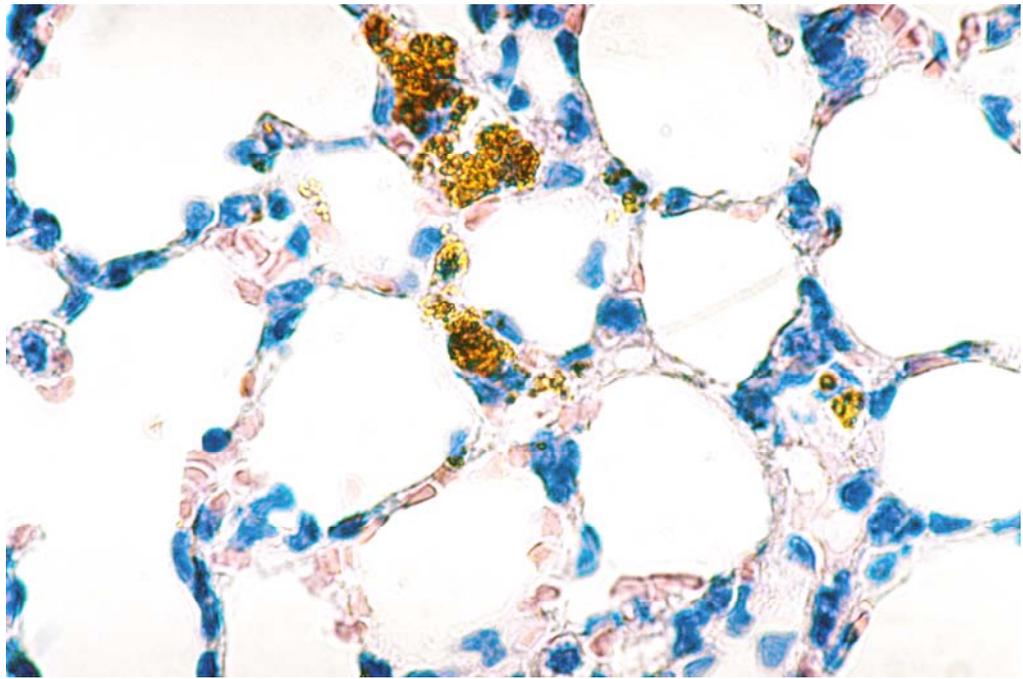
VASSEURA, S.; DUGUETA, E.; PORTIERA, J.; GOGLIOA, G.; MORNETA, S.; HADOVÁ, E.; KNÍŽEK, K.; MARYŠKO, M.; VEVERKAB, P.; POLLERTB, E. Lanthanum manganese perovskite nanoparticles as possible in vivo mediators for magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 302, p. 315-320, 2006.

ZEE, J. V. D.; GONZÁLEZ, D. G.; RHOON, G. C. V.; DIJK, J. D. P. V.; PUTTEN, W. L. J. V.; HART, A. A. M. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia

in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. **The Lancet**. v. 355, p. 1119-1125, 2000.

WIDDER, K. J.; SENYEL, A. E.; SCARPELLI, D. G. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 58, p. 141, 1978.

WILL, O.; PURKAYASTHA, S.; CHAN, C.; ATHANASIOU, T.; DARZI, A. W.; GEDROYC, W.; TEKKIS, P. P. Diagnostic precision of nanoparticle-enhanced MRI for lymph-node metastases: a meta-analysis. **Lancet Oncology** v. 7, p. 52-60, 2005.



**ANEXOS**

**Anexo 1** – Efeito da administração intraperitoneal de FMF-1 e FMF-2 sobre a viabilidade das células peritoneais.

<b>Grupos FMF-1</b>	<b>N° de células vivas (NCV)</b>	<b>NCV1 = (NCV / 4) x 5</b>	<b>NCV 2 = NCV 1 x 10.000</b>	<b>Grupos FMF-2</b>	<b>N° de células vivas (NCV)</b>	<b>NCV1 = (NCV / 4) x 5</b>	<b>NCV 2 = NCV 1 x 10.000</b>
C	571	713,75	7137500	C	571	713,75	7137500
C	755	943,75	9437500	C	755	943,75	9437500
C	690	862,50	8625000	C	690	862,50	8625000
C	699	873,75	8737500	C	699	873,75	8737500
C	668	835,00	8350000	C	668	835,00	8350000
Média	676,60	845,75	8457500,00	Média	676,60	845,75	8457500,00
DP	67,18	83,98	839763,73	DP	67,18	83,98	839763,73
30min	633	791,25	7912500	30min	707	883,75	8837500
30min	462	577,50	5775000	30min	445	556,25	5562500
30min	333	416,25	4162500	30min	774	967,50	9675000
30min	298	372,50	3725000	30min	451	563,75	5637500
30min	431	538,75	5387500	30min	463	578,75	5787500
Média	431,40	539,25	5392500,00	Média	568,00	710,00	7100000,00
DP	131,39	164,24	1642421,04	DP	159,37	199,22	1992172,18
6h	594	742,50	7425000	6h	546	682,50	6825000
6h	444	555,00	5550000	6h	715	893,75	8937500
6h	411	513,75	5137500	6h	855	1068,75	10687500
6h	685	856,25	8562500	6h	606	757,50	7575000
6h	532	665,00	6650000	6h	686	857,50	8575000
Média	533,20	666,50	6665000,00	Média	681,60	852,00	8520000,00
DP	111,39	139,24	1392373,20	DP	117,59	146,98	1469816,10
24h	649	811,25	8112500	24h	972	1215,00	12150000
24h	642	802,50	8025000	24h	926	1157,50	11575000
24h	619	773,75	7737500	24h	582	727,50	7275000
24h	590	737,50	7375000	24h	1025	1281,25	12812500
24h	698	872,50	8725000	24h	928	1160,00	11600000
Média	639,60	799,50	7995000,00	Média	886,60	1108,25	11082500,00
DP	39,97	49,96	499577,95	DP	175,00	218,75	2187457,14
48h	661	826,25	8262500	48h	589	736,25	7362500
48h	425	531,25	5312500	48h	901	1126,25	11262500
48h	406	507,50	5075000	48h	1077	1346,25	13462500
48h	570	712,50	7125000	48h	590	737,50	7375000
48h	395	493,75	4937500	48h	696	870,00	8700000
Média	491,40	614,25	6142500,00	Média	770,60	963,25	9632500,00
DP	118,26	147,82	1478190,41	DP	213,33	266,67	2666672,20
7d	608	760,00	7600000	7d	591	738,75	7387500
7d	801	1001,25	10012500	7d	540	675,00	6750000
7d	522	652,50	6525000	7d	756	945,00	9450000
7d	500	625,00	6250000	7d	743	928,75	9287500
7d	470	587,50	5875000	7d	743	928,75	9287500
Média	580,20	725,25	7252500,00	Média	674,60	843,25	8432500,00
DP	133,69	167,11	1671086,85	DP	101,35	126,69	1266904,45

**Anexo 2** – Resultados do cálculo estatístico da administração intraperitoneal de FMF-1 e FMF-2 sobre a viabilidade das células peritoneais.

**Scheffe for Column 1.2**

**Effect: Column 1**

**Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
Controle, 30' 50 mic	,209	,264	,2664
Controle, 6h 50 mic	,109	,264	,9606
Controle, 24h 50 mic	,023	,264	>,9999
Controle, 48h 50 mic	,147	,264	,7771
Controle, 7 dias 50 mic	,073	,264	,9982
Controle, 30' 100 mic	,087	,264	,9925
Controle, 6h 100 mic	8,485E-5	,264	>,9999
Controle, 24h 100 mic	-,111	,264	,9561
Controle, 48h 100 mic	-,046	,264	>,9999
Controle, 7 dias 100 mic	,004	,264	>,9999

**Anexo 3 – Efeitos citotóxicos da administração endovenosa de FMF-1 e FMF-2.**

30min FMF1	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	236	0	27	471	2	12390,00	0,00	669,06	11671,38	49,56
2	236	4	74	421	1	12390,00	99,12	1833,72	10432,38	24,78
3	162	3	86	406	5	8505,00	51,03	1462,86	6906,06	85,05
4	139	6	104	386	4	7297,50	87,57	1517,88	5633,67	58,38
5	72	1	84	413	2	3780,00	7,56	635,04	3122,28	15,12
Média	169,00	2,80	75,00	419,40	2,80	8872,50	49,06	1223,71	7553,15	46,58
D.P.						3650,17	45,06	540,83	3499,48	27,81
E.P.						1,64	20,21	242,53	1569,27	12,47

30min FMF2	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	152	2	165	330	3	7980,00	31,92	2633,40	5266,80	47,88
2	105	2	55	441	2	5512,50	22,05	606,38	4862,03	22,05
3	178	2	162	334	2	9345,00	37,38	3027,78	6242,46	37,38
4	249	3	70	426	1	13072,50	78,44	1830,15	11137,77	26,15
5	165	3	265	228	4	8662,50	51,98	4591,13	3950,10	69,30
Média	169,80	2,40	143,40	351,80	2,40	8914,50	44,35	2537,77	6291,83	40,55
D.P.						2737,91	21,91	1474,49	2831,27	18,97
E.P.						1,23	9,83	661,21	1269,63	8,51

6 h FMF1	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	100	4	144	348	4	5250,00	42,00	1512,00	3654,00	42,00
2	148	2	177	315	6	7770,00	31,08	2750,58	4895,10	93,24
3	142	0	311	187	2	7455,00	0,00	4637,01	2788,17	29,82
4	114	0	99	399	2	5985,00	0,00	1185,03	4776,03	23,94
5	75	1	132	365	2	3937,50	7,88	1039,50	2874,38	15,75
Média	115,80	1,40	172,60	322,80	3,20	6079,50	16,19	2224,82	3797,54	40,95
D.P.						1583,90	19,24	1507,43	1006,70	30,76
E.P.						0,71	8,63	675,98	451,43	13,79

6 h FMF2	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	119	1	120	376	3	6247,50	12,50	1499,40	4698,12	37,49
2	227	0	163	330	7	11917,50	0,00	3885,11	7865,55	166,85
3	96	2	221	276	1	5040,00	20,16	2227,68	2782,08	10,08
4	134	7	123	368	2	7035,00	98,49	1730,61	5177,76	28,14
5	60	3	151	343	3	3150,00	18,90	951,30	2160,90	18,90
Média	127,20	2,60	155,60	338,60	3,20	6678,00	30,01	2058,82	4536,88	52,29
D.P.						3274,71	39,11	1119,27	2249,52	64,85
E.P.						1,47	17,54	501,92	1008,75	29,08

12 h FMF1	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	176	0	111	386	3	9240,00	0,00	2051,28	7133,28	55,44
2	149	1	144	350	5	7822,50	15,65	2252,88	5475,75	78,23
3	106	2	67	428	3	5565,00	22,26	745,71	4763,64	33,39
4	230	7	79	412	2	12075,00	169,05	1907,85	9949,80	48,30
5	232	6	117	376	1	12180,00	146,16	2850,12	9159,36	24,36
Média	178,60	3,20	103,60	390,40	2,80	9376,50	70,62	1961,57	7296,37	47,94
D.P.						2832,96	80,22	768,71	2250,97	20,86
E.P.						1,27	35,97	344,71	1009,40	9,36

12 h FMF2	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	200	4	108	382	6	10500,00	84,00	2268,00	8022,00	126,00
2	95	3	118	373	6	4987,50	29,93	1177,05	3720,68	59,85
3	73	3	159	337	1	3832,50	23,00	1218,74	2583,11	7,67
4	58	6	182	311	1	3045,00	36,54	1108,38	1893,99	6,09
5	42	11	140	344	5	2205,00	48,51	617,40	1517,04	22,05
Média	93,60	5,40	141,40	349,40	3,80	4914,00	44,39	1277,91	3547,36	44,33
D.P.						3286,73	24,05	603,94	2638,09	50,53
E.P.						1,47	10,79	270,82	1183,00	22,66

24 h FMF1	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	171	7	94	396	3	8977,50	125,69	1687,77	7110,18	53,87
2	133	9	77	412	2	6982,50	125,69	1075,31	5753,58	27,93
3	251	4	48	441	7	13177,50	105,42	1265,04	11622,56	184,49
4	81	9	82	405	4	4252,50	76,55	697,41	3444,53	34,02
5	158	12	69	413	6	8295,00	199,08	1144,71	6851,67	99,54
Média	158,80	8,20	74,00	413,40	4,40	8337,00	126,48	1174,05	6956,50	79,97
D.P.						3254,24	45,30	357,07	2982,77	64,82
E.P.						1,46	20,31	160,12	1337,56	29,07

24 h FMF2	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	59	8	61	424	7	3097,50	49,56	377,90	2626,68	43,37
2	114	3	93	394	10	5985,00	35,91	1113,21	4716,18	119,70
3	134	15	105	379	1	7035,00	211,05	1477,35	5332,53	14,07
4	162	10	105	381	4	8505,00	170,10	1786,05	6480,81	68,04
5	88	4	74	418	4	4620,00	36,96	683,76	3862,32	36,96
Média	111,40	8,00	87,60	399,20	5,20	5848,50	100,72	1087,65	4603,70	56,43
D.P.						2095,27	83,47	571,66	1459,93	40,26
E.P.						0,94	37,43	256,35	654,68	18,05

48 h FMF1	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	167	3	50	442	5	8767,50	52,61	876,75	7750,47	87,68
2	126	10	71	413	6	6615,00	132,30	939,33	5463,99	79,38
3	177	3	58	435	4	9292,50	55,76	1077,93	8084,48	74,34
4	121	4	43	452	1	6352,50	50,82	546,32	5742,66	12,71
5	195	6	52	438	4	10237,50	122,85	1064,70	8968,05	81,90
Média	157,20	5,20	54,80	436,00	4,00	8253,00	82,87	901,01	7201,93	67,20
D.P.						1701,36	40,99	215,62	1528,80	30,84
E.P.						0,76	18,38	96,69	685,56	13,83

48 h FMF2	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	133	9	83	405	3	6982,50	125,69	1159,10	5655,83	41,90
2	82	2	65	429	4	4305,00	17,22	559,65	3693,69	34,44
3	138	2	35	457	6	7245,00	28,98	507,15	6621,93	86,94
4	126	9	67	422	2	6615,00	119,07	886,41	5583,06	26,46
5	88	14	66	418	2	4620,00	129,36	609,84	3862,32	18,48
Média	113,40	7,20	63,20	426,20	3,40	5953,50	84,06	744,43	5083,37	41,64
D.P.						1383,85	55,93	274,16	1261,62	26,79
E.P.						0,62	25,08	122,94	565,75	12,01

7 d FMF1	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	175	1	42	451	6	9187,50	18,38	771,75	8287,13	110,25
2	94	0	76	421	3	4935,00	0,00	750,12	4155,27	29,61
3	206	1	71	426	2	10815,00	21,63	1535,73	9214,38	43,26
4	130	0	93	402	5	6825,00	0,00	1269,45	5487,30	68,25
5	101	1	142	353	4	5302,50	10,61	1505,91	3743,57	42,42
Média	141,20	0,60	84,80	410,60	4,00	7413,00	10,12	1166,59	6177,53	58,76
D.P.						2532,93	10,07	384,49	2457,79	32,01
E.P.						1,14	4,52	172,42	1102,15	14,35

7 d FMF2	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
1	249	5	117	374	4	13072,50	130,73	3058,97	9778,23	104,58
2	87	2	52	437	9	4567,50	18,27	475,02	3992,00	82,22
3	98	1	80	411	8	5145,00	10,29	823,20	4229,19	82,32
4	62	6	98	392	4	3255,00	39,06	637,98	2551,92	26,04
5	94	3	121	370	6	4935,00	29,61	1194,27	3651,90	59,22
Média	118,00	3,40	93,60	396,80	6,20	6195,00	45,59	1237,89	4840,65	70,88
D.P.						3914,16	48,83	1052,62	2833,96	29,76
E.P.						1,76	21,90	472,03	1270,83	13,34

Controle	GL	Eos	Neut.	Linf	Mon	GL	Eos.	Neut.	Linf.	Mon.
----------	----	-----	-------	------	-----	----	------	-------	-------	------

1	228	4	50	442	4	11970,00	95,76	1197,00	10581,48	95,76
2	224	0	24	474	2	11760,00	0,00	564,48	11148,48	47,04
3	157	4	45	449	2	8242,50	65,94	741,83	7401,77	32,97
4	188	0	27	471	2	9870,00	0,00	532,98	9297,54	39,48
5	107	3	73	422	2	5617,50	33,71	820,16	4741,17	22,47
Média	180,80	2,20	43,80	451,60	2,40	9492,00	39,08	771,29	8634,09	47,54
D.P.						2645,76	41,89	266,48	2609,03	28,42
E.P.						1,19	18,78	119,50	1169,97	12,75

**Anexo 4 – Resultado do cálculo estatístico dos efeitos citotóxicos da administração de FMF-1 e FMF-2.**

**Contagem Global de Leucócitos**

Fisher's PLSD for Column 1.2  
Effect: Column 1  
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
controle, 30' 50 mic	619,500	3544,565	,7272
controle, 6h 50 mic	3412,500	3544,565	,0588
controle, 12h 50 mic	115,500	3544,565	,9481
controle, 24h 50 mic	1155,000	3544,565	,5161
controle, 48h 50 mic	1239,000	3544,565	,4862
controle, 7d 50 mic	2079,000	3544,565	,2446
controle, 30' 100 mic	577,500	3544,565	,7450
controle, 6h 100 mic	2814,000	3544,565	,1172
controle, 12h 100 mic	4578,000	3544,565	,0124
controle, 24h 100 mic	3643,500	3544,565	,0442
controle, 48h 100 mic	3538,500	3544,565	,0504
controle, 7d 100 mic	3297,000	3544,565	,0676

**Linfócitos**

Fisher's PLSD for Column 1.2  
Effect: Column 1  
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
controle, 30' 50 mic	1080,933	3031,992	,4776
controle, 6h 50 mic	4836,552	3031,992	,0023
controle, 12h 50 mic	1337,721	3031,992	,3801
controle, 24h 50 mic	1677,585	3031,992	,2720
controle, 48h 50 mic	1432,158	3031,992	,3476
controle, 7d 50 mic	2456,559	3031,992	,1100
controle, 30' 100 mic	2342,256	3031,992	,1272
controle, 6h 100 mic	4097,205	3031,992	,0091
controle, 12h 100 mic	5086,725	3031,992	,0014
controle, 24h 100 mic	4030,383	3031,992	,0102
controle, 48h 100 mic	3550,722	3031,992	,0226
controle, 7d 100 mic	3793,440	3031,992	,0152

**Neutrófilos**

Fisher's PLSD for Column 1.2  
Effect: Column 1  
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
controle, 30' 50 mic	-452,424	1047,143	,3899
controle, 6h 50 mic	-1453,536	1047,143	,0074
controle, 12h 50 mic	-1190,280	1047,143	,0267
controle, 24h 50 mic	-402,759	1047,143	,4437
controle, 48h 50 mic	-129,717	1047,143	,8047
controle, 7d 50 mic	-395,304	1047,143	,4522
controle, 30' 100 mic	-1766,478	1047,143	,0014
controle, 6h 100 mic	-1287,531	1047,143	,0169
controle, 12h 100 mic	-506,625	1047,143	,3361
controle, 24h 100 mic	-316,365	1047,143	,5470
controle, 48h 100 mic	26,859	1047,143	,9591
controle, 7d 100 mic	-466,600	1047,143	,3754

**Eosinófilos**

Fisher's PLSD for Column 1.2  
Effect: Column 1  
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
controle, 30' 50 mic	-9,975	60,449	,7419
controle, 6h 50 mic	22,890	60,449	,4508
controle, 12h 50 mic	-31,542	60,449	,2999
controle, 24h 50 mic	-87,402	60,449	,0054
controle, 48h 50 mic	-43,785	60,449	,1521
controle, 7d 50 mic	28,959	60,449	,3408
controle, 30' 100 mic	-5,271	60,449	,8618
controle, 6h 100 mic	9,072	60,449	,7645
controle, 12h 100 mic	-5,313	60,449	,8607
controle, 24h 100 mic	-61,635	60,449	,0458
controle, 48h 100 mic	-44,982	60,449	,1414
controle, 7d 100 mic	-6,511	60,449	,8297

**Monócitos**

Fisher's PLSD for Column 1.2  
Effect: Column 1  
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
controle, 30' 50 mic	,966	49,130	,9687
controle, 6h 50 mic	6,594	49,130	,7887
controle, 12h 50 mic	-,399	49,130	,9671
controle, 24h 50 mic	-32,424	49,130	,1912
controle, 48h 50 mic	-19,656	49,130	,4257
controle, 7d 50 mic	-11,214	49,130	,6488
controle, 30' 100 mic	6,993	49,130	,7763
controle, 6h 100 mic	-4,746	49,130	,8471
controle, 12h 100 mic	3,213	49,130	,8961
controle, 24h 100 mic	-8,883	49,130	,7182
controle, 48h 100 mic	5,901	49,130	,8105
controle, 7d 100 mic	-23,331	49,130	,3450

**Anexo 5** – Efeitos genotóxicos da administração endovenosa de FMF-1 e FMF-2.

	<b>MN/NCE</b>	<b>NCE</b>	<b>MN/PCE</b>	<b>PCE</b>	<b>PCE%</b>
CP	1	1586	19	2000	55,8
CP	0	1729	20	2000	53,6
CP	0	2000	18	1891	48,6
CP	1	2000	19	1168	36,9
CP	1	2000	20	1974	49,7
CN	2	1783	6	2000	52,9
CN	1	1733	4	2000	53,6
CN	4	1501	6	2000	57,1
CN	2	1706	6	2000	54,0
CN	0	2000	4	1561	43,8
24h 50mic	3	2000	6	1370	40,7
24h 50mic	3	2000	6	1840	47,9
24h 50mic	4	2000	6	1492	42,7
24h 50mic	2	2000	3	1439	41,8
24h 50mic	3	2000	4	1401	41,2
48h 50mic	3	2000	4	1255	38,6
48h 50mic	3	1864	6	2000	51,8
48h 50mic	1	2000	6	1543	43,6
48h 50mic	3	2000	4	1741	46,5
48h 50mic	0	2000	3	1788	47,2
7d 50mic	2	2000	2	1981	49,8
7d 50mic	4	2000	6	1735	46,5
7d 50mic	6	2000	5	1900	48,7
7d 50mic	2	1973	5	1982	50,1
7d 50mic	1	1719	2	2000	53,8
24h 100 mi	6	2000	6	1136	36,2
24h 100 mi	3	2000	6	1169	36,9
24h 100 mi	3	2000	2	1450	42,0
24h 100 mi	6	2000	6	1662	45,4
24h 100 mi	2	2000	5	1843	48,0
48h 100 mi	3	1971	3	1926	49,4
48h 100 mi	3	2000	4	1791	47,2
48h 100 mi	5	2000	3	1415	41,4
48h 100 mi	2	2000	5	1705	46,0
48h 100 mi	6	1908	5	2000	51,2
7d 100 mi	2	2000	6	1310	39,6
7d 100 mi	2	2000	6	1575	44,1
7d 100 mi	2	2000	4	1327	39,9
7d 100 mi	2	2000	4	1855	48,1
7d 100 mi	2	2000	4	1646	45,1

**Anexo 6** – Resultados do cálculo estatístico dos efeitos genotóxicos da administração endovenosa de FMF-1 e FMF-2.

Mann-Whitney U Test (new.sta)

By variable VAR1

	<b>Grupo 1: CN</b>		<b>Grupo 2: 24h FMF-1</b>		U	Z	p-level	Z	
	Rank Sum	Rank Sum	Group 1	Group 2				adjusted	p-level
	Group 1	Group 2							
<b>MN/ NCE</b>	20,5	34,5	5,5	-1,46225	0,143682	-1,50384	0,132632		
<b>MN/ PCE</b>	28,5	26,5	11,5	0,208893	0,834533	0,239046	0,811072		
<b>PCE%</b>	39	16	1	2,402272	0,016299	2,402272	<b>0,016299</b>		

Mann-Whitney U Test (new.sta)

By variable VAR1

	<b>Grupo 1: CN</b>		<b>Grupo 2: 48h FMF-1</b>		U	Z	p-level	Z	
	Rank Sum	Rank Sum	Group 1	Group 2				adjusted	p-level
	Group 1	Group 2							
<b>MN/ NCE</b>	26	29	11	-0,31334	0,754025	-0,32021	0,748815		
<b>MN/ PCE</b>	31	24	9	0,731126	0,464707	0,80829	0,418929		
<b>PCE%</b>	37	18	3	1,984485	0,04721	1,984485	<b>0,04721</b>		

Mann-Whitney U Test (new.sta)

By variable VAR1

	<b>Grupo 1: CN</b>		<b>Grupo 2: 7d FMF-1</b>		U	Z	p-level	Z	
	Rank Sum	Rank Sum	Group 1	Group 2				adjusted	p-level
	Group 1	Group 2							
<b>MN/ NCE</b>	23	32	8	-0,94002	0,347215	-0,97619	0,328979		
<b>MN/ PCE</b>	32,5	22,5	7,5	1,044466	0,296278	1,088214	0,276509		
<b>PCE%</b>	33	22	7	1,148913	0,250601	1,148913	0,250601		

Mann-Whitney U Test (new.sta)

By variable VAR1

	<b>Grupo 1: CN</b>		<b>Grupo 2: 24h FMF-2</b>		U	Z	p-level	Z	
	Rank Sum	Rank Sum	Group 1	Group 2				adjusted	p-level
	Group 1	Group 2							
<b>MN/ NCE</b>	19	36	4	-1,77559	0,07581	-1,80878	0,070494		
<b>MN/ PCE</b>	27,5	27,5	12,5	0	1	0	1		
<b>PCE%</b>	38	17	2	2,193378	0,028287	2,193378	<b>0,028287</b>		

Mann-Whitney U Test (new.sta)

By variable VAR1

	<b>Grupo 1: CN</b>		<b>Grupo 2: 48h FMF-2</b>		U	Z	p-level	Z	
	Rank Sum	Rank Sum	Group 1	Group 2				adjusted	p-level
	Group 1	Group 2							

<b>MN/ NCE</b>	19	36	4	-1,77559	0,07581	-1,80312	0,071378
<b>MN/ PCE</b>	35	20	5	1,566699	0,117195	1,616448	0,106007
<b>PCE%</b>	36	19	4	1,775592	0,07581	1,775592	0,07581

Mann-Whitney U Test (new.sta)

By variable VAR1

**Grupo 1: CN**                      **Grupo 2: 7d FMF-2**

	Rank Sum	Rank Sum				Z	
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level
<b>MN/ NCE</b>	25	30	10	-0,52223	0,601512	-0,64253	0,520534
<b>MN/ PCE</b>	30	25	10	0,522233	0,601512	0,6	0,54851
<b>PCE%</b>	37	18	3	1,984485	0,04721	1,984485	<b>0,04721</b>