



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**POLÍMEROS DE ALBUMINA MAGNÉTICOS EM
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
CAMUNDONGOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA E
ULTRA-ESTRUTURAL**

DÉBORA DE OLIVEIRA CINTRA E SILVA

BRASÍLIA – DF
2008

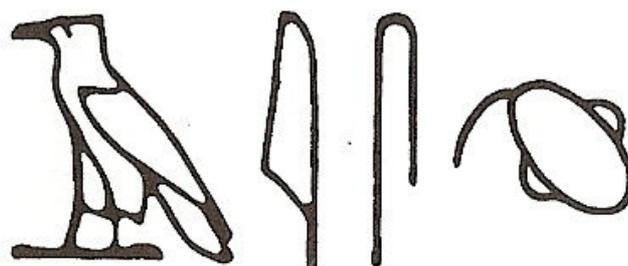
DÉBORA DE OLIVEIRA CINTRA E SILVA

**POLÍMEROS DE ALBUMINA MAGNÉTICOS EM
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
CAMUNDONGOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA E
ULTRA-ESTRUTURAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, para obtenção do Grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Brasília – DF
Fevereiro - 2008



Palavra **ENCÉFALO** de um papiro egípcio. Primeiro registro humano de que se tem notícia do cérebro. Neste documento há a descrição de sintomas, diagnósticos e prognósticos de dois pacientes com fraturas de crânio.

De James Henry Breasted, 1930.

“...são as misteriosas borboletas da alma, cujo bater de asas poderá algum dia – quem sabe? – esclarecer os segredos da vida mental.”

Citação de Santiago Ramón y Cajal, sobre os neurônios. Anatomista espanhol, que há cem anos descobriu as células nervosas, enunciando a teoria neuronal. Ganhou o Prêmio Nobel de Medicina e é o Pai da Neurociência Moderna.

DEDICATÓRIA

Para meus pais Marcos e Maria Filomena,
meus irmãos Filomena, Davi, Daniel, Dulce,
Marcos, Moisés,
nossos cachorros Branca, Rickson (*in memoriam*) e
Cindy....e todos os animais sacrificados em prol da
ciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter começado tudo...

À Professora Sônia Nair Bão pela oportunidade, orientação e apoio nestes dois anos.

À Professora Zulmira Guerrero Lacava por ter me aceitado no grupo CNANO e pelas conversas interessantes.

Aos responsáveis pela amostra de PAM (A.Cláudio Tedesco, Andrezza Simioni, Paulo César Morais e Bruno Lacava)

Aos Professores César Grisólia, Nazaré Klautau e todos aqueles que participaram do I Curso de Especialização em Genética Humana, cuja experiência iniciou meu contato com o meio científico. Ao Professor Ricardo Bentes por ter cedido o Laboratório de Morfologia.

A todos dos Laboratórios de Microscopia Eletrônica e Virologia (Suzi, Marcella, Khesller, Mysléia, Shélida, João Victor, Gláucia, Virgínia), Laboratório de Genética (Lane, Neda, Dani, Mary-Ann, Júlia, Flávia, Adriana, Elisa), Laboratório de Morfologia (Carol, Camila, Sacha) e aqueles que não foram mencionados.

À Luciana Landim Carneiro Estevanato pela parceria e divisão das amostras e camundongos.

Aos professores do Programa de Biologia Molecular pelos ensinamentos;

Aos professores das Bancas Examinadoras da Qualificação (Zulmira Guerrero Lacava, Andréia Q.Maranhão, Ildinete S. Pereira e Lídia M.P. de Moraes), e da defesa do Mestrado (Zulmira Guerrero Lacava, Paulo César Moraes, Ricardo Bentes Azevedo);

Às agências financiadoras FAP-DF, FINATEC, CAPES/MEC, Rede Brasileira de Nanobiomagnetismo, CNPq/MCT e FINEP;

A todos aqueles que conviveram e de alguma forma contribuíram e

Ao Discovery Channel por ter soltado a imaginação.

RESUMO

A grande dificuldade para o entendimento da complexidade que compõe o sistema nervoso (SN) e suas patologias é o desenvolvimento de ferramentas que proporcionem o estudo das peculiaridades moleculares, celulares, fisiológicas, farmacológicas e psíquicas. A nanotecnologia ofereceu uma abordagem alternativa baseada no desenvolvimento de materiais tão pequenos, que a física clássica e a física quântica regem suas características, normalmente não vistas em materiais de escalas maiores. A nanoneurotecnologia, atualmente está focada em desenvolver nanomateriais, capazes de ultrapassar a barreira-hemato encefálica (BHE) sem alterar sua integridade. Nesta dissertação é apresentado um nanomaterial de Polímeros de Albumina Magnéticos (PAM) composto de uma matriz orgânica de albumina bovina associada à nanopartículas de maghemita. Os PAM foram aplicados *in vivo* e avaliada a sua capacidade de biodistribuição no sistema nervoso de camundongos. Este estudo foi todo baseado em análises histológicas e ultra-estruturais dos tecidos tratados, em tempos que variaram de 30 minutos a 30 dias. Previamente os PAM foram caracterizados morfológicamente e definidos os diâmetros modais das amostras utilizadas, que variaram entre 8,9-9,2nm. Em adição, pelas análises microscópicas foram demonstrados que os PAM ultrapassaram a BHE e distribuíram por todos os tipos celulares do SNC, com uma tendência de concentração em regiões de neurópilo. A distribuição de PAM intracelularmente deu-se principalmente em estruturas com membranas lipídicas, entre elas as mitocôndrias e bainhas de mielinas, nas quais apresentaram alterações transitórias até os 2 dias após aplicação. Também foi observada a presença de estruturas incomuns de composição cristalina.

Os resultados apresentados nesta dissertação reforçam a distribuição de PAM baseada em moléculas que participam do metabolismo de ferro no SN e a necessidade de estudos complementares que confirmem a biocompatibilidade e potencial aplicação neuroclínica.

Palavras-chave: Nanotecnologia, nanopartículas magnéticas, sistema nervoso, ultra-estrutura.

ABSTRACT

The great difficulty for the agreement of the complexity that composes the nervous system (NS) and its pathologies is the development of tools to study of molecular, cellular, physiological, pharmacological and psychic peculiarities. The nanotechnology offered a alternative boarding based on the development of so small materials, that the classic physics and quantum physics rules their features, normally not view in materials with bigger scales. The nanoneurotechnology, currently is focus in developing nanomaterials, capable to exceed the blood-brain barrier (BBB) without modifying its integrity. In this study a new Magnetic Albumin Polymer is presented (MAP), made up of a organic matrix of bovine albumin associate to nanoparticles of maghemite. The MAP was applied *in vivo* and evaluated its capacity of biodistribution in the nervous system of mice. This study all it was based on histologicals and ultra-structural analyses of treated tissues, in times that had varied of 30 minutes to 30 days. Previously MAP was characterized in morphological features and defined modal sizes of samples used, that had varied between 8,9-9,2nm. In addition, by the microscopical analyses was demonstrated that the MAP exceeded the BBB and distributed for all the cellular types of the CNS, with a trend of concentration in regions of neuropil. The MAP distribution intracellularly was given mainly in structures with lipids membranes, like mitochondria and myelin sheets, in which had presented transitory alterations until the 2 days after application. Also the presence of uncommon structures of crystalline composition was observed.

The results presented in this study strengthen the distribution of MAP based on molecules that participate on the iron metabolism in the NS and the necessity of complementary studies that confirm the biocompatibility of the sample and potential neuroclinic application.

Keywords: Nanotechnology, magnetic nanoparticles, nervous system, ultra-structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de PAM	22
Figura 2: Absorção Intestinal do ferro não-heme.	14
Figura 3: Esquema Geral do metabolismo de ferro, não-heme e dependente de transferrina.	28
Figura 4: Neurônio com neuromelanina em córtex do cérebro.	29
Figura 5: Córtex do cérebro.	32
Figura 6: Comparação esquemática entre capilares normais (direita) e do cérebro (esquerda).	33
Figura 7: Localização dos órgãos circunventriculares (OCV)	34
Figura 8: Espécie e linhagem de camundongo utilizado na dissertação	40
Figura 9: Esquema das regiões seccionadas do SN de camundongo para a dissertação	40
Figura 10: Amostra 1 - Micrografias em MET das nanopartículas demonstrando a variabilidade de tamanho.	40
Figura 11: Amostra 1 - Micrografias em MET das nanopartículas.	41
Figura 12: Histograma de distribuição dos diâmetros das nanopartículas da amostra 1.	41
Figura 13: Amostra 2 - Fotografias em MET das microesferas,	46
Figura 14: Histograma de distribuição dos diâmetros das microesferas da amostra 2	46
Figura 15: Amostra 2 – Fotografias de MET das nanopartículas.	47

Figura 16: Histograma de distribuição dos diâmetros das nanopartículas da amostra 2	47
Figuras 17 e 18: Hemáceas com pigmento férrico	50
Figuras 19 e 20: Hemáceas com pigmento férrico	51
Figura 21: Células da BHE com pigmento férrico	52
Figura 22: Células Ependimárias com pigmento férrico	53
Figura 23: Células do Plexo Coróide	53
Figura 24: Interstício do Plexo Coróide com Pigmento férrico	53
Figuras 25 e 26: Células da Glia com Pigmento férrico	54
Figura 27: Neurônios com Pigmento férrico	55
Figura 28: Progressão do aparecimento de ferrocianeto férrico no neurópilo do cérebro.	57
Figura 29: Neurópilo com ferrocianeto férrico no cérebro	58
Figura 30: Célula Ependimária e do plexo coróide com ferrocianeto férrico	59
Figura 31: Células da glia com ferrocianeto férrico	61
Figura 32: Neurônios com ferrocianeto férrico	61
Figura 33: PAM em vesículas endocíticas de um prolongamento de monócito no capilar do cerebelo	62
Figura 34: Vesícula Endocítica com PAM em micróglia no diencéfalo, 30 minutos	63
Figura 35: Vesículas Endocíticas com PAM em BHE no diencéfalo, 30 minutos.	63
Figura 36: Vesícula Endocítica com PAM em célula endotelial da BHE, na medula, 30 minutos	64
Figura 37: Corpos multivesiculares com PAM, em células da glia. - Diencéfalo, 30 minutos.	64

Figura 38: Corpos multivesiculares em neurônio do diencéfalo, 6 horas.	65
Figura 39: Peroxissomo ou lisossomo com PAM em células da glia, diencéfalo, 30 minutos.	65
Figura 40: Fusão entre endossomo e lisossomo com PAM, em célula do diencéfalo, 30 minutos	66
Figura 41: Retículo Endoplasmático e membrana nuclear com NM	66
Figura 42: Complexo de Golgi com NM, Cerebelo, 30 dias	67
Figura 43: Mitocôndrias com NM; Córtex frontal	67
Figura 44: Bainha de mielina com PAM	68
Figura 45: Sinapses com PAM, córtex temporal, 6 horas	69
Figura 46: Sinapses com PAM, córtex frontal, 2 dias	69
Figura 47: Fagossomo com PAM em citoplasma de célula do SN	70
Figura 48: Lipofucsina em neurônios com PAM.	70
Figura 49: Cisternas em prolongamentos de neurônio, com PAM, córtex frontal, 2 dias	71
Figura 50: Cisternas em sinapses de neurônio, com PAM, cerebelo, 30 dias	71
Figura 51: Vesículas exocíticas com NM em prolongamentos celulares, diencéfalo, 7 dias	72
Figura 52: Região de exocitose com NM no botão sináptico, liberadas para axônio não mielinizado, córtex frontal, 30 dias	72
Figura 53: Núcleo de célula da glia com PAM concentrado, córtex temporal, 6hs	73
Figura 54: Núcleo de linfócito com PAM, sangue, 2 dias	73
Figura 55: NM de PAM, dispersas no núcleo	74

Figura 56: Núcleo de células da glia com PAM	74
Figura 57: PAM no citoplasma de célula da glia, Diencéfalo, 6 horas	75
Figura 58: PAM no citoplasma de célula da glia, Córtex temporal, 6 horas	76
Figura 59: Hemácias com PAM, Sangue, 2 dias	76
Figura 60: NM isoladas com \cong 100nm de diâmetro, no neurópilo, 30 minutos	77
Figura 61: Cristais em organelas de células do SN no córtex temporal	77
Figuras 62 e 63: Estruturas semelhantes à magnetossomos	78
Figura 64: Estruturas com PAM, em regiões de mitocôndrias	79
Figura 65: Mitocôndria com estrutura alterada circular	79
Figura 66: Estrutura alterada no centro de dendrito.	80
Figura 67: Axônios mielinizados com PAM e alterações nas bainhas de mielina.	80
Figura 68: Axônio sem mielina com PAM na superfície e estrutura alterada no centro	81
Figura 69: Axônio sem mielina e com alterações no centro. Presença de vesícula exocítica em sinapse adjacente.	81
Figura 70: Fotomicrografias em MEV da amostra 1 de PAM	83
Figura 71: Esquema das amostras de PAM	84
Figura 72: Rotas possíveis de internalização de PAM através das células endoteliais da BHE	90
Figura 73: Padrão morfológico de ativação glial.	95
Figura 74: Formação e transporte axonal de ferritinas	97
Figura 75: Ceróide-lipofuscinose no encéfalo de ovino.	98

Figura 76: Importação peroxissomal de complexo de 103 ouro/proteína (HSA-SKL- human serum albumin e C-terminal, serina, lisina e leucina).

Figura 77: Cristais de óxido de ferro no core de uma ferritina. 104

LISTA DE TABELA E GRÁFICOS

Tabela 1: Aplicações da Nanotecnologia na neurociência básica e clínica 35

Gráfico 1: Ocorrência de distribuição de pigmento férrico no SN após tratamento com PAM em diferentes tempos. 49

Gráfico 2: Ocorrência de distribuição de íons de Fe^{+3} (ferrocianeto férrico) no SN após tratamento com PAM em diferentes tempos. 56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMP: adenosine monophosphate;
 ATP: adenosine triphosphate;
 BHE : barreira hemato encefálica;
 BSA : bovine serum albumin;
 CAPES/MEC: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/
 Ministério da Educação;
 CEUA: Comitê de Ética no Uso Animal;
 CNANO: Centro de Nanociência e Nanotecnologia;
 CNPq/MCT: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/
 Ministério de Ciência e Tecnologia;
 D_M : diâmetro modal;
 DMSA: dimercaptosuccinic acid;
 DMT1: divalente metal transporter 1;
 DNA: desoxiribunucleic acid;
 FCE: fluído cérebro espinhal = LCR;
 Fe^{2+} : íon ferroso;
 Fe^{3+} : íon férrico;
 Fe_3O_4 : magnetita;
 γ - Fe_2O_3 : maghemita;
 Fe-S: ferro-enxofre;
 Fe^{+3} -TF: complexo íon férrico, transferrina;
 Fe^{+3} -TF-TFR1: complexo íon férrico, transferrina e receptor de transferrina 1;
 Fig.: figura;
 FM: fluido magnético;
 FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos;
 Gp60: glicoproteína 60;
 H3: histona 3;
 HCP1: heme Carrier protein 1;
 H&E: hematoxilina e eosina;
 HIV: human immunodeficiency vírus;
 HSA-SKL: human serum albumin e C-terminal, serina, lisina e leucina
 IF: Instituto de Física;
 IGF-I, IGF-II: insuline growth factor I, II;
 IL: interleucinas;
 IP: intra-peritoneal;
 IRP: Iron Regulatory Proteins;
 IRE: Iron Regulatory Element;
 J774-A1: linhagem celular do carcinoma de camundongo;
 K: 1000x;
 LCR: líquido encéfalo raquidiano = FCE;
 LPS: lipopolissacarídeo;
 MET; Microscopia Eletrônica de Transmissão;
 MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura;
 MGR: Mouse Genetic Resources;
 mRNA: Messenger ribonucleic acid;
 NAM: nanocompósito de albumina magnético;

NM: nanomagnetos, nanopartículas magnéticas;
NMDA: n-methyl-d-aspartate receptor;
NP: neurópilo;
NMPA: nanopartículas magnéticas poliméricas de albumina;
OCV: órgãos circunventriculares;
OFP: oligodendrócitos ferro positivos;
PAM : polímeros de albumina magnéticos;
PEG: poly ethylene glycol;
PLGA: poly lactic-c-glycolic acid;
PNVP: polivinyl pyrrolidone;
RE: retículo endoplasmático;
RNA: ribonucleic acid;
SN: Sistema Nervoso
SNC: Sistema Nervoso Central;
SNP: Sistema Nervoso Periférico;
TGF- β Rs: transforming growth factor β receptors;
UFG: Univeresidade Federal de Goiás
UnB: Universidade de Brasília;
USP: Universidade de São Paulo;

°C: Celsius;
mg: micrograma;
mL: mililitro;
 μ l: microlitros;
 μ m: micrômetro;
 σ : desvio padrão;
nm: nanômetro;
 \cong : aproximadamente.

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1. Nanobiotecnologia	18
1.2. Nanomagnetos e fluídos magnéticos	19
1.2.1. Polímeros de Albumina Magnéticos (PAM)	21
1.3. Metabolismo de Ferro nos tecidos	22
1.3.1. Metabolismo de Ferro no Sistema Nervoso Central (SNC)	28
1.4. Tecido Nervoso: características relevantes para o estudo	31
1.5. Nanoneurotecnologia	34
2. Justificativas	37
3. Objetivos	38
3.1. Objetivo Principal	38
3.2. Objetivos Específicos	38
4. Materiais e Métodos	39
4.1. Amostra	39
4.2. Animais	39
4.3. Tratamentos	40
4.4. Coleta de Tecidos	40
4.5. Estudos Histológicos	41
4.5.1. Microscopia de Luz	41
4.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão	42
5. Resultados	44
5.1. Caracterização das Amostras	44

5.1.1.Amostra 1: Tamanho das Nanopartículas	44
5.1.2.Amostra 2: Tamanho das Microesferas e Nanopartículas	46
5.2. Análise Histológica dos Tecidos	48
A. Pigmento Férrico	48
B. Ferrocianeto Férrico (íons de Fe^{+2})	56
5.3. Análise Ultra-estrutural dos tecidos	62
6. Discussão	62
6.1. As amostras de PAM	62
6.2. Interação de PAM com o SNC	75
6.2.1.Regões e tipos celulares atingidos por PAM	76
6.2.2.Organelas e estruturas celulares atingidas por PAM	99
7. Conclusões	107
8. Perspectivas	108
9. Referências	110

1. Introdução

1.1. Nanobiotecnologia

Nanotecnologia corresponde à manipulação da matéria em escala nanométrica (1 nanômetro é a bilionésima parte do metro) pelo menos em uma dimensão, alcançando 1 a 999 nanômetros (Lacava & Morais, 2006; Silva, 2006a). Neste tamanho, os materiais podem revelar características específicas como variação de cores (quantum dots) (Silva, 2006a), tolerância à temperatura, alterações de reatividade química, da condutividade elétrica e da intensidade das interações (Lacava & Morais, 2006). Devido a essas qualidades, a nanotecnologia é aplicada em várias áreas como no desenvolvimento de revestimentos, tintas, tecidos, catalisadores, para a resistência de materiais e até na biologia.

O uso de nanomateriais em sistemas biológicos é devido ao alto grau de especificidade a nível molecular. Com esta vantagem, bioengenheiros desenvolvem nanopartículas e aparelhos combinando materiais orgânicos e inorgânicos para interagir e responder às células e tecidos de forma controlada, induzindo respostas fisiológicas de interesse e minimizando efeitos indesejáveis (Silva, 2006a). A nanobiotecnologia produzirá grandes avanços no diagnóstico, terapêutica, biologia celular e molecular, e bioengenharia. Embora a viabilidade destes sistemas ainda não seja real, parte destes dispositivos atualmente está começando a ser plausível, como veículos para “delivery” de fármacos (lipossomos, nanopartículas), nanosensores (língua eletrônica) (Duran, 2005), nanomagnetos (destruição de câncers, “delivery” de drogas) entre outros, também desenvolvidos no Brasil.

Buscando integrar o grupo dos países que desenvolvem tecnologia de ponta, o Brasil criou a Rede de Nanociências e Nanobiotecnologia em 26 de dezembro de 2001, promovida e financiada pelo MCT/CNPq.

Uma dessas redes, a Nanobiotec foi criada para “desenvolver novos produtos e processos, implementando-os para aumentar a competitividade da indústria nacional e capacitando recursos humanos para o aproveitamento das oportunidades econômicas, tecnológicas e científicas” (Duran, 2005), a partir de 3 projetos principais: (A): *Liberção Controlada de Fármacos e Vacinas*, (B):

Nanobiomagnetismo, e (C): Nanosensores, caracterização e interação de nanoestruturas.

O grupo de Nanobiomagnetismo já atuava na forma de rede, com a interação entre os Institutos de Física, Química e Biologia da Universidade de Brasília (UnB) e Universidade Federal de Goiás (UFG), desde 1998. No período 2001-2004, novas instituições uniram-se ao grupo de Nanobiomagnetismo inicial, como o Instituto de Física da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Física da Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Farmácia e Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (CNANO, 2007).

Em 2005, o MCT criou 10 novas redes na área de Nanociências e Nanotecnologia, entre as quais a Rede de Nanobiomagnetismo, contando neste momento com cerca de 40 pesquisadores e mais de 100 alunos. No mesmo ano, com o crescimento da rede foi criado o Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia (CNANO) junto ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. O CNANO, mantendo a mesma proposta inicial da Rede Nanobiotec, como criação e desenvolvimento de novos produtos e recursos humanos com os programas de pós-graduação, visa divulgar ao público em geral os progressos na área da nanobiotecnologia e ampliar as parcerias com outras equipes e grupos de pesquisa. Os novos grupos associados ao CNANO incluem o Hospital Regional da Asa Norte (HRAN/SES – DF) onde foi implantada a unidade ambulatorial para o tratamento de câncer da pele, utilizando a terapia fotodinâmica e sistemas nanoparticulados; a Faculdade de Odontologia da UnB; a Rede Genoma do Centro-Oeste e a Rede Tuberculose (CNANO, 2007).

As abordagens tecnológicas do CNANO incluem tecnologia de despoluição, separação magnética, sistemas entregadores de fármacos, terapia da hipertermia magnética, terapia fotodinâmica e melhoria de transformadores elétricos.

1.2. Nanomagnetos e fluídos magnéticos

As nanopartículas podem ser feitas de vários tipos de materiais como: polímeros biodegradáveis incluindo o PNVP (polivinyl pyrrolidone), PLGA (poly

lactic-c-glycolic acid), PEG (poly ethylene glycol) (Peppas & Blanchette, 2004) entre outros, e de cristais de óxido de ferro (Saiyed *et al*, 2003) e ligas com outros minerais (cobalto, níquel) (Chaves, 2002).

Os nanomagnetos (NMs) são nanopartículas magnéticas que podem ser guiados ou confinados por um campo magnético externo, e por isso, são aplicados na (a) biomedicina como veículos de fármacos, na (b) separação magnética de células e biomoléculas diversas (magnetoafereze), como (c) agentes de contraste em ressonância magnética nuclear, (d) marcadores de células alvos, no (e) tratamento com hipertermia de tumores (Pankhurst, *et al* 2003; Lacava & Morais, 2006) e produção de bioreatores. As nanopartículas magnéticas (NMs) mais utilizadas são as ferritas, representadas por MFe_2O_4 (o M é um metal divalente como o Ni, Co, Mn, Zn e Fe), incluindo a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) (Chaves, 2002). As NMs são utilizadas na forma de fluidos magnéticos ou ferrofluidos, magnetolipossomas (Lacava & Morais, 2006) e nanocompósitos, formados com polímeros orgânicos ou inorgânicos.

Os fluídos magnéticos (FM) são sistemas magnéticos coloidais formados de NMs com diâmetros que variam a partir de 5 nm para cima, recobertos por estabilizantes e solventes como dispersantes, podendo ambos ser orgânicos ou inorgânicos (Chaves, 2002). As principais características dos fluidos magnéticos são a interação partícula-líquido ser forte o suficiente para transmitir o comportamento magnético para o líquido (Massart, 1982) e a presença de interações repulsivas entre as partículas, responsáveis pela estabilidade e classificação entre FM surfactados e iônicos. Nos FM surfactados as nanopartículas são recobertas por surfactantes que possuem terminações polares (carboxila e amina) responsáveis pela estabilidade do FM por repulsão estérica. Os FM iônicos são estáveis devido à repulsão eletrostática entre as coberturas das partículas com carga positiva ou negativa e às interações com o solvente que pode ser ácido ou básico respectivamente (Bakuzis *et al*, 1999).

Os magnetolipossomas são vesículas de membranas lipídicas que encapsulam NMs. Estes podem ser produzidos sinteticamente ou ainda naturalmente por bactérias (*Magnetospirillum*) produtoras de magnetita (Fe_3O_4) ou greigita (Fe_3S_4), com tamanho de 50 a 100nm e cobertas com uma membrana lipídica estável (Saiyed *et al*, 2003). Os magnetolipossomas artificiais são

produzidos imergindo colóides com nanopartículas de óxido de ferro em dispersões aquosas de vesículas de fosfolídeos, gerando assim, bicamadas lipídicas na superfície das partículas (De Cuyper, 1996).

1.2.1. Polímeros de Albumina Magnéticos (PAM)

Esta amostra será denominada Polímeros de Albumina Magnéticos (PAM) mas também pode ser chamada de Nanopartículas Magnéticas Polimérica de Albumina (NMPA) ou Nanocompósitos de Albumina-Maghemita (NAM). Estas nomenclaturas referem-se ao fato da amostra ser formada de polímeros orgânicos de albumina, incrustados por nanopartículas magnéticas de maghemita, formando “beads” ou microesferas magnéticas.

As amostras de PAM utilizadas foram produzidas pela Universidade de Brasília (UnB) e Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto, sendo depois determinados os níveis de toxicidade e biocompatibilidade pelo Instituto de Ciências Biológicas e caracterização magnética, cobertura molecular e composição pelo Instituto de Física, ambos da UnB.

A amostra de PAM possui nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estabilizadas com um colóide aquoso de baixo pH, ou seja, é um fluido magnético iônico completamente neutralizado depois de associado com albumina do soro bovino (BSA- bovine serum albumin), para aplicação biológica (Simioni *et al*, 2006).

O PAM está representado esquematicamente na Fig 1. Esta amostra demonstrou boa estabilidade após 3 meses sem apresentar alterações morfológicas, podendo ser utilizada para estudos *in vitro* com linhagens celulares e *in vivo* com modelos animais (Simioni *et al*, 2006).

Estudos *in vitro* foram realizados utilizando uma linhagem celular de macrófagos de carcinoma de camundongo (J774-A1) com diferentes concentrações de nanopartículas no PAM. O resultado foi de baixa citotoxicidade, diretamente proporcional à concentração de partículas/mL (Simioni *et al*, 2006), a partir deste estudo foi definido a concentração de $2,28 \times 10^{16}$ partículas/mL para esta dissertação.

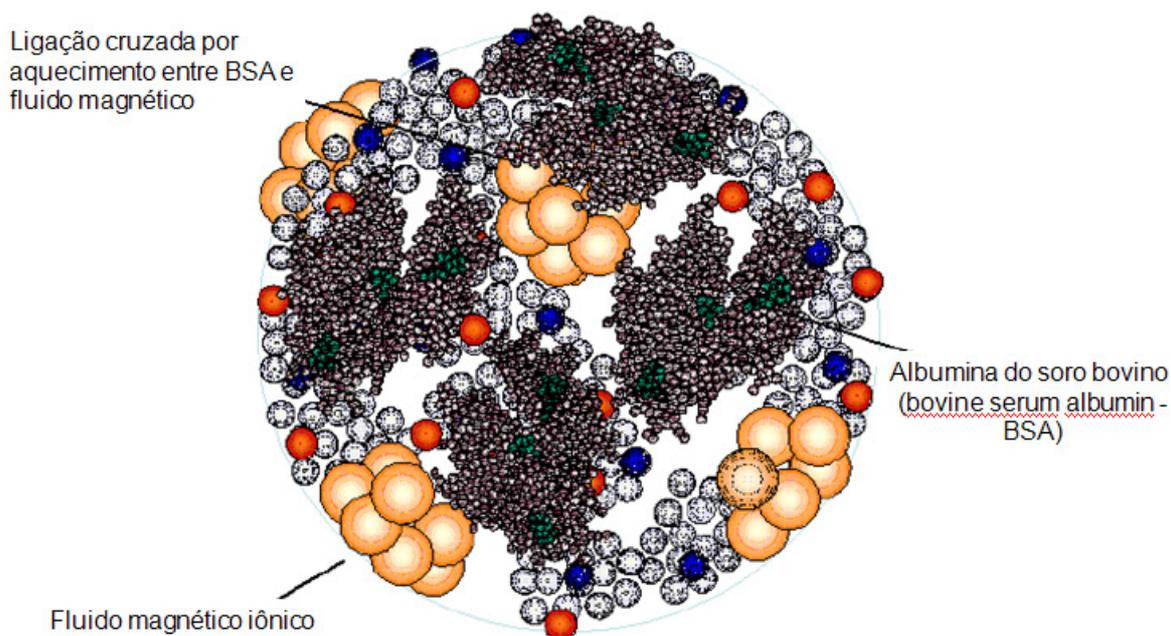


Figura 1: Representação esquemática de PAM, Simioni *et al*, 2006.

1.3. Metabolismo de ferro nos tecidos

O ferro é o mineral mais abundante da crosta terrestre e pode estar em duas formas iônicas em ambientes biológicos: íon ferroso (Fe^{2+}) mais instável e íon férrico (Fe^{3+}) mais estável. O ferro é um dos metais mais usados nas funções celulares (Eisenstein, 2000a, Albretsen, 2006), participando de várias vias metabólicas e processos biológicos essenciais. Além disto, existem hipóteses que relacionam a incorporação do ferro nas atividades biológicas primordiais como um dos fatores essenciais para o desenvolvimento da vida aeróbica na Terra (Albretsen, 2006) e talvez em Marte (Bazylnski, 1996).

Apesar da extrema importância do ferro nos sistemas biológicos, existem dois problemas referentes a seu uso: a baixa solubilidade em pH fisiológico (Eisenstein, 2000a; Rutherford & Bird, 2004; Albretsen, 2006) e o potencial tóxico por produzir radicais livres a partir do Fe^{2+} , gerando estresse oxidativo (Eisenstein, 2000a, Dobson, 2001, Egaña *et al*, 2003, Albretsen, 2006) em componentes celulares e biomoléculas. Para resolver estes problemas, ao longo

da evolução, uma variedade de mecanismos desenvolveu-se para aquisição e uso do ferro, além de simultaneamente reduzir seus efeitos tóxicos.

A minimização dos efeitos tóxicos do ferro se dá oxidando a forma Fe^{2+} para a forma Fe^{3+} e/ou associando com outros elementos como oxigênio e hidrogênio. Estes mecanismos incluem fatores transcricionais e pós-transcricionais e sistemas regulatórios para controlar e coordenar as proteínas que regulam o transporte, interiorização celular, destino metabólico, estoque e, em alguns casos, exportação do ferro (Eisenstein, 2000a).

Nos mamíferos, aproximadamente 70% do ferro é encontrado na hemoglobina e entre 5% a 10% na mioglobina (Albretsen, 2006). Quando ligado à hemoglobina e mioglobina normais, o ferro está como Fe^{2+} e acima de 25% do ferro no corpo está na forma de Fe^{3+} , associado à transferrina, ferritina e hemossiderina, principalmente do fígado, baço e medula óssea (Albretsen, 2006). A homeostase do ferro em mamíferos é mantida por meio de redes sensoriais e regulatórias, que modulam a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, direta ou indiretamente.

A absorção do ferro (Fig. 2) ocorre primariamente no duodeno e é inversamente proporcional aos estoques de ferro no corpo e diretamente proporcional à taxa de eritropoese. Apenas uma fração do ferro da dieta é absorvida (Andrews, 2005). O ferro é absorvido principalmente a partir de proteínas heme proveniente da dieta (hemoglobina e mioglobina), mas também é absorvido como resíduo de ferro inorgânico, que está na forma de Fe^{+3} . A absorção de ferro heme é mediada por carreador como o HCP1 (heme Carrier protein 1) (Shayeghi *et al*, 2005) e provavelmente por outros, ainda não descritos. O maior transportador envolvido na interiorização de ferro não-heme é o DMT1 (divalent metal transporter 1), que também transporta outros metais divalentes, incluindo o Mn^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} e Zn^{+2} (Gunshin *et al*, 1997). O ferro intracelular no enterócito será então estocado em ferritinas ou transportado através da membrana basolateral para o plasma. Várias moléculas podem estar envolvidas na exportação do ferro, mas duas foram caracterizadas e consideradas importantes: ferroportina (Abboud & Haile, 2000), seletiva para Fe^{+2} e hefaestina que oxidiza o Fe^{+2} para Fe^{+3} (Bannerman & Cooper, 1966).

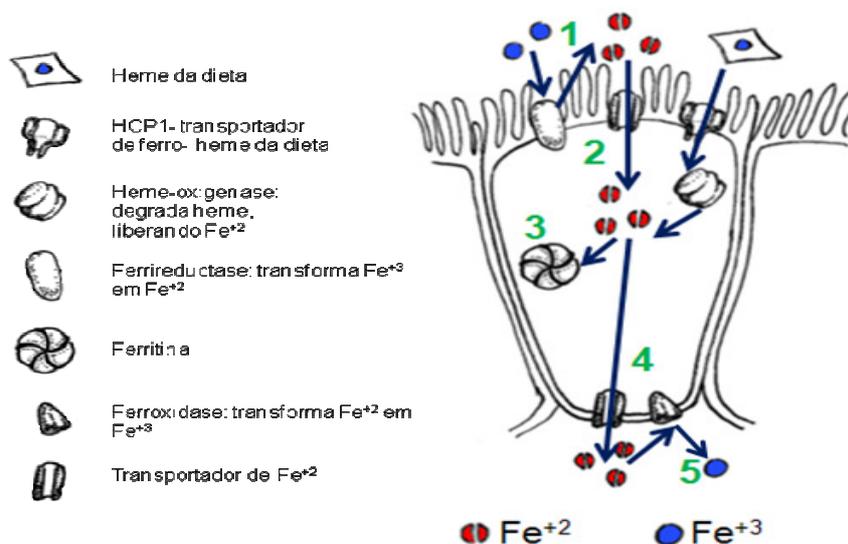


Figura 2: Absorção Intestinal do ferro não-heme.

1) Redução do Fe^{+3} para Fe^{+2} ; **2)** Interiorização celular do Fe^{+2} mediada por transportador (DMT1); **3)** Estoque do Fe^{+2} em ferritinas do enterócito, e pode ser perdido quando a célula descama; **4)** Exportação de Fe^{+2} por transportador (ferroportina); **5)** Oxidação do Fe^{+2} em Fe^{+3} por ferroxidase (hefaestina) para incorporação em transferrinas do plasma.

O ferro não heme no plasma geralmente está na forma de Fe^{+3} e então é associado a biomoléculas, transportado e distribuído para todos os tecidos. O transporte é realizado principalmente pela transferrina, uma glicoproteína plasmática de 80kDa, que se liga a dois átomos de ferro (Eisenstein, 2000a; Donovan *et al*, 2006). O ferro também pode ser transportado por ferritinas plasmáticas com receptores específicos nas membranas celulares e por outros tipos de complexos de baixo peso molecular como o citrato, alguns aminoácidos e outras proteínas plasmáticas como a albumina (May *et al*, 1980; Grootveld *et al*, 1989; Kennard *et al*, 1995; Gorinsky, 2007).

Evidências genéticas e bioquímicas demonstram a presença de várias alternativas de interiorização do ferro por células eucarióticas. Em mamíferos, mudanças na taxa de absorção de ferro é a maior forma de controle para alterar o conteúdo de ferro de células e do corpo como um todo (Eisenstein, 2000a). A interiorização celular do ferro pode ocorrer por dois mecanismos: dependente de transferrina (Fig. 3) e não dependente de transferrina (Randell *et al*, 1994). A interiorização celular do ferro dependente de transferrina representa mais de 99% e envolve a participação de um receptor, o TFR1 e é mediado por endocitose.

A interiorização do complexo Fe^{+3} -TF- TFR1 acontece via clatrina, formando vesículas endossômicas (Andrews, 2005; Donovan *et al* 2006). Estes endossomos acidificam internamente devido à ação de uma bomba iônica Na^+H^+ -ATPase (Nishi & Forgac, 2002), resultando na dissociação do Fe^{+3} . O Fe^{+3} é reduzido por uma ferrireductase, a Steap3 (Ohgami *et al*, 2005) e transportado para o citoplasma pela DMT1. Assim, o complexo TF-TFR1 é reciclado e retorna à membrana celular, liberando a TF livre (apo-TF) para a circulação (Andrews, 2005; Donovan *et al* 2006).

Existem outros mecanismos de interiorização celular de ferro não dependente de transferrina. Estes mecanismos envolvem a participação de outras moléculas de transporte e receptores. Como exemplo, existem a albumina plasmática, o DMT1, ferrireductases de membrana (Lesuisse *et al*, 1991), lactoferrina, que também é um fator de crescimento (Masson *et al* 1966; Sun *et al*, 1991), canais de cálcio (Oudit *et al*, 2003), mobilferrina (Umbreit *et al*, 1997) entre outros. Neste tipo de transporte de ferro propõe-se 4 funções: (a) para a retirada de ferro livre no plasma, a fim de proteger as células e tecidos dos efeitos tóxicos dos radicais livres e peroxidação lipídica; (b) servir como mecanismo para outros metais entrarem nas células, sem competir com o ferro; (c) para participar da absorção de células intestinais sem receptores de transferrina na superfície luminal; (d) para redistribuição de ferro em tecidos que não são acessíveis para a transferrina (Qian *et al*, 1997).

Depois de interiorizado, o ferro tem 3 destinos: (a) utilizado na síntese de proteínas que contém ferro; (b) estocado ou (c) exportado da célula. Para ser direcionado para outros compartimentos celulares, o ferro só vai para o citoplasma na forma de Fe^{+2} , necessitando da ação de uma ferroxidase, e só então é oxidado em proteínas de estoque ou metabolizado (Qian *et al*, 1997).

Proteínas que contém ferro estão presentes em vários lugares na célula, incluindo o citosol e organelas. Uma localização crítica do ferro intracelular é a mitocôndria, sítio de incorporação de ferro em proteínas heme e não-heme (proteínas ferro-enxofre) para as funções celulares (Eisenstein, 2000a). Algumas funções celulares do ferro incluem transporte de oxigênio (heme, cofator da hemoglobina e mioglobina), transferência de elétrons (citocromos) (Andrews, 2005), síntese de DNA, formação de neurotransmissores e hormônios,

metabolismo xenobiótico (Eisenstein, 2000a), biosíntese de lipídeos e colesterol (Connor *et al*, 2001), entre outras.

A proteína de estoque de ferro é a ferritina, que possui 24 subunidades e é capaz de armazenar acima de 4500 átomos de ferro (Cairo, *et al*, 1989; Dobson, 2001). O tamanho desta proteína cheia é de aproximadamente 12nm com core de 8nm. As ferritinas são formadas de 2 tipos de subunidades e podem variar na composição dependendo do tipo celular e estado metabólico. Estas subunidades são a H (heavy) e L (light) e podem formar hetero ou homopolímeros (Harrison & Arosio, 1996). Ferritinas ricas em subunidades L, capturam o ferro mais lentamente e o mantêm por mais tempo, enquanto que a subunidade H funciona como uma ferroxidase e ferritinas ricas em H são mais rápidas em incorporar o ferro no core (Eisenstein, 2000a).

A ferritina é uma proteína que oxida o Fe^{+2} e o hidrata, armazenando em seu core na forma de ferrihidrato. Esta proteína tem a síntese regulada em resposta ao ferro por proteínas regulatórias de ferro (IRP – Iron Regulatory Proteins) que se ligam ao RNA, controlando a tradução. Os sítios de ligação destas proteínas nos mRNA são os elementos regulatórios de ferro (IRE – Iron Regulatory Element) (Eisenstein, 2000a). Genes também podem participar na regulação do metabolismo de ferro, como o gene *c-myc* em humanos (Richardson, 2002). Acredita-se que esta relação de repressão do *c-myc* com a ferritina seja para aumentar a disponibilidade de ferro para processos de proliferação celular (Wu, *et al*, 1999). Existem dois tipos de ferritinas de acordo com a localização: as citosólicas e as mitocondriais. As ferritinas mitocondriais foram reportadas recentemente e possuem uma importante função em regular o metabolismo celular e controlar o tráfico de ferro através do citoplasma, uma vez que o ferro é incorporado preferencialmente pelas mesmas. (Levi *et al*, 2001).

A ferritina está presente em todos os tipos celulares, mas tem importância especial em algumas células, como macrófagos, hepatócitos e neurônios. Os hepatócitos também têm uma função de depósito removendo o excesso de ferro da circulação e estocando com segurança até que seja necessário (Andrews, 2005). Ferritinas podem ser encontradas dentro de lisossomos onde são degradadas, formando a hemossiderina. Esta é uma forma não homogênea e insolúvel de ferro, proteínas e produtos da degradação de membranas (Andrews,

2005). Outra forma de estoque de ferro a partir de ferritinas é a neuromelanina, presente em neurônios dopaminérgicos (Tribl *et al*, 2005) e semelhante à estrutura da melanina periférica dos cabelos, pele, olhos, penas (Zucca *et al* 2006) e estruturas do ouvido.

A reciclagem do ferro otimiza sua utilização sem grandes gastos energéticos para importação, o que também pode significar sua importância no metabolismo celular. A reciclagem ocorre principalmente de hemácias senescentes ou danificadas, que são fagocitadas por macrófagos de vários órgãos, principalmente do baço, medula óssea e fígado (Andrews, 2005; Donovan *et al*, 2006).

Poucos estudos são direcionados para os mecanismos envolvidos na exportação celular e excreção. No fígado, as células de Kupffer parecem estar envolvidas na liberação de ferro na forma de ferritina (Eisenstein, 2000a), assim como em outros tipos celulares, inclusive em neurônios. Proteínas relacionadas com o metabolismo de ferro e cobre como a ceruloplasmina (ferroxidase) e a hefaestina estão envolvidas na exportação celular de íons de ferro (Bannerman & Cooper, 1966; Eisenstein, 2000b, Andrews, 2005; Donovan *et al*, 2006). Vale ressaltar que a ceruloplasmina também atua na interiorização celular de ferro em situações de depleção do metal (Mukhopadhyay *et al*,1998). Não existe um mecanismo específico e regulado de excreção de ferro pelo fígado e rins (Andrews, 2005), mas sabe-se, por exemplo, que os pulmões são capazes de excretar (Turi *et al*, 2004). Outra forma de excreção do ferro é da descamação de enterócitos do epitélio intestinal (Donovan *et al*, 2006) e mucosas, além de sangramentos em diferentes graus (Andrews, 2005).

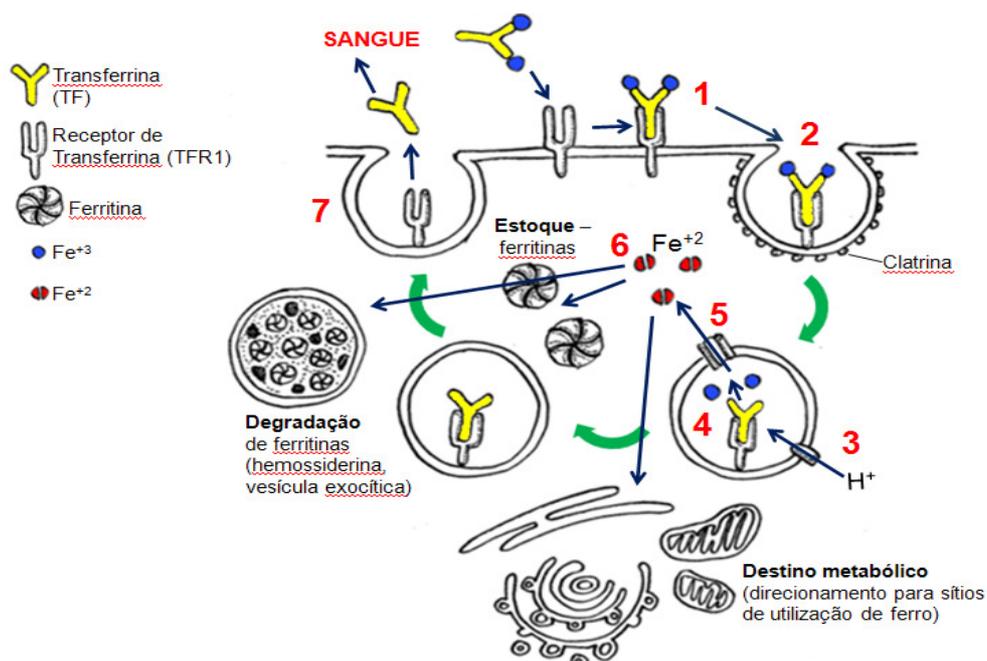


Figura 3: Esquema Geral do metabolismo de ferro, não-heme e dependente de transferrina. 1) Formação do complexo Fe^{+3} -TF-TFR1; 2) Endocitose do complexo via clatrina; 3) Acidificação do microambiente do endossomo por H^{+} -ATPase; 4) Dissociação do Fe^{+3} da TF; 5) Redução e exportação do Fe^{+3} por uma ferriredutase endossômica (DMT1) para o citoplasma; 6) Utilização do Fe^{+2} : destino metabólico; estoque; degradação; 7) Reciclagem de TF-TFR1: transferrina volta para o sangue e o receptor de transferrina para a membrana celular.

1.3.2. Metabolismo de ferro no Sistema Nervoso Central (SNC)

O ferro é o metal mais abundante do SNC e naturalmente tende a concentrar em estruturas específicas como o *globus pallidus* e *substantia nigra*, atingindo níveis acima do fígado (Pu *et al*, 1999, Rouault, 2001). A deposição de ferro no cérebro ocorre principalmente em formas de estoque orgânicos como ferritinas mas não como hemossiderina, embora pequena quantidade de ferro está presente na forma livre e reativa (Tribl *et al*, 2005). Porém, estruturas cristalizadas de óxido de ferro de ferritinas de cérebros de pacientes com Alzheimer, são similares aos cores de ferritinas detectadas na hemossiderina de pacientes com hemocromatose (doença com alto depósito de ferro nos tecidos) (Quintana *et al*, 2004).

Os componentes moleculares que participam no metabolismo de ferro nos tecidos periféricos também estão presentes no sistema nervoso (SN), como a

transferrina, a ferritina e proteínas regulatórias de ferro (IRP) (Connor *et al*, 2001). O DMT1 também está presente no SN, mas tem regulação da expressão variável dependendo das regiões no cérebro, da idade, mas a expressão é independente do ferro (Ke *et al*, 2005). Já foi reportado que ratos Belgrado com deficiência de DMT1 possuíam menos ferro no cérebro do que o normal (Burdo *et al*, 1999). Isto quer dizer que o DMT1 tem importância significativa na interiorização do ferro para o SN, principalmente quando há evidências de que o transporte direto de complexos de Fe^{+3} -TF pode não ocorrer significativamente (Oates & Morgan, 1996).

A neuromelanina é um pigmento escuro produzido por neurônios dopaminérgicos do SN e é considerada como uma molécula de ligação ao ferro endógeno em neurônios pigmentados (Fig. 4). É formada por vários tipos de proteínas, entre elas a ferritina (Tribl *et al*, 2005). Também funciona como um forte quelante de metais e toxinas orgânicas, modulando seus efeitos nas células (Zecca *et al*, 2003).

As ferritinas são as principais formas de estoque de ferro no SN e também existem nas duas formas, a H-ferritina e L-ferritina. Nos neurônios predomina a H-ferritina, na micróglia a L-ferritina e nos oligodendrócitos estão presentes as duas formas (Connor *et al*, 2001).

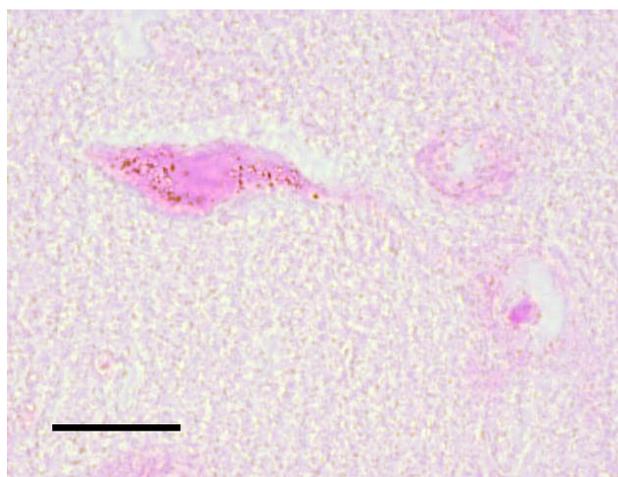


Figura 4: Neurônio com neuromelanina em córtex do cérebro. Coloração de Perls, Barra: 20 μm .

Porém, mais um fator exige especial atenção, a produção biogênica de nanopartículas de óxido de ferro (magnetita e maghemita) pelo sistema nervoso central (Kirschvink, *et al*, 1992; Pardoe & Dobson, 1999; Dobson, 2001). Desde a descoberta de nanopartículas de magnetita ferromagnética no cérebro humano (Kirschvink, *et al*, 1992), estudos estão sendo realizados para determinar os mecanismos de controle e formação deste material e funções no SNC, tanto fisiologicamente como nas patologias. Um motivo hipotético de formação de óxidos de ferro magnéticos biogênicos seria quando a ferritina estivesse supersaturada ou com alterações no funcionamento (Dobson, 2001). Entretanto, esta hipótese aparentemente sugere uma síntese por estímulo ou causa patológica, mas e se existir uma síntese fisiológica? Quais seriam as causas, componentes envolvidos e funções?

Foi reportada uma média de cristais de magnetita-maghemita de 5 milhões por grama em tecidos do cérebro humano e acima de 100 milhões por grama na pia e duramáter (Kirschvink, *et al*, 1992). Em ratos, a formação destes cristais no cérebro é influenciada pela transfusão e dieta rica em ferro (Pardoe & Dobson, 1999). Em humanos existe a correlação da alteração do metabolismo de ferro com desordens neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Dobson, 2001). Apesar de muitos organismos utilizarem a magnetita biogênica como um mecanismo de sensibilidade do campo geomagnético, em humanos estas partículas não parecem ser utilizadas para este propósito (Pardoe & Dobson, 1999).

A presença de extensas redes vasculares, de nanopartículas biogênicas e estruturas enriquecidas de ferro no cérebro são um dos fatores, que fazem do ferro, o metal mais abundante no SNC. Então, a aplicação de nanopartículas de ferro artificial no cérebro teria um efeito significativo em desequilibrar o ferro no SNC? Caso existam alterações, seriam devido à composição das nanopartículas, ao tamanho ou à capacidade de interferir nas funções das nanopartículas biogênicas? Se alguma destas hipóteses forem verdadeiras, quais tipos de alterações podem provocar ou predispor? Quais tipos celulares são alvos?

1.4. Tecido nervoso: características relevantes para o estudo

A divisão anatômica do sistema nervoso compreende o sistema nervoso central (SNC) com cérebro, cerebelo, tronco encefálico, medula espinhal e parte neural do olho; e o sistema nervoso periférico (SNP) com glânglios periféricos, nervos, terminações nervosas, receptores e efetores do corpo (Kierszenbaum, 2004). Os componentes celulares básicos do SNC são os neurônios e células da glia (astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células ependimárias), como na figura 5, e do SNP, além das células citadas anteriormente, as células satélites (para sustentação) e células de Schwann (análogas aos oligodendrócitos) (Salfelder *et al*, 1967).

O **neurônio** é a unidade morfofuncional do sistema nervoso é uma célula excitável, bastante especializada, diferenciada e sem capacidade de divisão. Faz-se exceção os neurônios grânulos presentes no córtex do cérebro, que aumentam durante a infância e os neurônios do bulbo olfatório, gerados durante toda a vida a partir de células indiferenciadas (Nicholls *et al*, 2001). Os neurônios têm a função de receber, processar e transmitir informações por meio de sinapses elétricas (interneurais) e químicas (interneuronal e neuroefetoras) entre células. Estas sinapses podem ser fixas com outros neurônios, células musculares e excretoras, ou móveis, como com células do sistema imunitário. Toda a região entre as células, formada principalmente por prolongamentos neuronais (dendritos e axônios), formam o neurópilo.

As **células da glia** ou **neuroglia** são células que continuam com a capacidade de divisão e tem funções de suporte, revestimento, isolamento, modulação de atividade neuronal e defesa (macrófagos).

Os **astrócitos** são as maiores células gliais, abundantes e atuam auxiliando no metabolismo de neurotransmissores, retirando-os da fenda sináptica; agem na manutenção dos níveis adequados de íons, principalmente de potássio no meio extravascular, para evitar despolarizações por acúmulo; regulam a troca de nutrientes para áreas mais ativas; influenciam a formação de memória e fazem parte da barreira hemato-encefálica (BHE), regulando seletivamente a passagem de substâncias da corrente circulatória para o neurônio (Nicholls *et al*, 2001) Existem 2 tipos: os protoplasmáticos na substância cinzenta e os fibrosos

na substância branca. Os núcleos dos astrócitos são grandes, ovóides e fracamente corados.

Os **oligodendrócitos** são menores do que os astrócitos, mais abundantes, possuem núcleo irregular e coram-se intensamente (Kierszenbaum, 2004). Tem como função principal formar a bainha de mielina dos axônios e também podem formar pés vasculares na BHE (Nicholls *et al*, 2001). Cada oligodendrócito pode envolver vários axônios, enquanto que as células de Schwann do SNP recobrem um único axônio (Kierszenbaum, 2004). As **microglias** são pequenas, alongadas, com núcleo de contorno irregular e atuam principalmente como células fagocíticas. As **células ependimárias** formam o revestimento da superfície dos ventrículos laterais, arqueduto cerebral e canal medular (Nicholls *et al*, 2001). Durante o desenvolvimento, o epêndima juntamente com a pia-máter formam o plexo coróide, presente no teto do 3º e 4º ventrículos e nos ventrículos laterais, sendo responsáveis pela produção do líquido cefalorraquidiano (LCR). O LCR é um fluido claro, incolor, preenche o sistema ventricular e canal medular e funciona como uma proteção hidráulica, meio de sustentação e nutrição do tecido nervoso (Banks, 1991). Diferenciar microglia, astrócito e oligodendrócito é difícil com as técnicas histológicas de rotina. Para diferenciação de células gliais são geralmente usadas técnicas de imunocitoquímica e impregnação argêntica (Kierszenbaum, 2004).

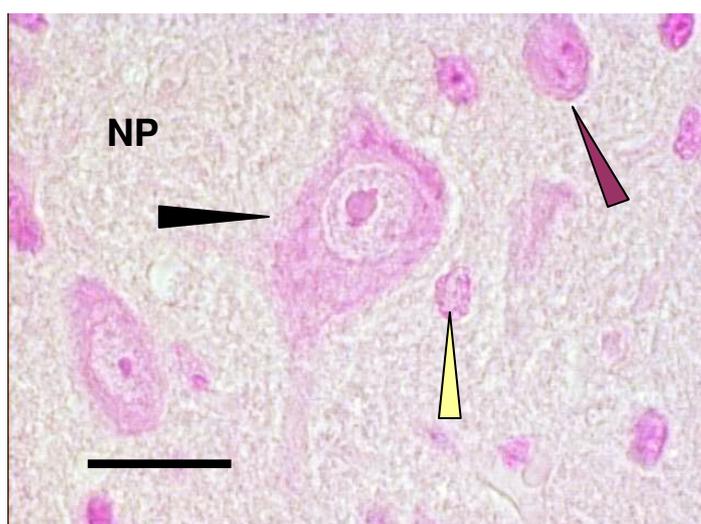


Figura 5: Córtex do cérebro. Coloração de Perls. **Setas:** preta- neurônio; vinho- astrócito; amarela- oligodendrócito; NP- neurópilo. Barra: 20µm.

O principal desafio na administração de agentes para o sistema nervoso é ultrapassar a BHE sem alterar sua integridade, por meio da endocitose (Kreuter, 2005; Jain, 2006) e/ou com o uso de ligantes específicos para interagir com receptores da BHE, mediando a transcitose (Kreuter, 2005; Kabanov & Batrakova, 2004). Os principais fatores que dificultam a ultrapassagem de moléculas para o SN são os transportadores de efluxo da BHE (Kabanov & Batrakova, 2004), atividade fagocítica do sistema retículoendotelial, proteínas de opsonização (Lockman *et al* 2002; Roney *et al.* 2005), sobreposição de células que a compõe e pouco espaço intra e intercelular. Histologicamente a estrutura da BHE é constituída por células endoteliais especiais sem fenestras e seladas com *tight junctions*, cobertas com pericitos e prolongamentos dos astrócitos (Fig. 6). As *tight junctions* entre as células endoteliais da BHE possuem uma resistência elétrica transendotelial muito alta de 1500-2000 Ωcm^2 , se comparada com a resistência transendotelial de 3-33 Ωcm^2 dos outros tecidos (Misra & Shah, 2003).

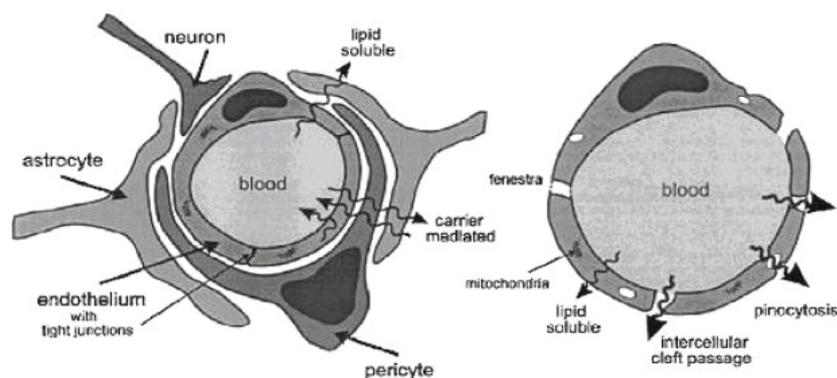


Figura 6: Comparação esquemática entre capilares normais (direita) e do cérebro (esquerda). (Misra & Shah, 2003)

Porém, algumas regiões do SNC não apresentam células endoteliais clássicas da BHE, mas tem microvasos similares aos vasos da periferia. Estas áreas são adjacentes aos ventrículos cerebrais e são chamados de órgãos circumventriculares (OCV). Os OCVs incluem o plexo coróide, a eminência média, neurohipófise, glândula pineal, *organum vasculosum* da *lamina terminalis*, órgãos sufornical e subcomissural e *area postrema* (Fig. 7). Nestas regiões, os capilares são mais permeáveis aos solutos (Misra & Shah, 2003).

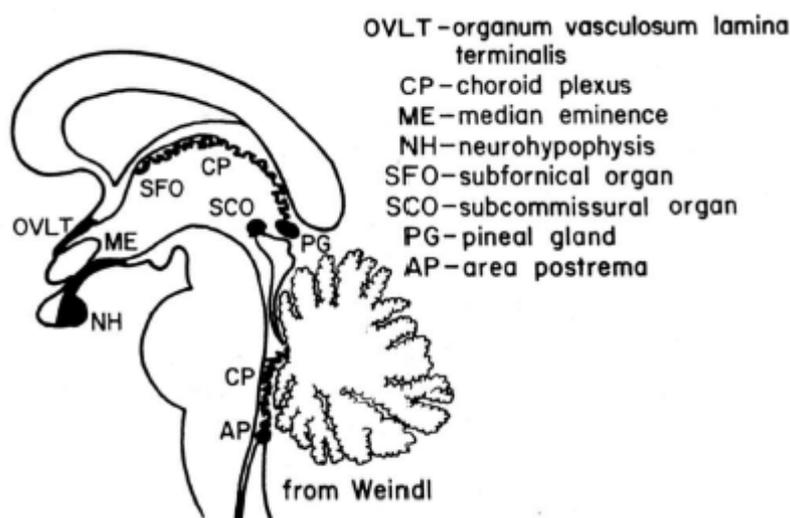


Figura 7: Localização dos órgãos circunventriculares (OCV) – esquema do corte sargital médio do cérebro humano (Bickel *et al*, 2001).

1.5. Nanoneurotecnologia

Existem várias dificuldades para aplicação de qualquer tipo de droga neuroespecífica e as principais são: (a) ultrapassar a BHE sem alterar significativamente sua integridade, ao ponto de deixar o SN desprotegido; (b) determinar variáveis que influenciem nos diferentes tipos de respostas dos pacientes e controlar a quantidade, metabolismo e efeitos adversos, capazes de provocar o efeito desejado com menores doses e custos.

Por causa destes motivos entre outros, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas e uma excelente opção para auxiliar neste propósito é a nanotecnologia.

A nanotecnologia em neurociência é aplicada em dois tipos de pesquisas: (a) pesquisa básica para a investigação dos processos moleculares, celulares e fisiológicos e (b) pesquisa clínica direcionada em limitar e reverter estados neuropatológicos (Tabela 1).

Tabela 1: Aplicações da Nanotecnologia na neurociência básica e clínica.

Nanotecnologia	Aplicações
Neurociência básica	
Deposição molecular e modelagem litográfica de moléculas neuronais específicas com resolução nanométrica	Estudo de comunicação celular e sinalização, sistemas de testes para drogas e outras moléculas.
Microscopia de força atômica (medição molecular de superfícies funcionais)	Interação, gravação e/ou estimulação de neurônios a nível molecular
<i>Quantum dots</i>	Alta resolução espacial e temporal de imagens;
Neurociência clínica	
Redes de nanofibras e peptídeos de auto-montagem	Diferenciação neuronal de células progenitoras; regeneração neural
Derivados de fulerenos	Neuroproteção, limitando os efeitos de radicais livres após lesão
Nanogéis de polietilenoglicol e polietilamina; nanopartículas de polibutilcianoacrilato	Transporte de fármacos e pequenas moléculas através da barreira hematoencefálica

Fonte: Silva, 2006a

Atualmente alguns nanomateriais estão sendo desenvolvidos e a partir destes, características estão sendo definidas para aperfeiçoar a especificidade ao SN. Para nanopartículas, por exemplo, cargas de superfície, tamanho e composição da cobertura influenciam na alteração de permeabilidade da BHE, toxicidade e distribuição. Testes com nanopartículas carregadas demonstraram que a carga neutra e baixa concentração de carga aniônica obtiveram os melhores resultados como carreadores e distribuição no tecido e alta carga catiônica tem efeito tóxico imediato na BHE (Lockman *et al* 2004; Cengeli *et al*, 2006; Saito *et al*, 2006). Em compensação, um mesmo artigo que descrevia um aumento da citotoxicidade com moléculas catiônicas, afirmava biocompatibilidade

com cobertura de aminoPVA (polyvinyl-alcohol+) (Cengeli *et al*, 2006). Quanto ao tamanho da nanopartícula, o melhor é abaixo de 100nm para o tecido nervoso (Gao & Jiang, 2006). Referente à composição da cobertura, um dos objetivos é induzir o revestimento das NMs por proteínas fisiológicas, como por exemplo, proteínas de transporte do plasma como as apolipoproteínas B e E. Estas proteínas são ligantes do receptor LDL das células endoteliais da BHE, promovendo endocitose (Silva, 2006a; Kreuter, 2005). Para o mesmo propósito de *camuflagem* por proteínas fisiológicas, vários tipos de coberturas foram usados, como aminoPVA (Cengeli *et al*, 2006), dextrana (Jain, 2006) e polisorbato-80,85 (Schroeder *et al*, 1998a,1998b; Kreuter, 2005; Silva, 2006a). Nos estudos realizados pelo grupo de pesquisas da UnB, foi demonstrado que existem nanopartículas que não atingem o tecido nervoso, como o fluído magnético com nanopartículas de magnetita recobertas com DMSA (Chaves, 2002) e outras em que acontece o contrário, como no fluído magnético com nanopartículas de ferrita de cobalto cobertas com citrato (Kückelhaus *et al*, 2003).

A Nanoneurotecnologia ainda está nos estágios iniciais devido às complicações referentes ao desenvolvimento de equipamentos e nanomateriais para aplicações biológicas, conhecimento fisiológico, celular e molecular do SN e complexidade associada às interações e efeitos de nanoestruturas com as células da BHE, células neurais e gliais do SN (distribuição e compatibilidade). As aplicações das NMs na neurociência atualmente são para: (a) contraste em diagnóstico de microtumores na ressonância magnética, (b) hipertermia no tratamento de tumores e (c) carreadores de fármacos.

O crescente desenvolvimento da nanotecnologia em diversas áreas poderá desenvolver novas aplicações direcionadas para a neurologia, tanto para desvendar o mistério do funcionamento do SN, prevenção e tratamento de patologias e até na exploração e melhoria das faculdades mentais.

A finalidade desta dissertação é analisar histologicamente e ultra - estruturalmente as possibilidades de distribuição e potenciais de alterações de PAM no SNC.

2. Justificativas

O interesse pela nanotecnologia surgiu principalmente por ser uma ciência nova e com grande potencial de pesquisa nas mais diversas áreas. Especificando para a biologia e na linha de pesquisa em nanobiomagnetismo, a intenção deste projeto de mestrado foi desenvolver pesquisa de base a partir da dissertação sobre biodistribuição histológica e ultra-estrutural de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro artificiais no sistema nervoso de mamíferos.

A dissertação está baseada em estudos histológicos, os quais avaliaram se o PAM é capaz de ultrapassar barreira hemato-encefálica (BHE) e atingir o sistema nervoso central. Entendendo que várias características das NMs interferem na permeabilidade da BHE, o PAM será testado quanto: (a) capacidade de ultrapassar a BHE; (b) distribuição pelo tecido nervoso (substância cinzenta e branca); (c) interiorização celular (hemáceas, fagócitos e células do tecido nervoso) e citolocalização; (d) regiões com tendência de maior concentração e potenciais efeitos tóxicos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo principal

A presente dissertação apresenta como objetivo estudar a biocompatibilidade dos polímeros de albumina magnéticos em tecido nervoso de mamíferos.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterização estrutural do PAM, ou seja, morfologia e diâmetro modal das microesferas e das nanopartículas que compõem as amostras;

- Verificar se o PAM é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica e distribuírem-se no tecido nervoso, a partir da administração intraperitoneal;

- Análises histológicas e ultra-estruturais da distribuição, localização e possíveis alterações provocadas pelo PAM no encéfalo (cérebro, tronco encefálico e cerebelo), medula espinhal e sangue.

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostra

O fluido magnético utilizado é constituído por nanopartículas de maghemita, obtidas por condensação química de sais de Fe^{+2} e Fe^{+3} em meio alcalino (Sadeghiani, 2004) resultando em uma concentração média de nanopartículas de ferro de $2,28 \times 10^{16}$ por mL. Este fluido foi estabilizado e neutralizado com albumina do soro bovino e a seguir liofilizados. Posteriormente as NM foram diluídas em soro fetal bovino (BSA) na concentração de 5mg/mL, o que corresponde em média de $2,46 \times 10^{13}$ nanopartículas de ferro por miligrama (Tedesco, comunicação pessoal).

As amostras foram produzidas e cedidas pelo Dr. Paulo César Morais do Instituto de Física, Núcleo de Física Aplicada da Universidade de Brasília (UnB) e pelo Dr. Antônio Carlos Tedesco, do Departamento de Química, do Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

4.2. Animais

A utilização dos animais foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília – CEUA/63-IB-UnB.

Foram usados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, não isogênicas, com idade média de 2 meses e da linhagem Swiss (Fig. 8), obtidas do biotério da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Foram mantidas no Biotério do Laboratório de Genética em ciclo claro/escuro (12 horas cada) com ração e água *ad libitum*. Usou-se um total de 80 animais entre controles e tratados para análises histológicas e ultra-estruturais.



Figura 8: Espécie e linhagem de camundongo utilizado na dissertação. (MGR, 2006).

4.3. Tratamentos

Os animais receberam injeção única intraperitoneal (IP) de 100 μ l de BSA para os controles (n=1 por tempo) e 100 μ l de amostra de PAM nos tratados (n=3 por tempo, para testes histológicos e ultra-estruturais). Os animais foram sedados com éter e mortos por deslocamento cervical nos seguintes tempos: 30 minutos, 6 horas, 12 horas (iniciais); 24 horas, 48 horas (intermediários); 7 dias, 15 dias e 30 dias (tardios) após o tratamento.

4.4. Coleta de tecidos

Os tecidos coletados para microscopia de luz e eletrônica de transmissão foram o encéfalo (cérebro, cerebelo), a medula espinhal (Fig. 9) e sangue. Foram 8 regiões e tecidos diferentes por tempo.

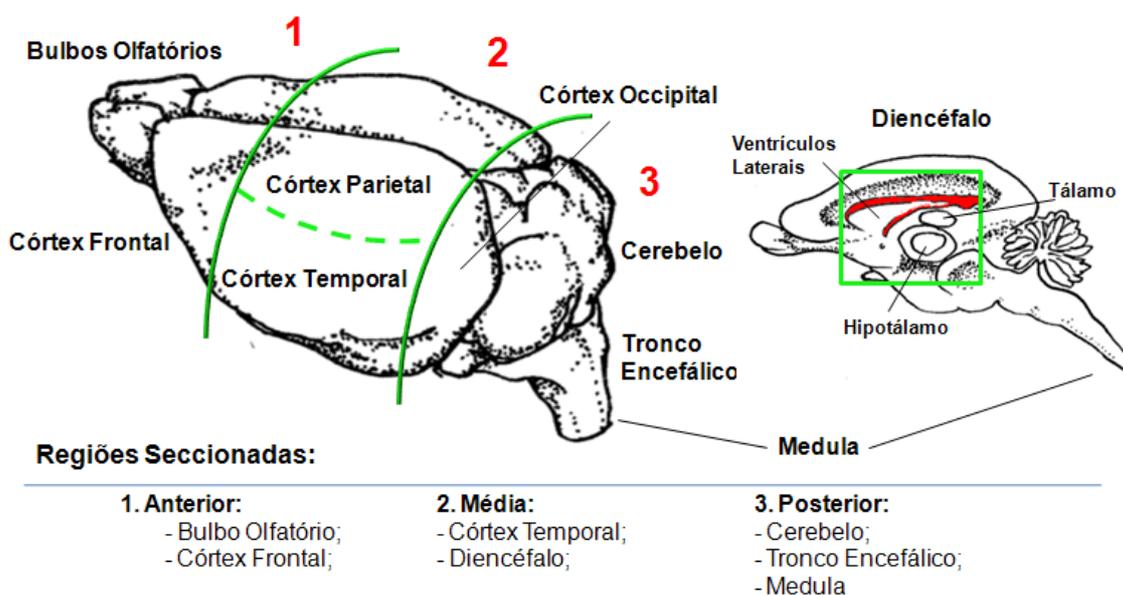


Figura 9: Esquema das regiões seccionadas do SN de camundongo para a dissertação.

4.5. Estudos Histológicos

4.5.1. Microscopia de Luz

Os tecidos coletados foram fixados na mistura fixadora de Davidson (glicerina, formol 37-40%, álcool 95%, água destilada e ácido acético) por 10 horas, desidratados em álcool com concentração crescente de 70-100% (1 hora cada, repetindo com álcool 100%), diafanizados com xilol e emblocados em parafina (Barbosa, 2004).

Após o processamento, os blocos de parafina foram cortados em espessura média de 5µm de espessura e os cortes semi-seriados colocados em lâminas na estufa por 2 dias a 37°C, para secagem e aderência. Os cortes foram corados e visualizados nos microscópios Axioskop e Axiophot da Zeiss e fotodigitalizados pelos programas Pixelview Station TV 4.12 e ImagePro Plus 5.1, respectivamente.

Para a coloração com hematoxilina e eosina (H&E), as lâminas foram tratadas com xilol em 3 soluções diferentes (1 minuto cada), para retirar a parafina. Os cortes foram rehidratados em gradientes de álcool: 100% (3x 1 minuto cada), 90-70% (1 minuto cada). A coloração foi realizada em hematoxilina 1 minuto, banho em água corrente e eosina por 2 minutos. Em seguida foram lavadas novamente, desidratadas por segundos em soluções de álcool crescente 70-100% (3 vezes) e novamente diafanizadas com xilol (3 soluções diferentes, 1 minuto cada).

O azul prussiano ou azul da Prússia é uma coloração para visualizar pigmentos férricos, e é associada com a coloração de vermelho rápido nuclear, diferenciando em vermelho e rosa os núcleos e citoplasmas, respectivamente, e em azul os pigmentos férricos. A solução de Perls possui solução aquosa de ferrocianeto de potássio a 10%, reagindo com Fe^{+3} (Lillie, 1965; Kückelhaus, *et al*, 2004) formando o ferrocianeto férrico de cor azul brilhante. Quando os íons de ferro estão associados a óxidos (nanopartículas de ferro) ou como ferrihidratos presentes nos “cores” de ferritinas (hemossiderina e neuromelanina), o agrupamento ou “clusters” destas formas podem aparecer como pigmento marrom.

As lâminas foram tratadas com 3 soluções de xilol (1 minuto cada), rehidratadas em concentrações decrescentes de álcool 100% (3 vezes), 90-70% e água destilada (1 minuto cada). Em seguida foram coradas com solução de Perls (20 minutos), lavadas em água destilada, coradas com vermelho nuclear rápido (3 minutos), lavadas novamente, desidratadas em soluções de álcool crescente 70-90% e 100% (2 vezes) por segundos e novamente diafanizadas com xilol (3 soluções diferentes, 1 minuto cada).

4.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os tecidos foram coletados e fixados por 4-6 horas em solução Karnovsky (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2). Após, os órgãos foram processados para microscopia eletrônica, com protocolo adaptado para tecido nervoso, devido à dificuldade de infiltração da resina Spurr na substância branca da medula espinhal.

Os tecidos foram lavados 3 vezes por 15 minutos em tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,2) e pós fixados em capela com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8% por 1 hora no escuro. Em seguida o material foi lavado novamente com tampão cacodilato por 15 minutos, 3 vezes, e com água destilada. A contrastação *in block* foi realizada com acetato de uranila 0,5% diluído em água, por no mínimo 2 horas na geladeira. Em seguida lavou-se com água destilada por 2 vezes e depois o material foi desidratado em gradientes de acetona de 30%, 50%, 70%, 90% por 15 minutos cada e com acetona 100% por 10 minutos, 2 vezes. A infiltração gradual foi com acetona 100% e resina Spurr na proporção 4:1 respectivamente, depois por 3:1 (6 horas), 2:1 (12 horas), 1:1 (24 horas), 1:2 (24 horas) e resina pura por até 6 horas com as tampas dos ependorfs abertas para evaporação da acetona residual.

A inclusão do material foi feita com resina pura em fôrmas de silicone e os fragmentos identificados, inclusive em ata de controle do laboratório de Microscopia Eletrônica, ficando em estufa de 60°C em média, por no mínimo 2 dias para polimerização. Depois, com os blocos prontos, foram aparados com lima e em ultramicrótomo (Reichert, modelo Supernova), feitos cortes semifinos de 1µm de espessura e corados com azul de toluidina para visualização em

microscópio de luz e escolha das regiões de interesse. Após, foram feitos cortes ultrafinos (70-90nm de espessura) de coloração prata a dourado, colocados sobre telas de cobre de 200 mesh, contrastados com acetato de uranila 2% por 40 minutos e citrato de chumbo por 15 minutos. Depois de 1 dia em média, eram analisados em MET (Jeol JEM 1011) e fotodigitalizados com sistema de aquisição de imagens UltraScan – software Digital Micrograph 3.6.5 (GATAN, EUA).

Para a caracterização das amostras de PAM, estas foram processadas de duas formas:

(a) Solubilizadas em água destilada ou soro fisiológico para visualização das microesferas e;

(b) solubilizadas em tampão fosfato com pH 2,6 para as nanopartículas. A acidificação da solução neste caso foi para aumentar a dispersão das nanopartículas (Vianna, 2006) e facilitar a contagem, porque quando solubilizadas em BSA (forma utilizada para administração nos camundongos), formavam aglomerados que inviabilizavam a contagem do diâmetro modal. Em pH ácido a dispersão é facilitada por aumentar a repulsão entre as nanopartículas e por desnaturar (dependendo do tempo de exposição) os polímeros de albumina e romper as ligações éster entre ambos.

Após, o PAM foi fotografado em MET e mensurados os diâmetros das microesferas e nanopartículas (n=500) por computador pelo programa ImagePro Plus 5.1 (Silveira, 2006).

5. Resultados

5.1. Caracterização das Amostras

O PAM foi caracterizado em morfologia e tamanho por MET. Através desta técnica, por observação direta das imagens foram determinados o diâmetro físico das microesferas, nanopartículas e a lei de distribuição dos diâmetros (diâmetro modal) com ajuste para a polidispersão segundo uma lognormal (Silva, 2006b).

Duas amostras de lotes diferentes, mas teoricamente com as mesmas características, foram utilizadas. A amostra 1 (Figs. 10 e 11) foi utilizada nos tecidos para microscopia de luz e amostra 2 (Figs. 13 e 15) nos tecidos para MET.

5.1.1. Amostra 1: Tamanho das Nanopartículas

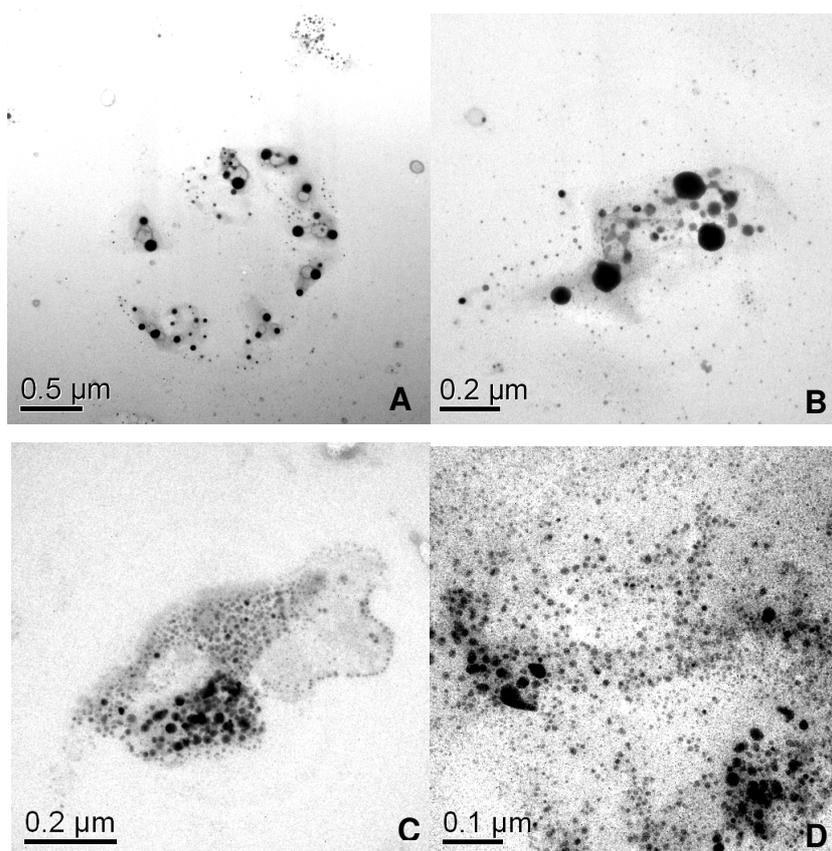


Figura 10: Amostra 1 - Micrografias em MET das nanopartículas demonstrando a variabilidade de tamanho. (A)40.000 X; (B)100.000X (C)150.000X; (D)200.000X.O tempo de exposição ao pH ácido foi de 2 dias (perda da albumina).

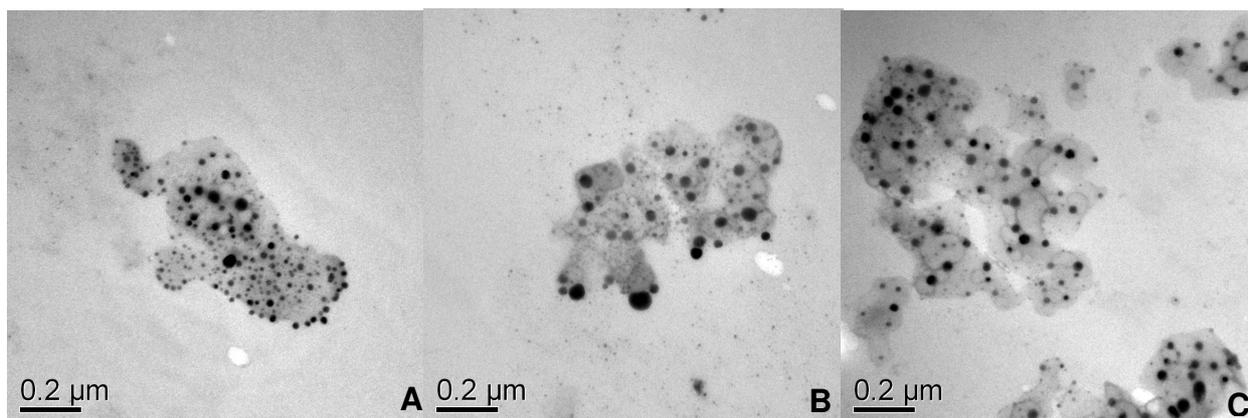


Figura 11: Amostra 1 - Micrografias em MET das nanopartículas. (A)100.000 X; (B)100.000X (C)100.000X. O tempo de exposição ao pH ácido foi de 30 minutos (desnaturação parcial da albumina, caracterizada como uma matriz esponjosa).

A observação direta da amostra 1 demonstrou que as nanopartículas são aproximadamente esféricas e apresentam polidispersão no tamanho, variando de 154nm a 4nm (Figs. 10 e 11). O histograma e o gráfico de ajuste de polidispersão dos dados do mesmo (Fig. 12) mostram um diâmetro modal (D_M) de 9,2nm e desvio (σ) de 0,34.

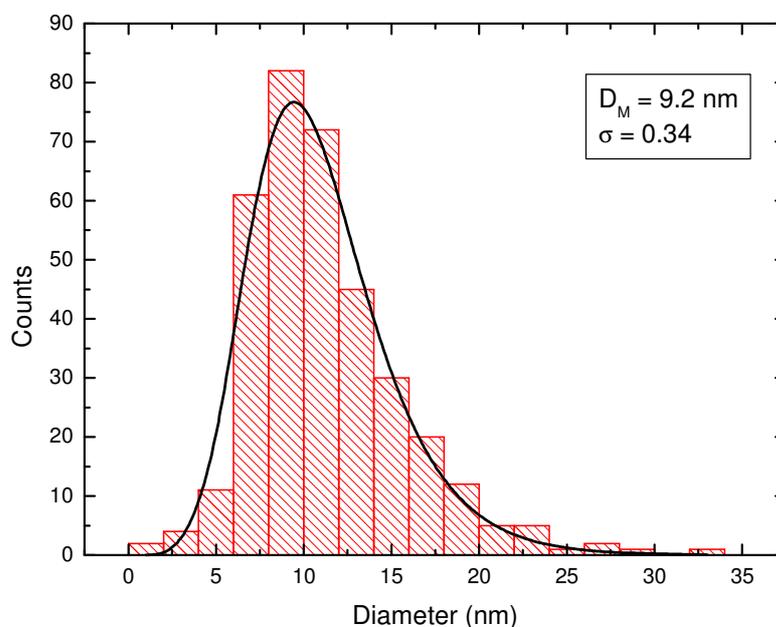


Figura 12: Histograma de distribuição dos diâmetros das nanopartículas da amostra 1. A linha cheia representa o melhor ajuste para a polidispersão segundo uma lognormal (Elói M.T., IF- UnB, comunicação pessoal).

Para esta amostra não foi mensurado o diâmetro modal das microesferas porque formavam aglomerados não individualizados de difícil caracterização. A amostra foi preparada de 2 formas em pH ácido, variando apenas o tempo de exposição, resultando na visualização apenas das nanopartículas na Figura 10 (2 dias) e das nanopartículas com matriz de albumina parcialmente desnaturada na Figura 11 (30 minutos).

5.1.2. Amostra 2: Tamanho das Microesferas e Nanopartículas

Para a amostra 2 foram caracterizados as microesferas (Fig. 13) e nanopartículas (Fig. 15). A amostra 2 foi modificada para resolver problemas de diluição e aplicação *in vivo*, presentes na amostra 1. As modificações basicamente alteraram os tamanhos modais das microesferas e nanopartículas.

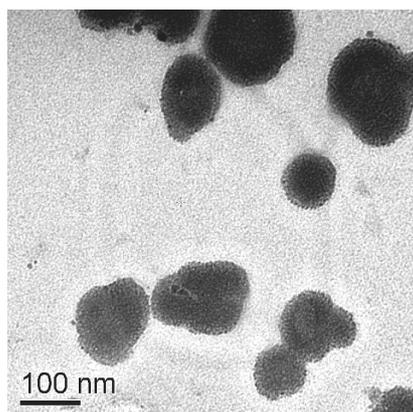


Figura 13: Amostra 2 - Fotografias em MET das microesferas, 200.000 X. (Figueiredo L.C., IF-UnB, comunicação pessoal).

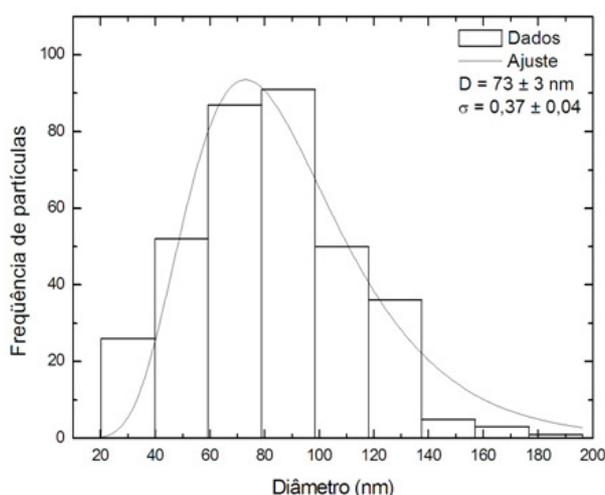


Figura 14: Histograma de distribuição dos diâmetros das microesferas da amostra 2.

Com base no histograma para microesferas (Fig. 14), as mesmas apresentam diâmetro modal (D_M) de 73 nm e desvio (σ) de 0,37.

O histograma apresenta a linha de ajuste com o máximo um pouco deslocado para a esquerda porque existe um maior número de microesferas nesta região. As três partições no final do histograma são baixas porque apresentam poucas microesferas com diâmetros acima de 73 nm (Figueiredo, L.C., comunicação pessoal).

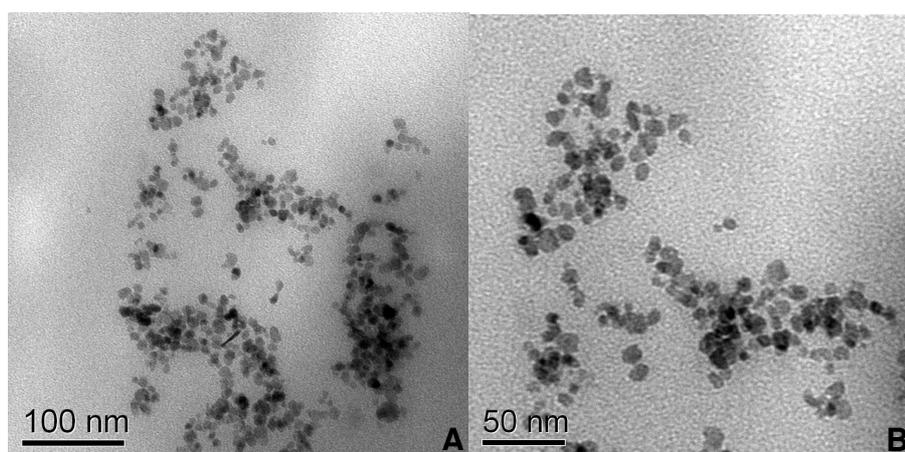


Figura 15: Amostra 2 – Fotografias de MET das nanopartículas. (A)300.000 X; (B)500.000X.

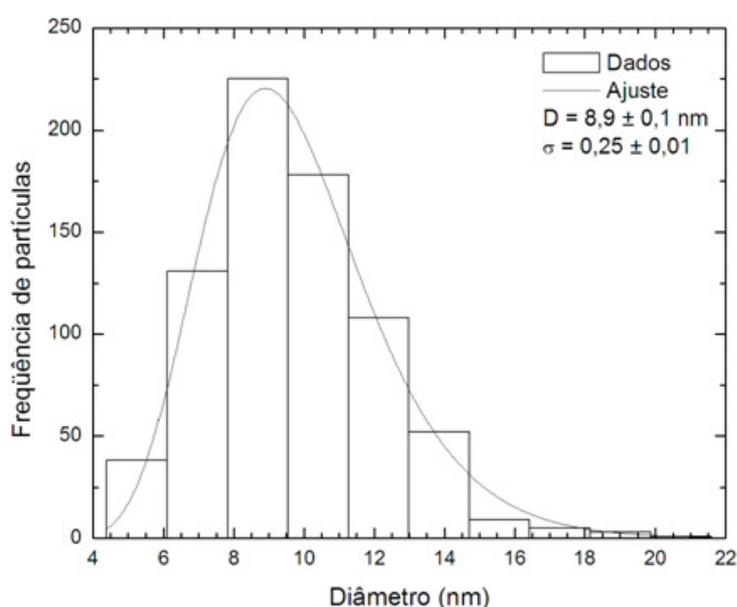


Figura 16: Histograma de distribuição dos diâmetros das nanopartículas da amostra 2 (Figueiredo, L.C., comunicação pessoal).

A partir dos dados obtidos da Figura 15, demonstrou-se que as nanopartículas são aproximadamente esféricas e mais monodispersas em relação à amostra 1. O histograma e o gráfico de ajuste de polidispersão da amostra 2 (Fig. 16) mostram um diâmetro modal (D_M) de 8,9 nm e desvio (σ) de 0,25, aproximadamente.

5.2. Análise Histológica dos tecidos

Dos tecidos nervosos coletados para o estudo foram realizadas análises histológicas em microscopia de luz com aumentos que variam de 20x a 100x nas colorações de H&E e Perls. A partir da histologia fez-se dois gráficos de distribuição do ferro nas duas formas possíveis: (a) pigmento férrico, de coloração marrom (H&E e Perls) (Gráfico 1); (b) ferrocianeto férrico (íons de Fe^{+3}) de coloração azul (Perls) (Gráfico 2). Estes gráficos foram feitos de forma subjetiva, quantificando as intensidades de ocorrência do pigmento férrico e do ferrocianeto férrico (íons de Fe^{+3}), por números de cruzes. Por exemplo, controles: 0 a 1 cruz (neurônios com grânulos de neuromelanina (Fig.4)), tratados: acima de 2 cruzes variando em função do número de fotografias com marcações positivas para cada tempo e tipo celular.

Como primeiro resultado confirma-se a capacidade de PAM ultrapassar a BHE e atingir diferentes regiões do SN desde o plexo coróide, neurópilo e todos os tipos celulares. Os tipos celulares incluem as hemácias, células da BHE, células ependimárias e plexo coróide, células da glia e neurônios.

(A) Pigmento Férrico

O pigmento férrico observado pode representar duas possibilidades: (a) PAM nos tempos iniciais e/ou; (b) aglomerados de ferritinas, que podem ter 2 origens: metabolização de PAM nos tempos mais tardios e fisiológica.

O pigmento férrico está presente dentro das células como aglomerados citosólicos e como única exceção, disperso no interstício do plexo coróide. Predomina nas hemácias e neurônios da substância cinzenta, e nas células da glia da substância branca.

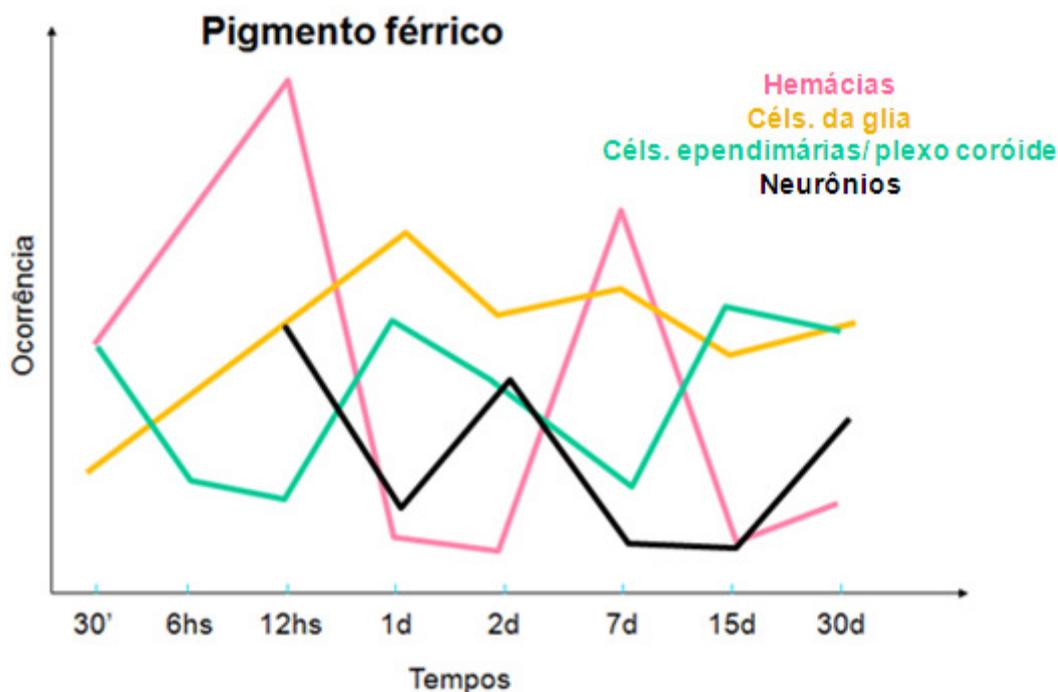


Gráfico 1: Distribuição de pigmento férrico no SN após tratamento com PAM em função do tempo e tipos celulares.

A evolução da ocorrência do pigmento aparentemente segue um padrão (Gráfico 1), ou seja, começa nas hemácias atingindo um pico de 12 horas, seguido da resposta dos outros tipos celulares. Em primeiro as células da glia, depois pelas células ependimárias e do plexo coróide como uma segunda resposta, e por último pelos neurônios. A primeira resposta das células do plexo está em concordância com o surgimento nas hemácias. O mesmo padrão é semelhante após o segundo pico das hemáceas com 7 dias.

Em comparação com os controles, nenhuma alteração patológica como infiltrados inflamatórios, ou qualquer tipo de degeneração ou modificações celulares foram detectadas, exceto pela presença de pigmento férrico nas células dos tecidos tratados com PAM, que serão discriminadas a seguir.

As **hemácias** foram o principal tipo celular com pigmento férrico e a maior quantidade destas nos capilares, ocorreu com 12 horas (Figs. 18 19), decaindo em seguida e subindo novamente com 7 dias (Fig. 20B), (Gráfico 1). Os principais locais nos quais foram visualizados capilares com mais hemácias com PAM foram o córtex cerebral (Figs. 17A, 18B, 19B), córtex do cerebelo (Fig. 19A), córtex da medula (Fig. 18A) e regiões dos OCV (Fig. 17B). Aparentemente não foi notada nenhuma alteração morfológica nas hemácias com o pigmento férrico, em comparação com os controles (Fig.20 A1, A2).

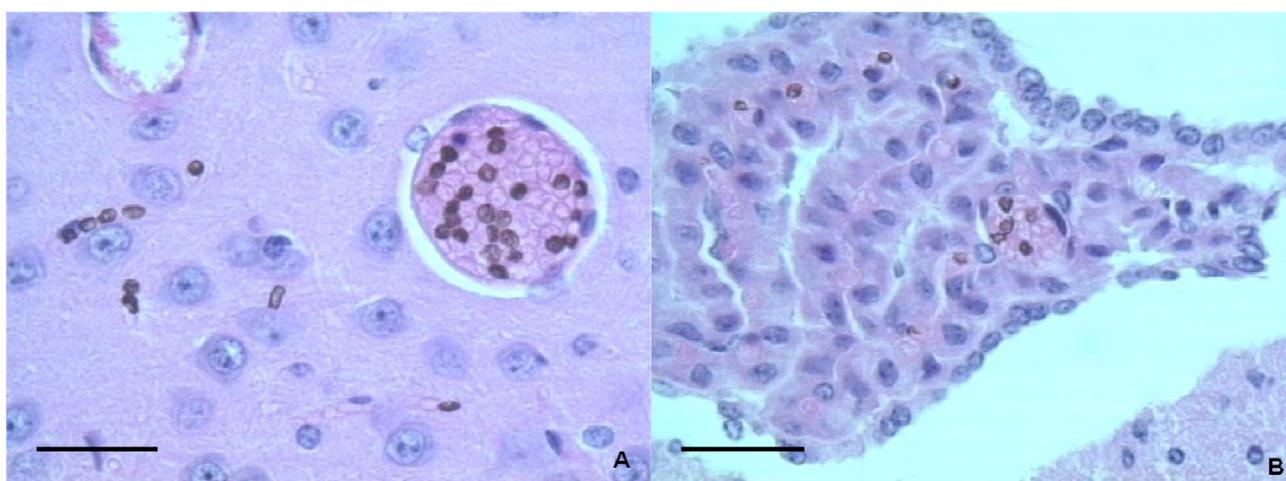


Figura 17: Hemáceas com pigmento férrico, H&E, - (A) Capilar do córtex, (B) Capilar do plexo coróide. 30 minutos. Barra: 50 μ m.

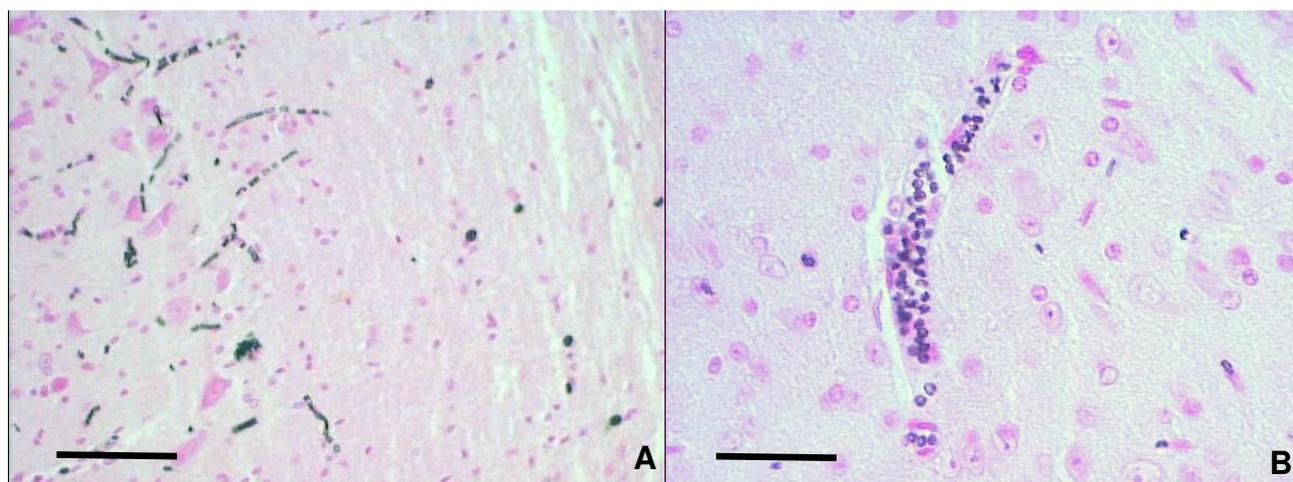


Figura 18: Hemáceas com pigmento férrico, Perls, 12 horas – (A) Transição entre substância cinzenta (esquerda) e substância branca (direita), capilares da medula, Barra: 100 μ m. (B) Capilar do córtex, Barra: 50 μ m.

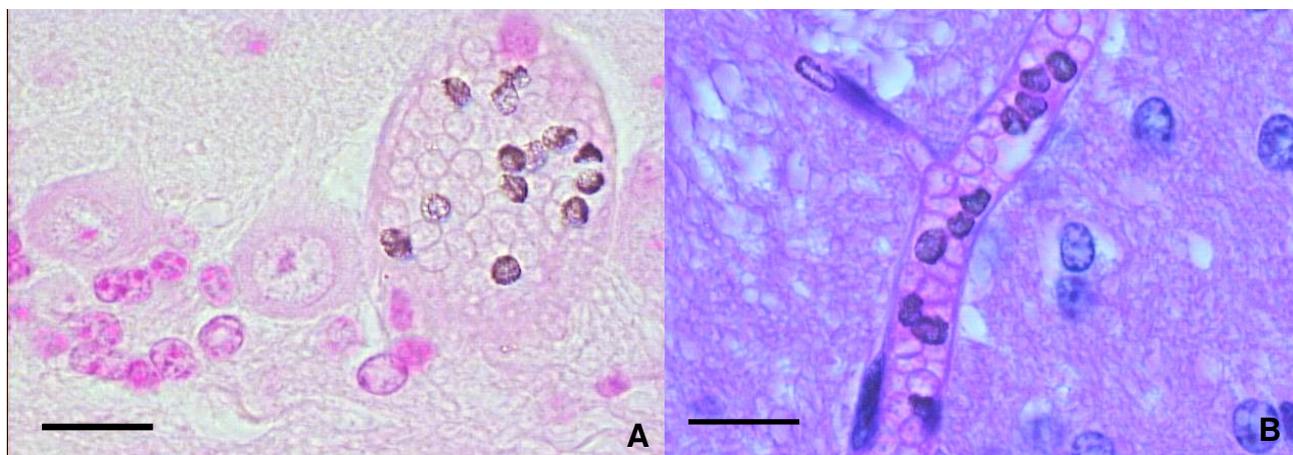


Figura 19: Hemáceas com pigmento férrico – (A) Capilar do cerebello, 12 horas; Perls; (B) Capilar do cérebro, H&E, 12 horas; Barras: 20µm,

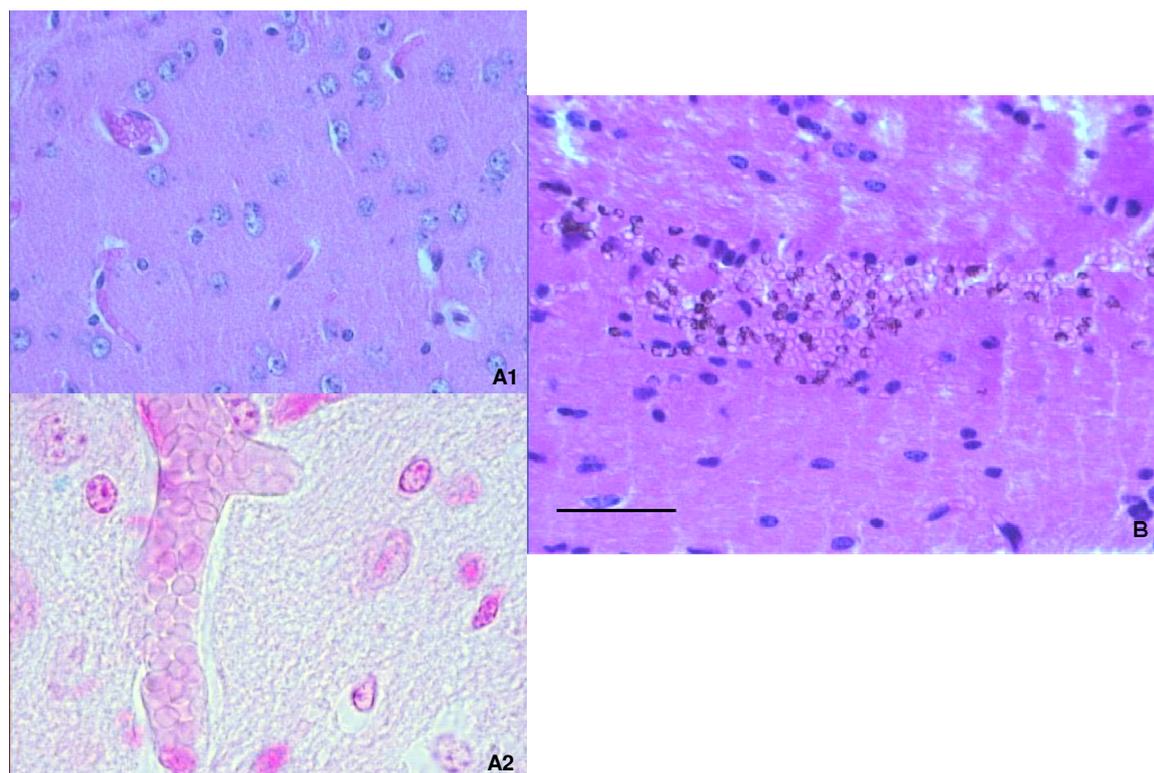


Figura 20: Hemácias – (A1) Controle, 30 minutos, H&E; (A2) Controle, 12 horas, Perls; (B) Hemácias com pigmento férrico - Capilar do cérebro, H&E, tratado, 7 dias. Barra: 50µm.

Não foi observada uma freqüência elevada, mas quando as **células da BHE** foram atingidas (Fig. 21), o pigmento férrico estava presente em célula endotelial e pericito. Os poucos capilares em que foi possível discriminar as células da BHE com pigmento férrico foi no cerebelo (Fig. 21) e córtex do cérebro (não demonstrado).

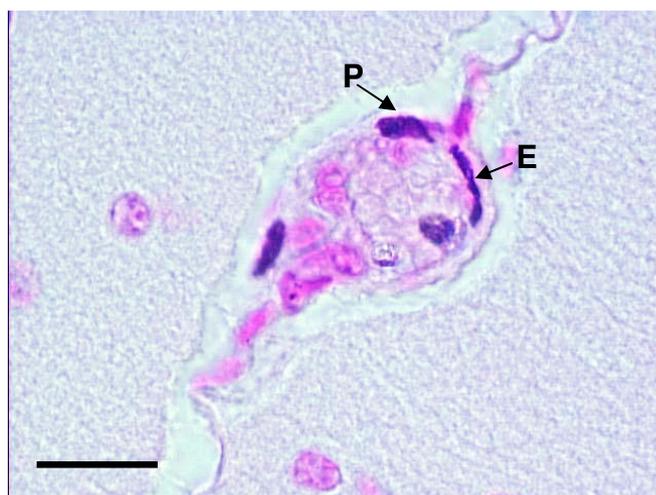


Figura 21: Células da BHE com pigmento férrico –. Perls, 12 horas; Cel. Endotelial (E), pericito (P); Barra: 20 μ m.

As **células endimárias** (Fig. 22) e do plexo coróide (Fig. 23) com pigmento férrico começam a aparecer no mesmo tempo em que surgiu nas hemácias, decaindo em seguida e subindo novamente até atingir os 2 picos após os picos das hemácias (Gráfico 1). Com 1 dia após o tratamento, foi observada a presença de aglomerados marrons como o pigmento férrico no interstício do plexo coróide (Fig. 24), indicando a presença de PAM ainda não interiorizado pelas células.

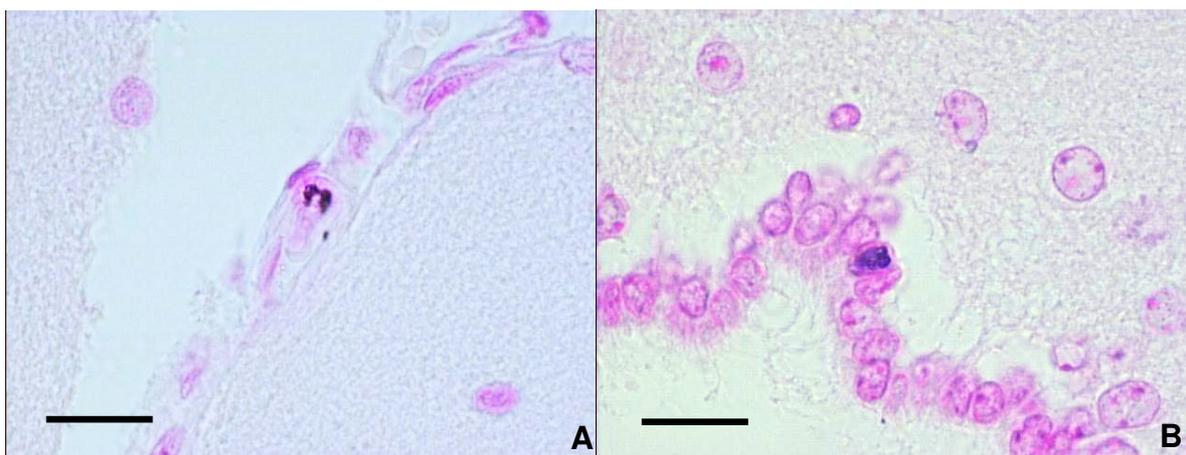


Figura 22: Células Ependimárias com pigmento férrico, Perls – (A) Célula da Pia-máter, 6 horas; (B) Célula do canal medular, 2 dias. Barra: 20µm

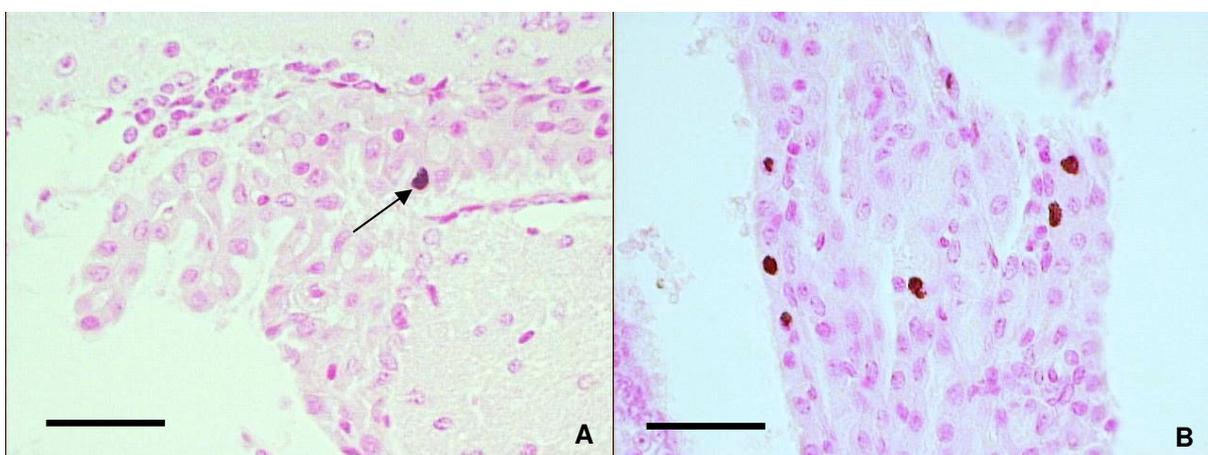


Figura 23: Células do Plexo Coróide, Perls – (A)12 horas, (B)15 dias, Barra: 50 µm.

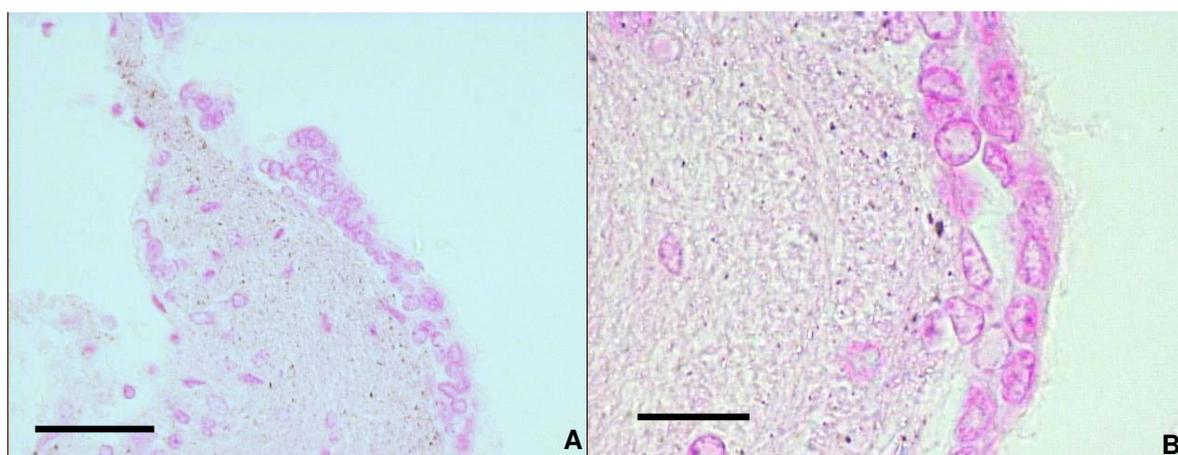


Figura 24: Interstício do Plexo Coróide com Pigmento férrico, Perls, 1 dia – Único caso em que pigmento férrico não está no interior das células. (A) Barra: 50µm; (B) Barra: 20µm.

As **células da glia** acompanharam o padrão após os picos das hemácias, mas aparentemente é o grupo com mais células apresentando o pigmento férrico e por mais tempo. Estas células com pigmento férrico estão presentes tanto na substância cinzenta, que pode ser na maioria astrócitos (Figs. 25A e 26), como na branca, que neste caso, a maioria pode ser oligodendrócitos (Fig. 25B).

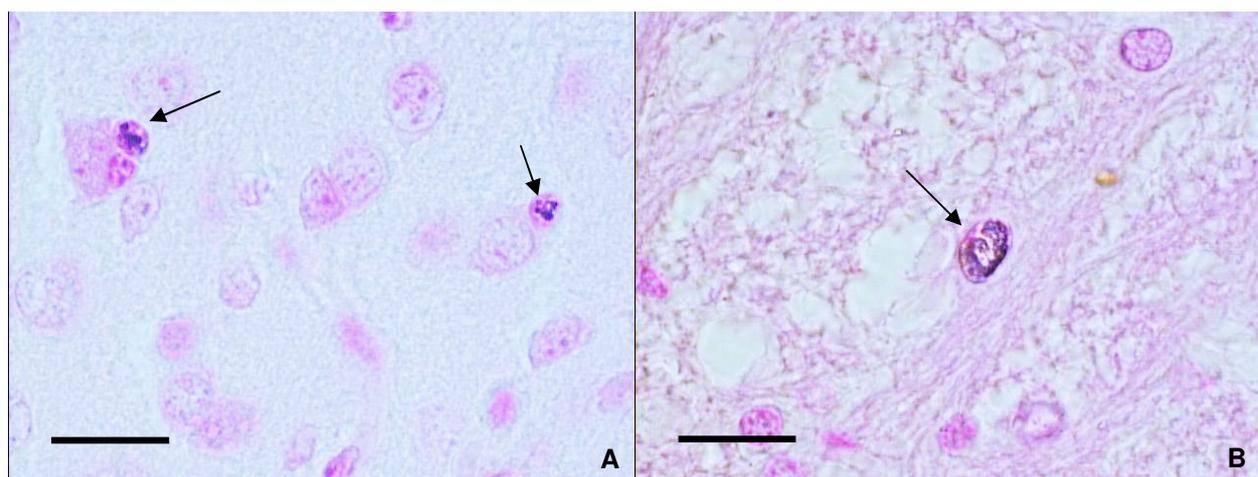


Figura 25: Células da Glia com Pigmento férrico – Perls, (A) 6hs; (B) 12hs. Barra: 20 μ m.

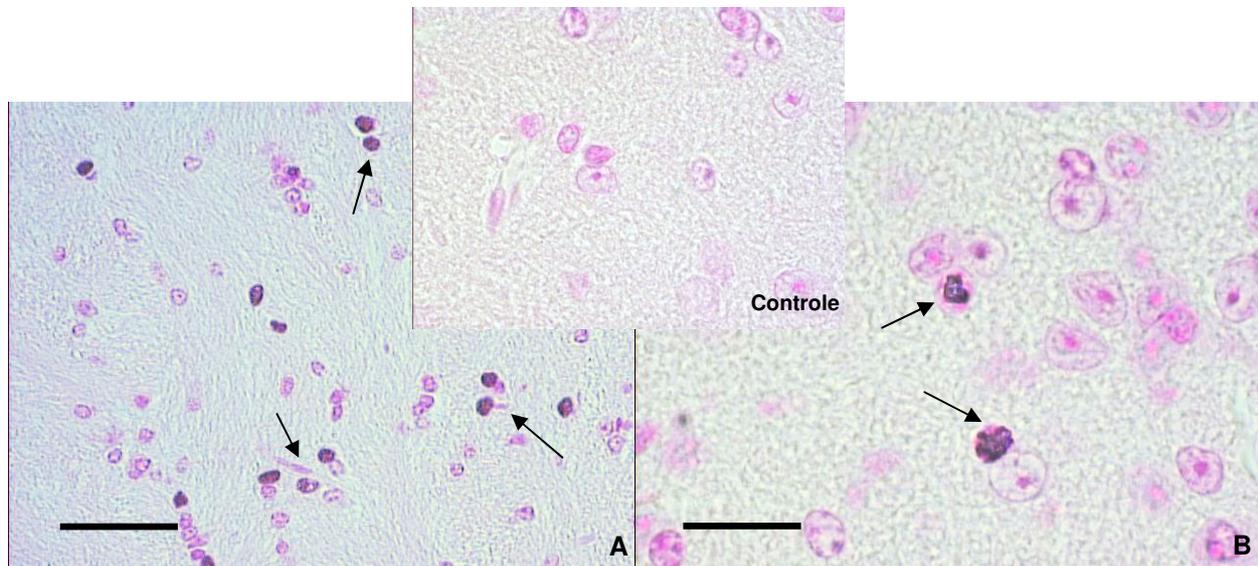


Figura 26: Células da Glia com Pigmento férrico – Perls, (A) 1 dia, Barra: 50 μ m; (B) 30 dias, Barra: 20 μ m.

Os **neurônios** foram os últimos a responderem ao tratamento com PAM aparecendo somente a partir das 12 horas, mas também acompanhando o padrão após o pico das hemácias (Fig. 27). Os neurônios com maior quantidade de pigmento férrico foram os neurônios menores da camada granular do cerebello (Fig 27A, B). Nos neurônios do córtex do cérebro não foi freqüente a visualização dos aglomerados de pigmento férrico e quando presentes eram pequenos e estavam no citoplasma (Fig. 27C, D)

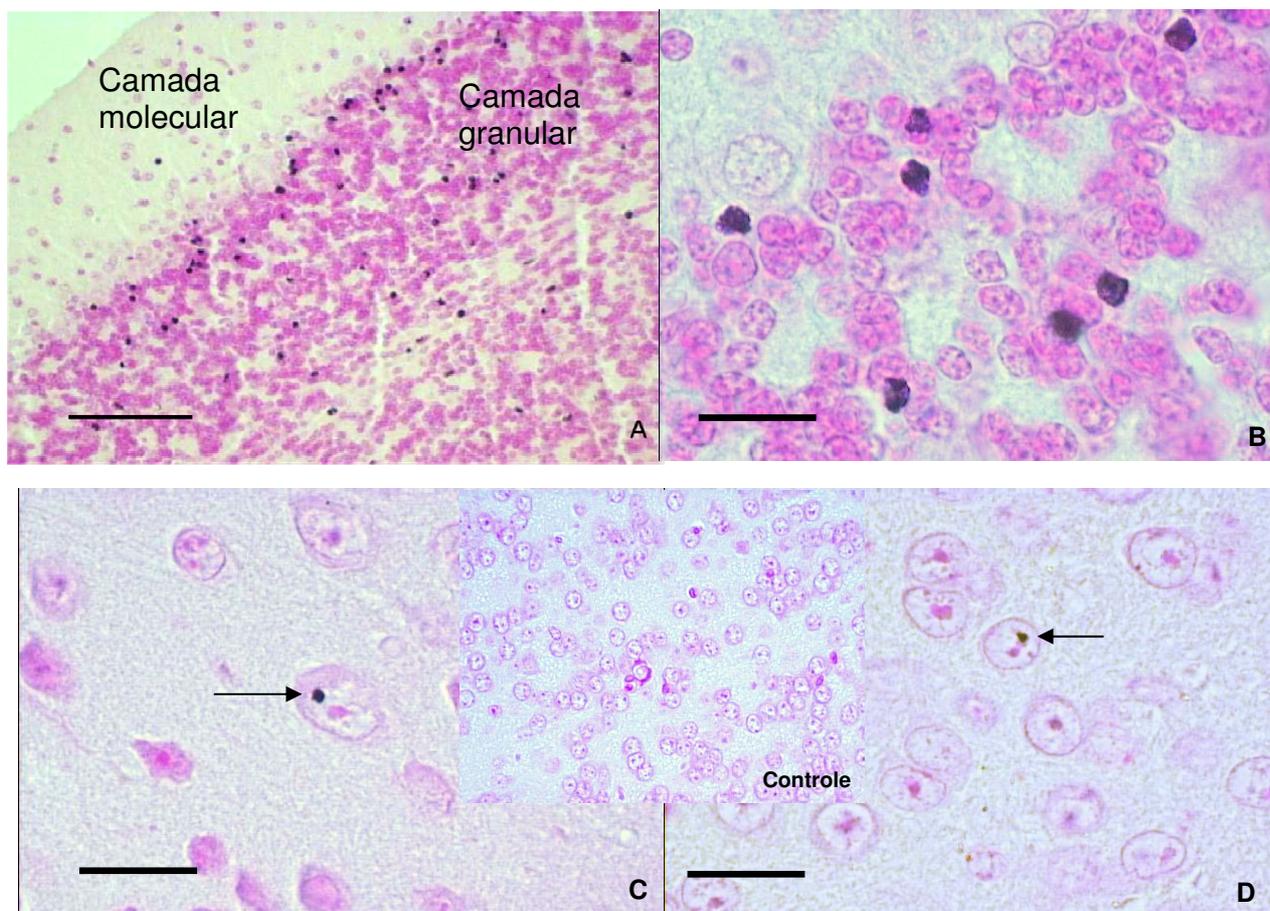


Figura 27: Neurônios com Pigmento férrico – Perls, (A) Camadas do cerebello, **(B)** Neurônios menores da camada granular, 12 horas; Neurônios do córtex do cérebro, **(C)** 12 horas, **(D)** 2 dias. Barras: A: 100 μ m, B,C,D: 20 μ m

(B) Ferrocianeto Férrico (íons de Fe^{+3})

Este pigmento é produzido artificialmente pela reação de íons férricos (Fe^{+3}) com ferrocianeto de potássio, produzindo uma coloração azul brilhante de ferrocianeto férrico. Esta histotécnica é denominada azul prussiano ou coloração de Perls (Lillie, 1965).

As origens do Fe^{+3} em modelos biológicos *in vivo* ou *in vitro* podem ser fisiológica, ou induzida pela adição de compostos ricos em ferro, neste caso o PAM. Teoricamente o PAM após ser introduzido nos camundongos, as NM seriam metabolizadas e dissociadas apenas em Fe^{+3} porque a composição é de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

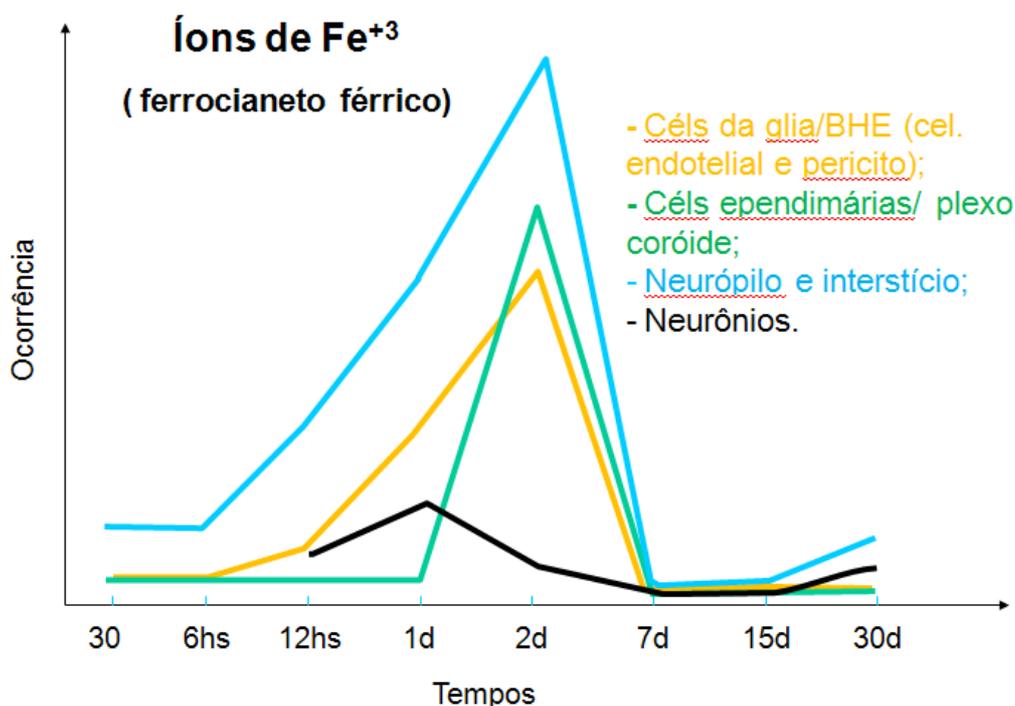


Gráfico 2: Distribuição de íons de Fe^{+3} (ferrocianeto férrico) no SN após tratamento com PAM em função do tempo e tipos celulares.

O pigmento azul está presente dentro das células do SN (células da BHE, endimárias, da glia e neurônios) e principalmente no neurópilo, o que pode sugerir a dissociação do ferro das NM. Não está presente nas hemácias.

O padrão de ocorrência do pigmento é semelhante para todos os tipos celulares e regiões alvos, ou seja, começa a partir de 30 minutos no neurópilo e 6

horas após tratamento, nas células, atingindo o máximo com 2 dias e em seguida decresce. Começa a reaparecer com 15 dias no neurópilo e com 30 dias nos neurônios. O aparecimento e o pico de íons de Fe^{+3} são sempre após o aparecimento e picos de pigmento férrico, podendo indicar a metabolização do PAM. Não foi observada nenhuma alteração patológica em comparação com os controles, a não ser a presença de ferrocianeto férrico. A seguir estão discriminados os tipos celulares e regiões alvos.

O **Neurópilo e Interstício** são as regiões com maior quantidade de ferrocianeto férrico no SN, principalmente no cérebro. Íons de Fe^{+3} começaram a aparecer com 30 minutos (Fig. 28) e atinge o pico com 2 dias, desaparecendo com 7 e 15 dias, mas retornando com 30 dias em pouca quantidade (Fig. 29).

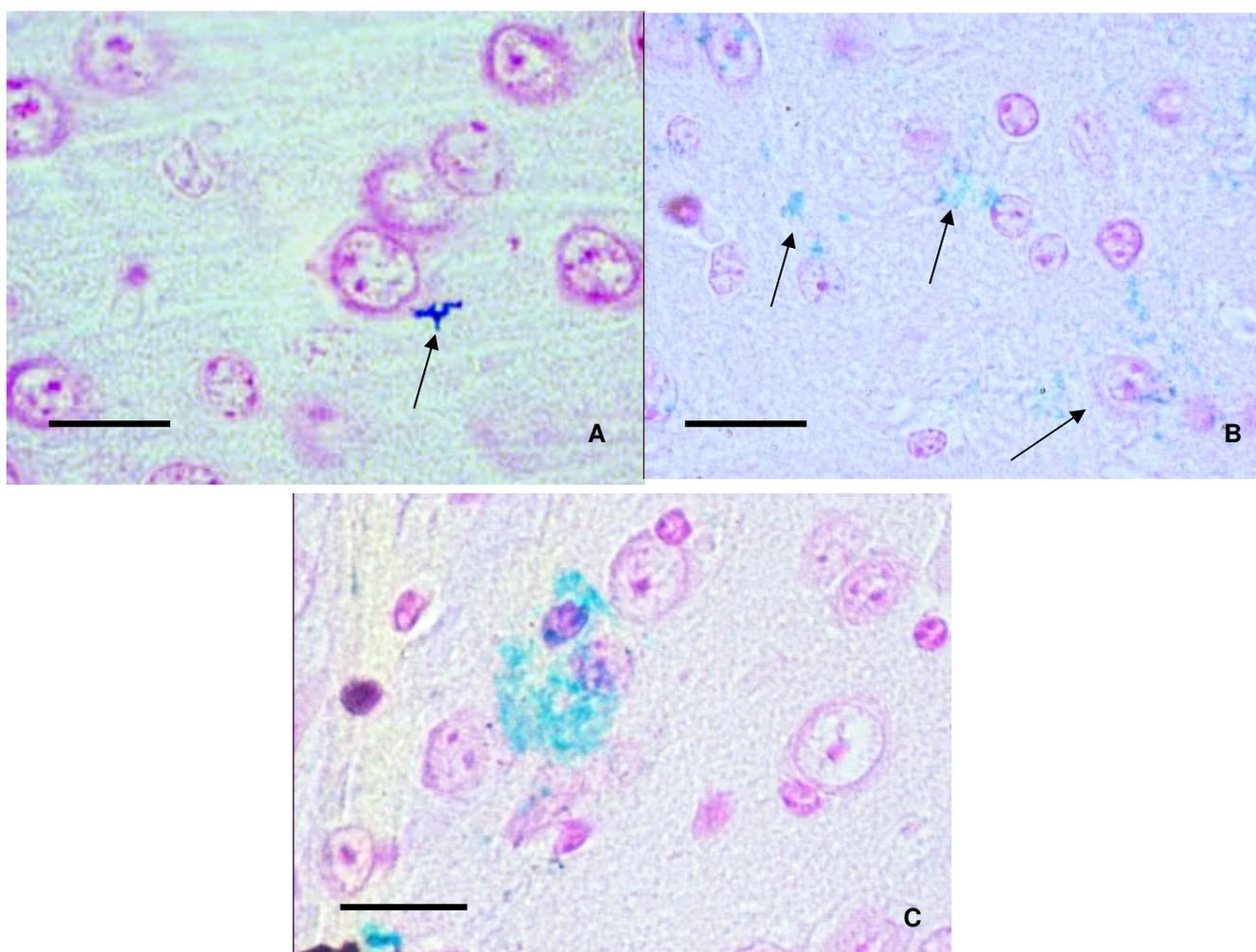


Figura 28: Progressão do aparecimento de ferrocianeto férrico no neurópilo do cérebro. (A) 30 minutos; (B) 12 horas, (C) 1 dia. Barras:20 μm .

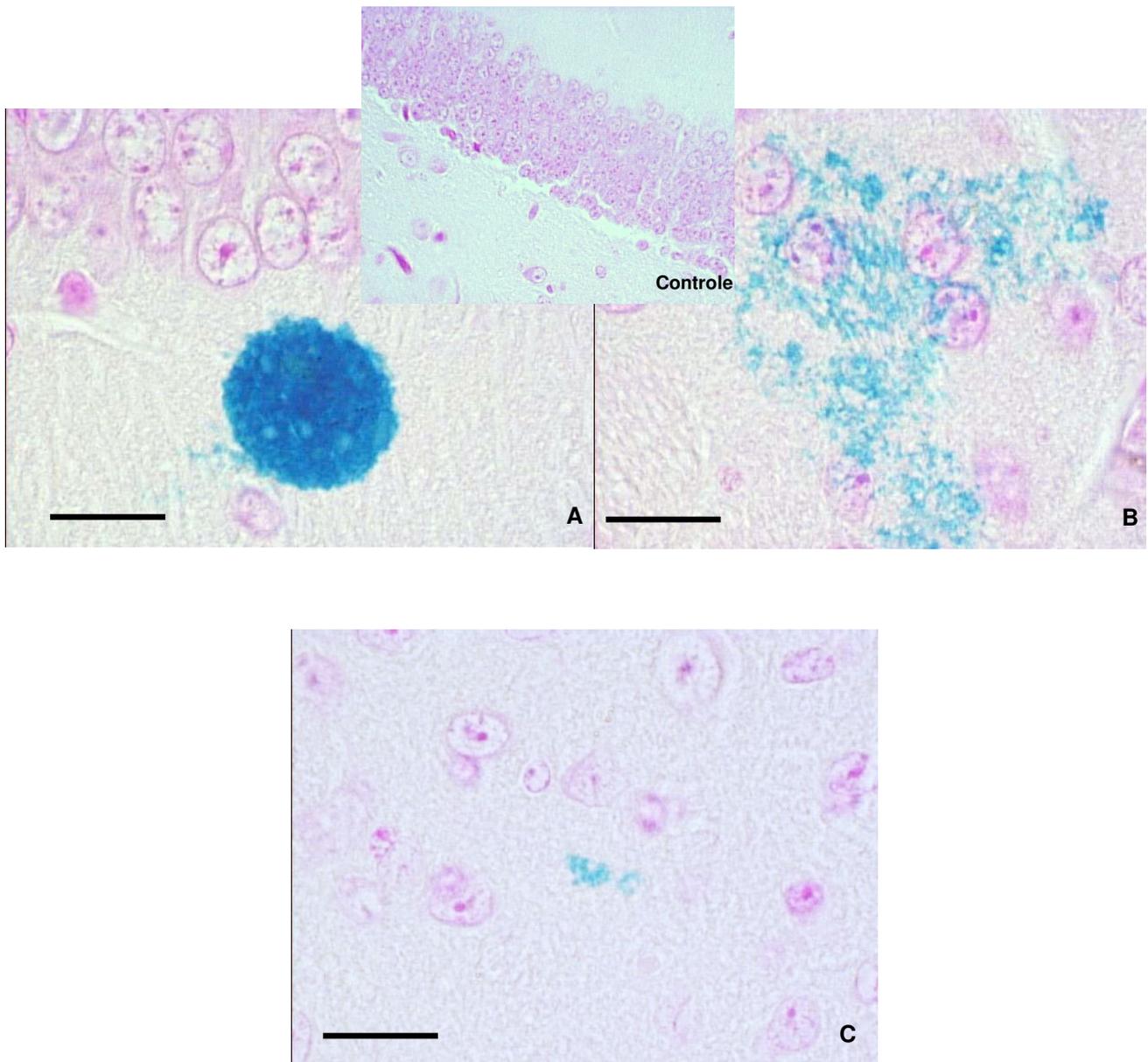


Figura 29: Neurópilo com ferrocianeto férrico no cérebro, – (A) Aglomerado de PAM com aproximadamente 30μm de diâmetro, 2 dias; **(B)** Íons de Fe⁺³ dispersos e ao redor de neurônios, 2 dias; **(C)** 30 dias. Barras: 20μm.

Nas **Células Ependimárias e Plexo coróide** os íons de Fe^{+3} apareceram significativamente com 1 dia neste tipo celular, atingindo o pico em 2 dias (Fig. 30) e desaparecendo nos tempos restantes.

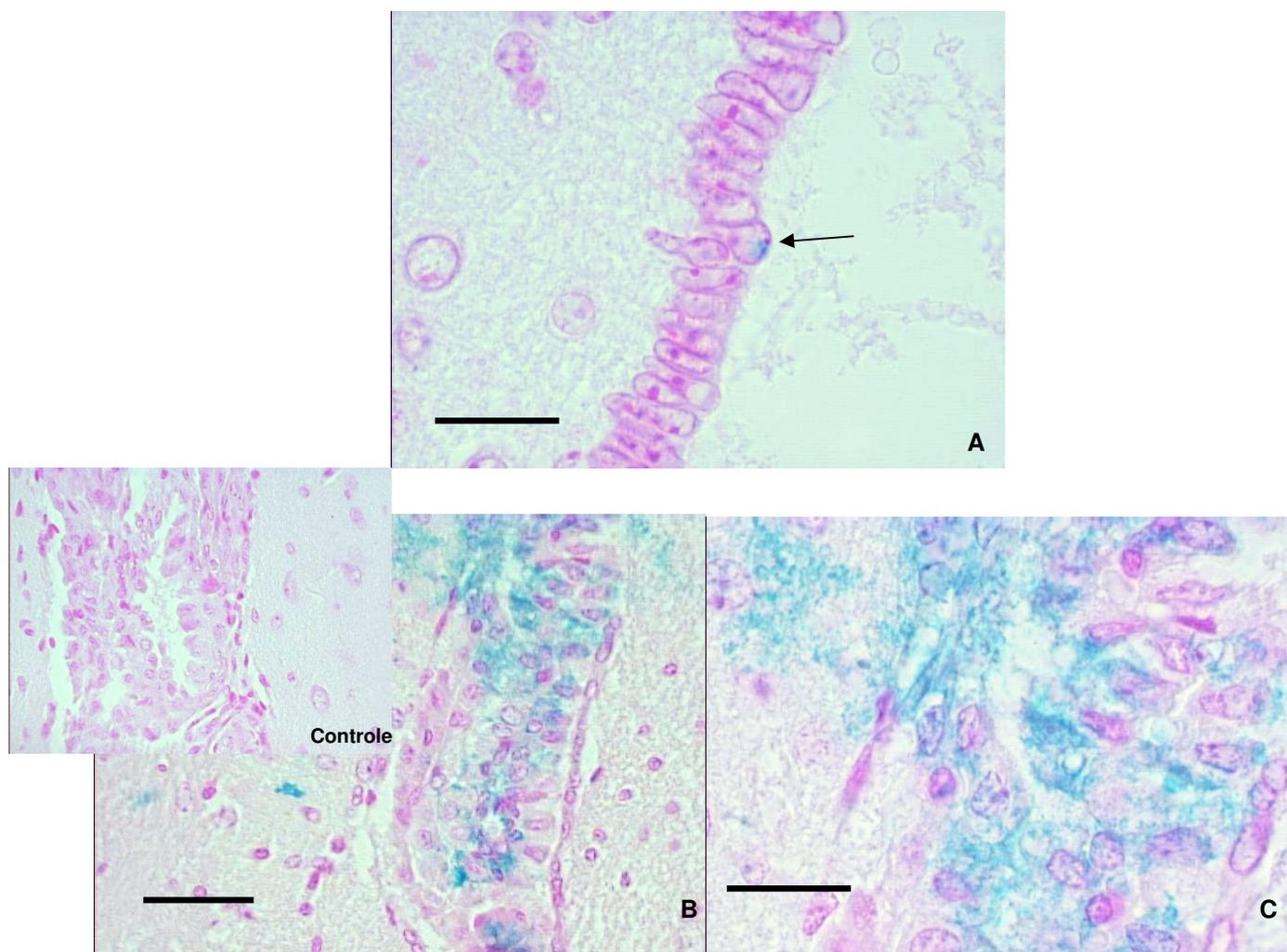


Figura 30: Célula Ependimária e do plexo coróide com ferrocianeto férrico – (A) No canal medular, 2 dias; (B), (C) Células do plexo coróide, 2 dias. Barras: A,C: 20 μm , B:50 μm .

Nas Células da Glia e BHE, acompanhando o mesmo padrão, o pico de Fe^{+3} acontece com 2 dias, não sendo observado nos demais tempos (Fig. 31).

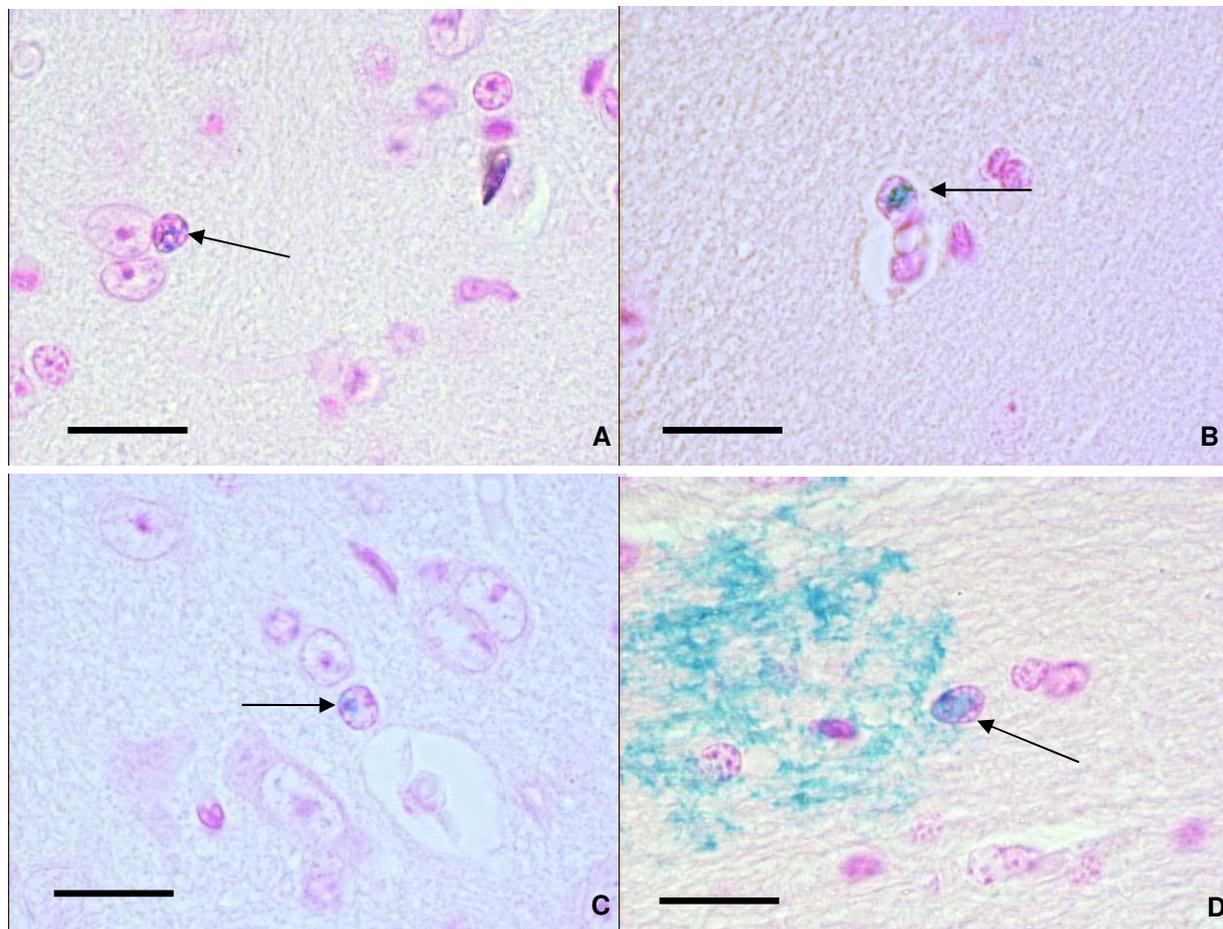


Figura 31: Células da glia com ferrocianeto férrico – (A) 1 dia; (B) Células da BHE, 1 dia; (C) 2 dias; (D) Células da glia e neurópilo, 2 dias. Barras: 20 μm .

Íons de Fe^{+3} começaram a ser visíveis nos **neurônios** com 12 horas (Fig. 32 A) assim como para o pigmento férrico, atingindo o pico com 1 dia (Fig. 32B, C). Nos tempos seguintes decresce, não aparecendo para 7 e 15 dias, mas reaparecendo com 30 dias (Fig. 32D). Neste tempo, o pigmento de ferrocianeto férrico aparece no citoplasma dos neurônios com acumulação variável e granular, próximo ao núcleo e proeminente em um dos pólos do corpo celular.

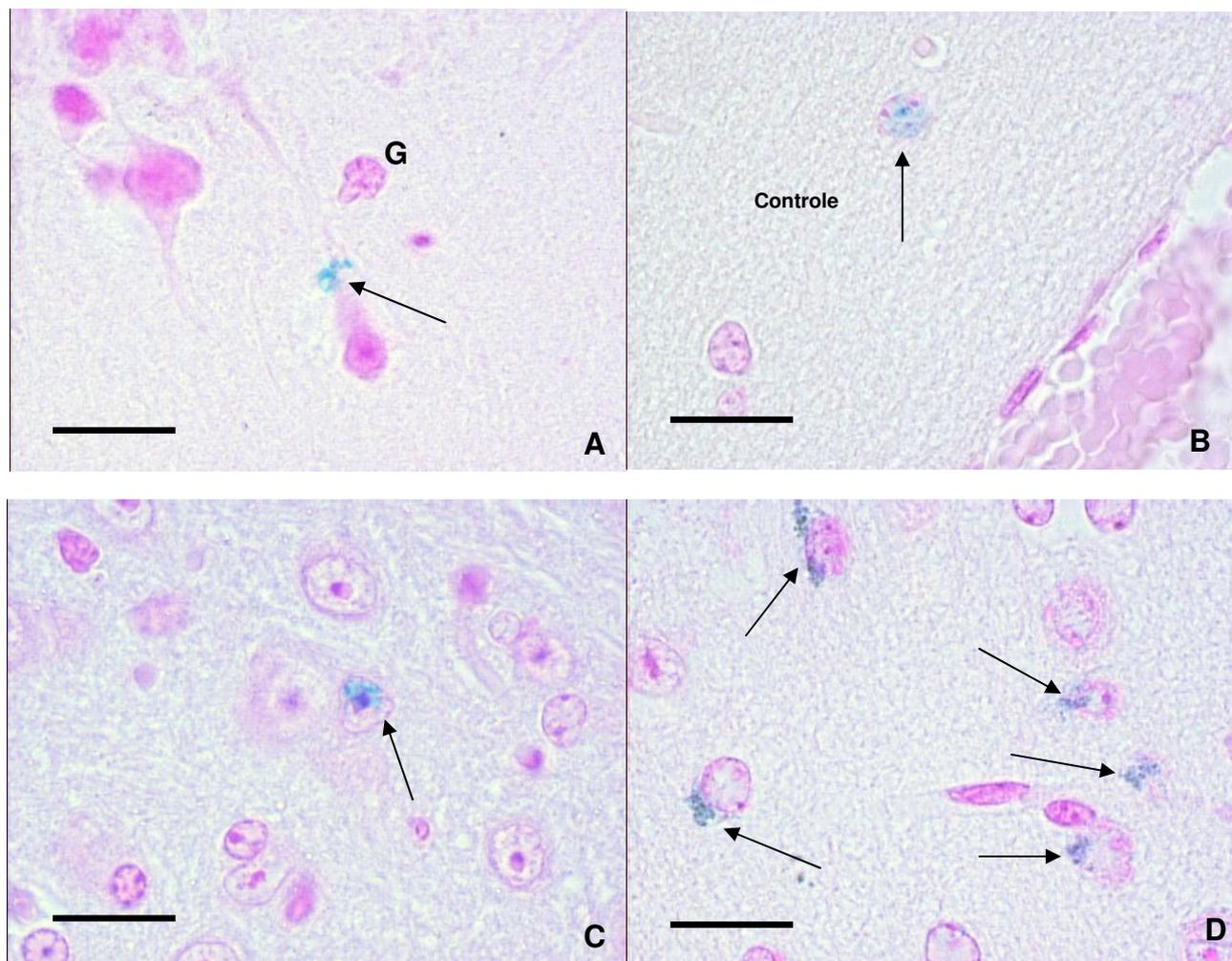


Figura 32: Neurônios com ferrocianeto férrico – (A) 12 horas, próximo ao cone de implantação do neurônio do córtex cerebral; **(B)** e **(C)** 1 dia; **(D)** 30 dias. Barras: 20µm. G: célula glial.

5.3. Análise Ultra-estrutural dos tecidos

Confirmada a capacidade de PAM ultrapassar a BHE, foi necessário definir a distribuição e localização nas células atingidas.

As principais localizações de PAM nos diferentes tipos celulares do SN foram as organelas citoplasmáticas com membranas biológicas (vesículas endocíticas, corpos multivesiculares, peroxissomos/lisossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndrias, bainhas de mielina, membranas nucleares, vesículas sinápticas e fagossomos) e sem membranas biológicas (lipofucsina e cisternas).

Alterações provavelmente provocadas por PAM foram visualizadas apenas em bainhas de mielina, axônios e mitocôndrias.

As **vesículas endocíticas** possuem uma membrana e são formadas quando alguma molécula ou nutriente é interiorizado via receptor. Esta organela com PAM foi vista apenas em fagócitos como monócitos (Fig. 33) e microglia do SN (Fig. 34), e em células da BHE, principalmente nas células endoteliais (Figs. 35, 36) nos tempos iniciais.

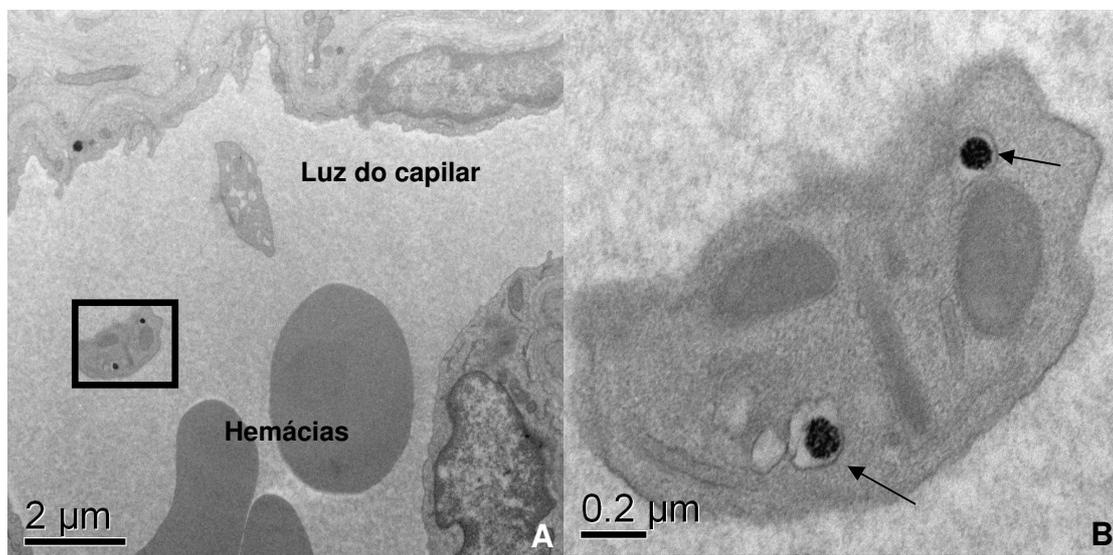


Figura 33: PAM em vesículas endocíticas (Setas) de um prolongamento de monócito no capilar do cerebelo – (A) 30 minutos, 12k; (B) 80k

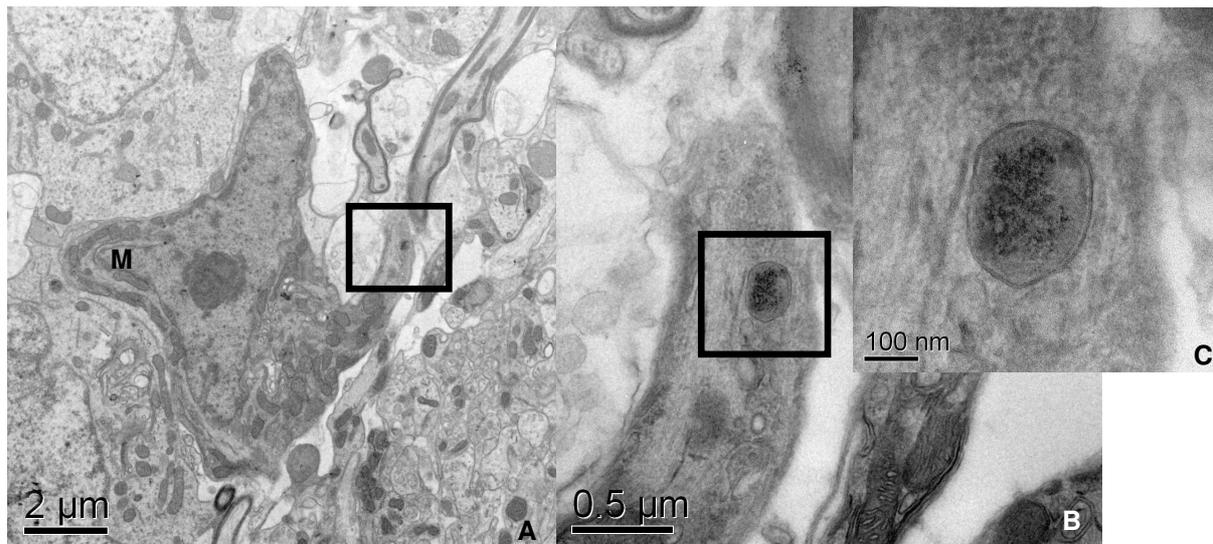


Figura 34: Vesícula Endocítica com PAM em micróglia (M) no diencéfalo, 30 minutos. – (A) 10K; (B) 50K; (C) 200 K.

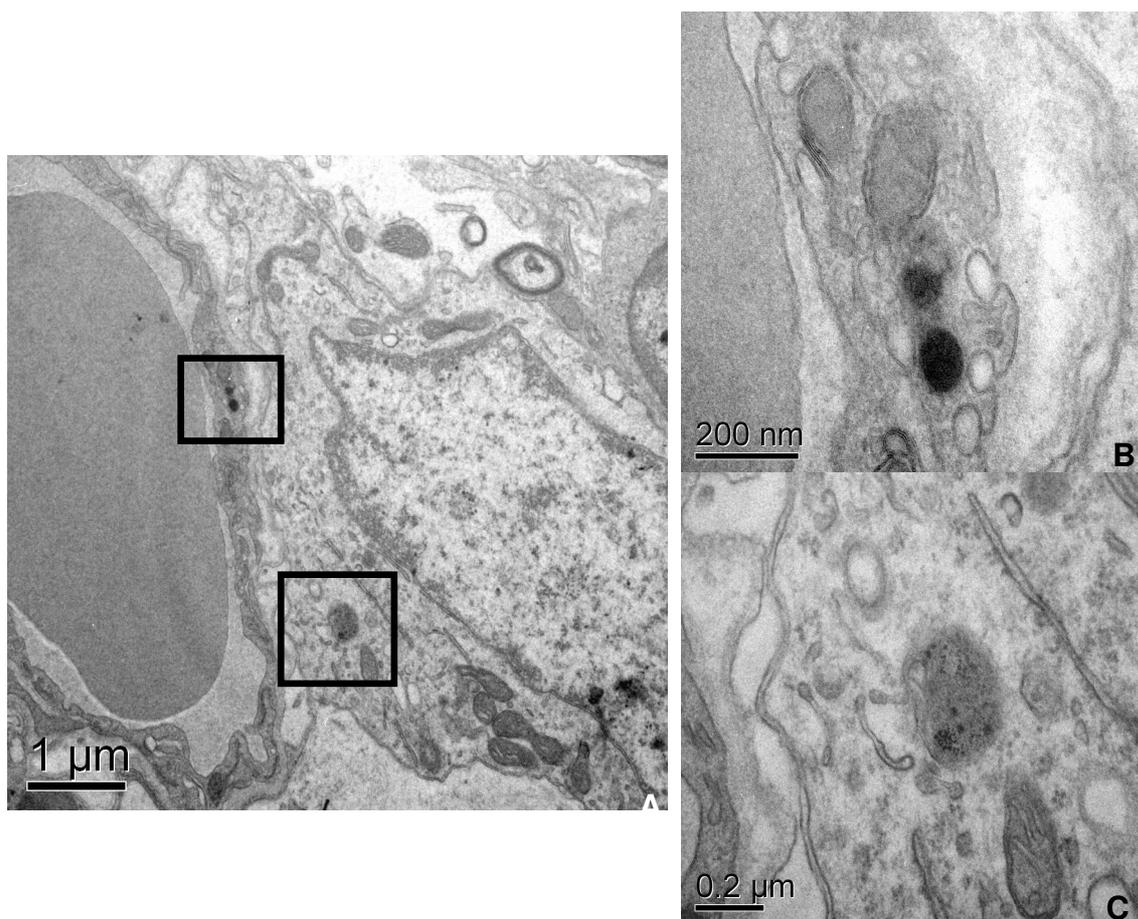


Figura 35: Vesículas Endocíticas com PAM em BHE no diencéfalo, 30 minutos. – (A) 20K; (B) Célula endotelial, 150K; (C) Célula da glia, 150k.

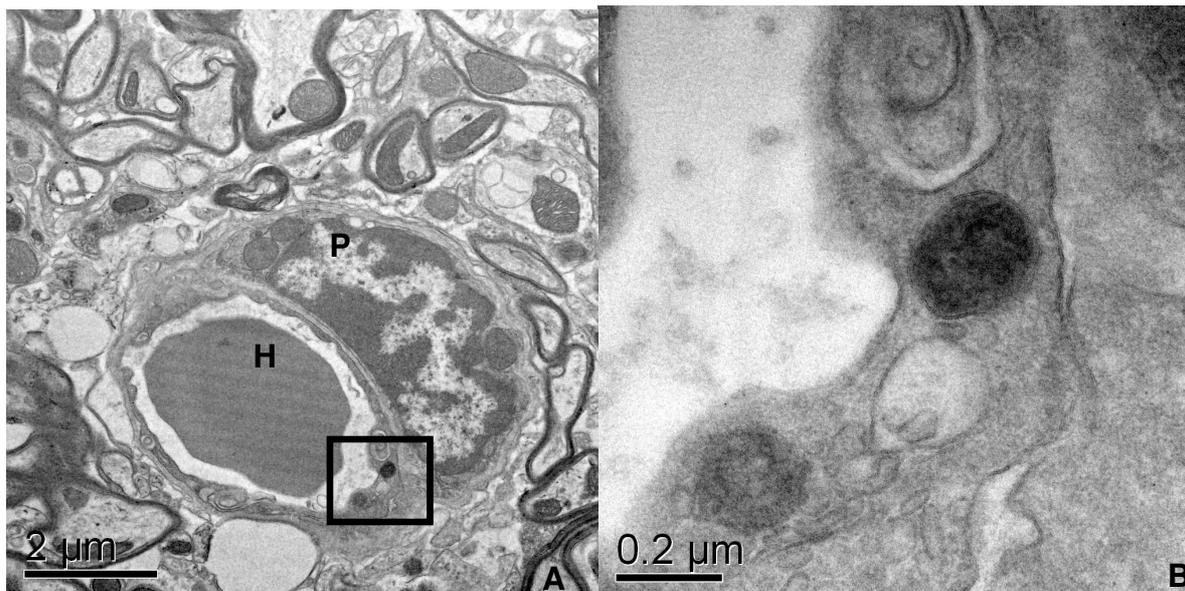


Figura 36: Vesícula Endocítica com PAM em célula endotelial da BHE, na medula, 30 minutos. – (A) 15K; (B) 120K. (H) hemácia, (P) pericyto.

Os **corpos multivesiculares** são um tipo de endossomo tardio e tais estruturas com PAM foram vistas em células da glia (Fig. 37) e neurônios (Fig. 38), todos em tempos iniciais.

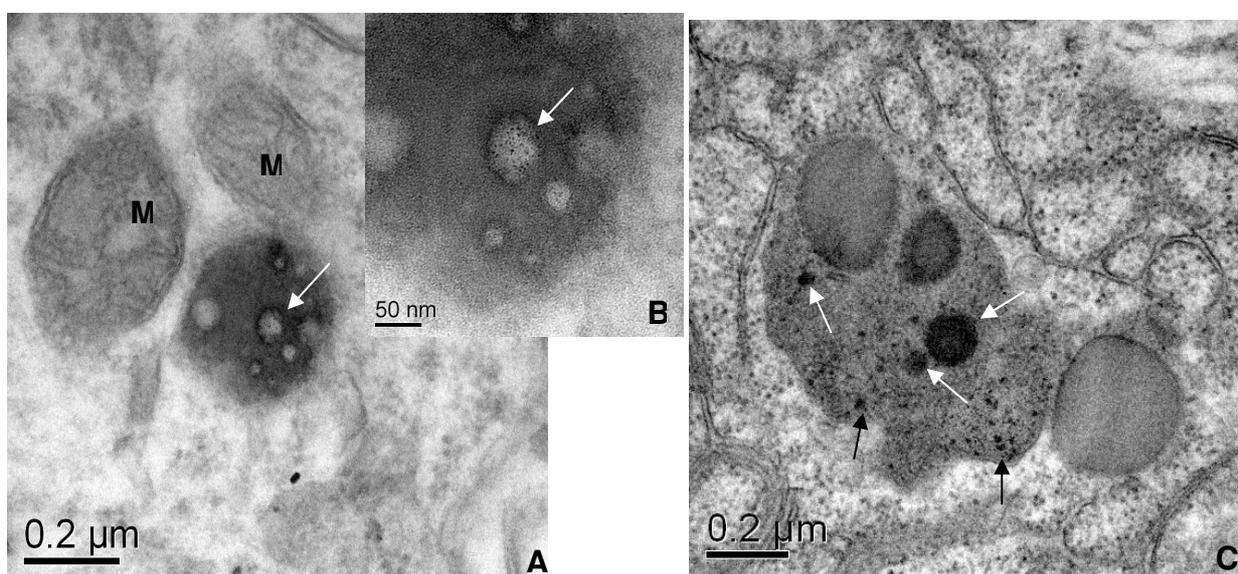


Figura 37: Corpos multivesiculares com PAM, em células da glia. - Diencefalo, 30 minutos. (A) 120K; (B) 400k. Córtex frontal, 6 horas: (C) 80k. Setas: brancas: vesículas com NM; pretas: pequenos aglomerados de NM. (M) mitocôndria.

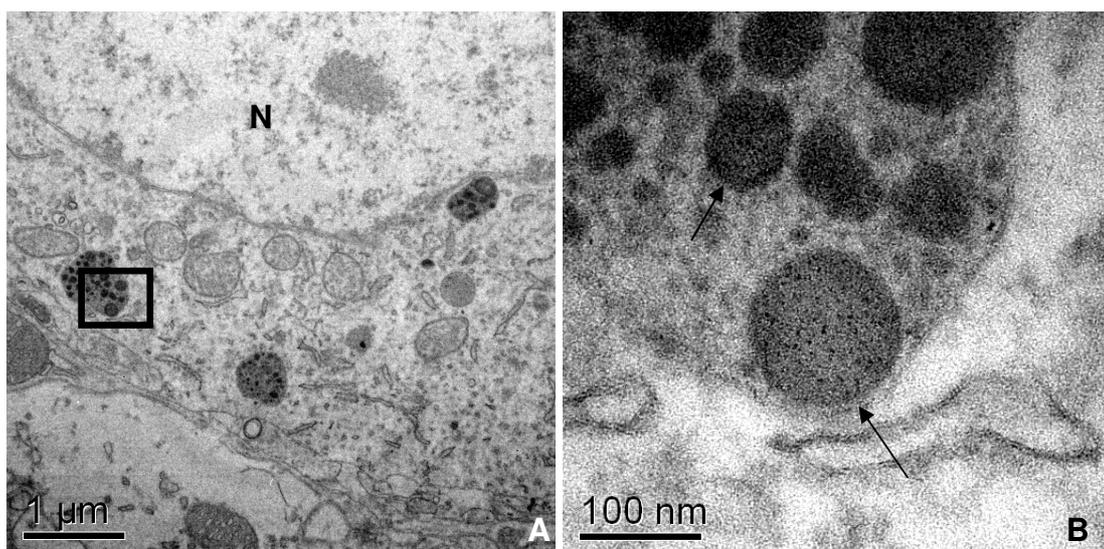


Figura 38: Corpos multivesiculares em neurônio do diencéfalo, 6 horas. – (A) 25K; (B) 300K. Setas: vesículas com NM, N: núcleo.

Peroxisomos ou Lisossomos, sem a utilização de métodos imuno ou histoquímicos, não foi possível discriminar entre cada uma destas organelas porque morfologicamente são parecidas, ambas contendo uma membrana lipídica e conteúdo levemente eletrondenso. Também estão envolvidas em processos de degradação por apresentarem atividades enzimáticas. Estas organelas contendo PAM (Fig. 39) foram observadas próximas ao núcleo e regiões com retículo endoplasmático, nos tempos iniciais.

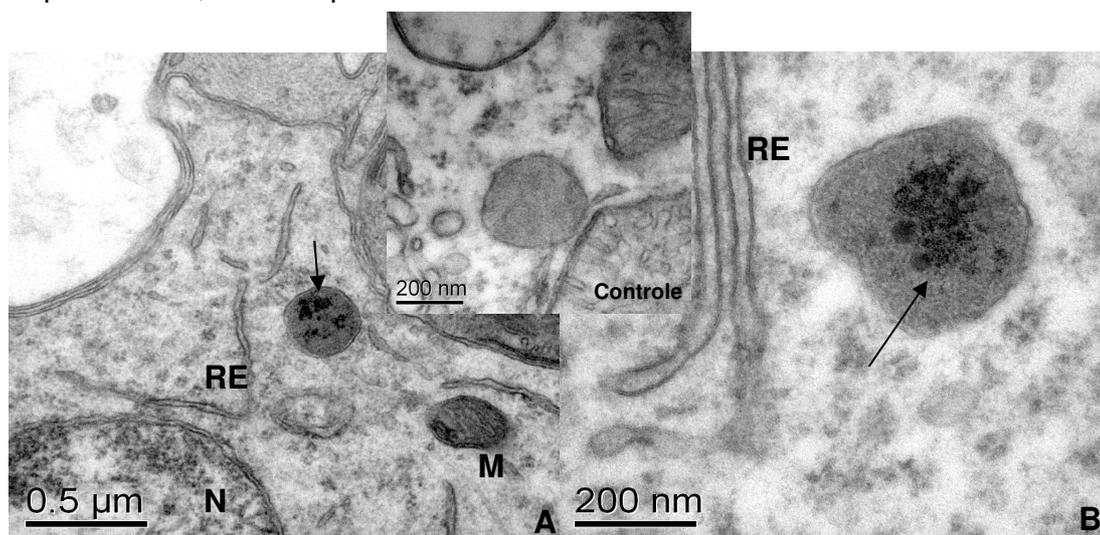


Figura 39: Peroxisomo ou lisossomo com PAM em células da glia, diencéfalo, 30 minutos. – (A) 60K; (B) 150K. Setas: PAM; RE: retículo endoplasmático, M: mitocôndria, N: núcleo.

A **fusão entre lisossomo e endossomo com PAM** não foi visualizada freqüentemente, mas presente em tempo inicial. O lisossomo é originado do complexo de Golgi e neste caso, está se fundindo com uma vesícula endocítica (Fig. 40) para posterior formação de corpos multivesiculares e endossomos tardios.

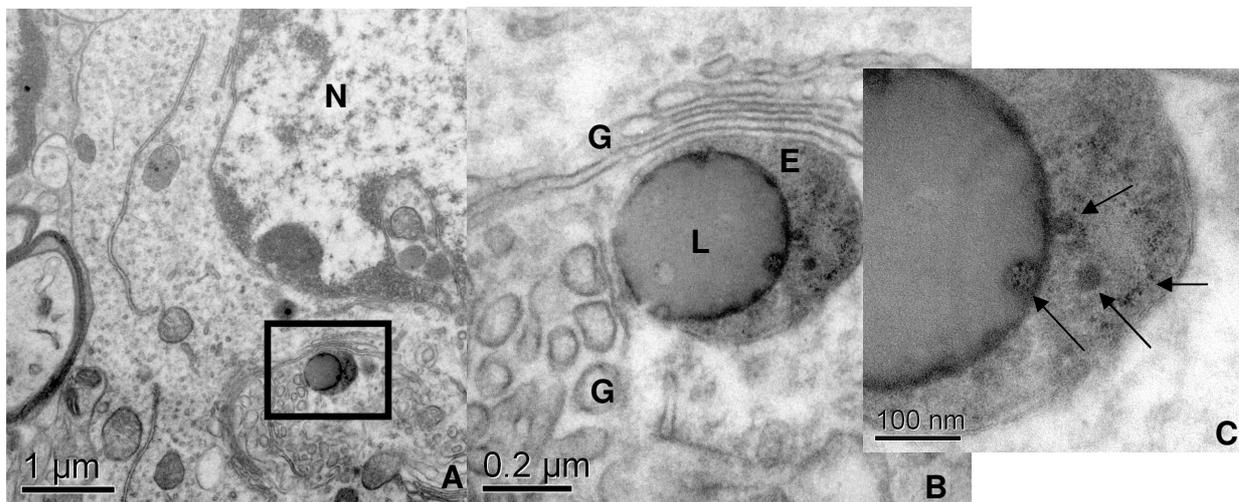


Figura 40: Fusão entre endossomo e lisossomo com PAM, em célula do diencéfalo, 30 minutos. – (A) 25K; (B) 120K; (C) 300k. Setas: NM/PAM. G: complexo de Golgi; N: núcleo; L: lisossomo; E: endossomo.

A visualização de NM no **Retículo Endoplasmático Liso, Complexo de Golgi e Membrana Nuclear** não foi freqüente, mas ocorreram em tempo inicial (12 horas, não demonstrado) e intermediários (1 e 2 dias) (Fig. 41) para o retículo endoplasmático e membrana nuclear e em tempo tardio (30 dias) para o Complexo de Golgi e membrana nuclear novamente (Fig. 42).

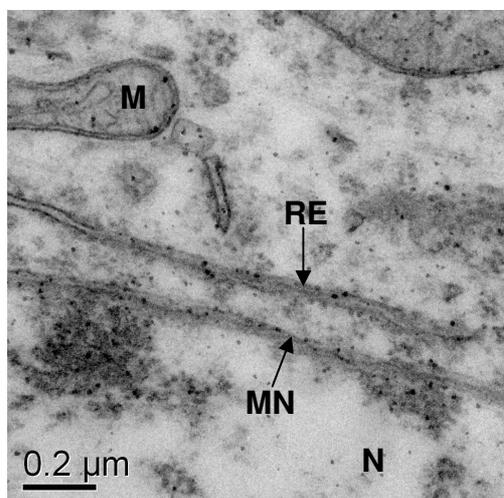


Figura 41: Retículo Endoplasmático e membrana nuclear com NM – Córtex frontal, 2 dias, 100k. N: núcleo; MN: membrana nuclear; RE: retículo endoplasmático; M: mitocôndria.

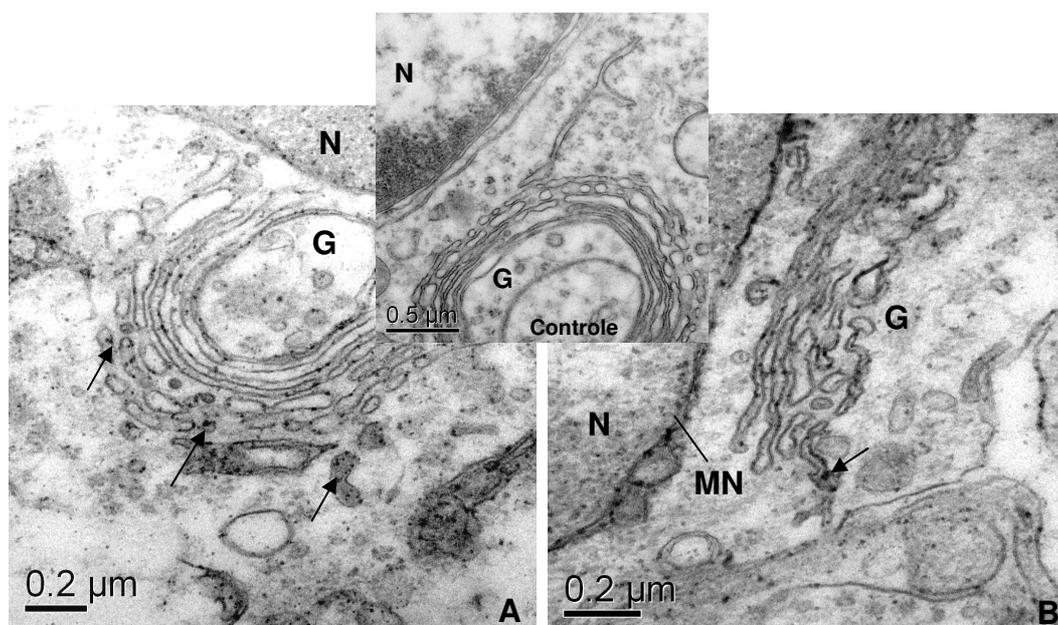


Figura 42: Complexo de Golgi com NM, Cerebelo, 30 dias – (A)80K (B)100k. Setas: NM; G: complexo de Golgi; N: núcleo; MN: membrana nuclear. Note a presença de NM nas membranas e vesículas próximas ao complexo de Golgi.

Existem dois tipos de **mitocôndrias** no SN, as sinápticas e as não sinápticas. A presença de NM predominou em mitocôndrias sinápticas (Fig. 43A), mas também esteve presente em mitocôndria não-sináptica (Fig. 43B), em tempo inicial e intermediário.

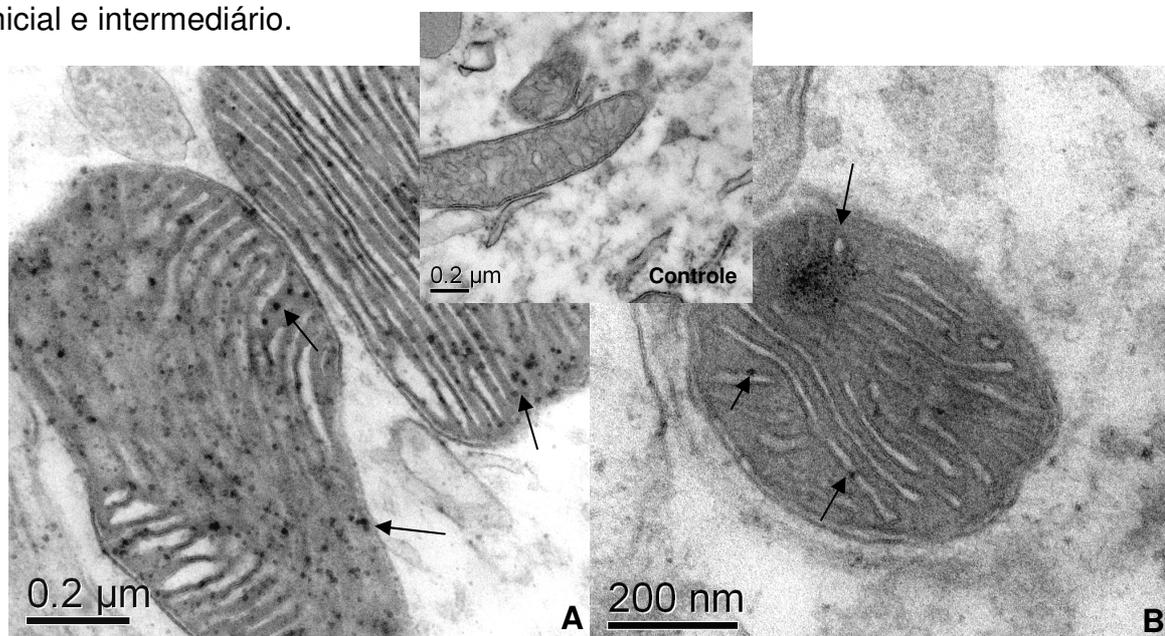


Figura 43: Mitocôndrias com NM; Córtex frontal. – (A) Mitocôndria Sináptica, 2 dias, 120K; (B) Mitocôndria Não-sináptica, 30 minutos, 150k; Setas: NM.

A **Bainha de Mielina**, cuja origem é dos oligodendrócitos, foi uma das principais estruturas que acumulou NM nos tempos iniciais. De 30 minutos a 6 horas (Fig. 44A) atingiu principalmente axônios menores, com 12 horas axônios de diâmetro maiores (Fig. 44B, C) e a partir de 48 horas não foi visível freqüentemente. Também nestes tempos, mas principalmente com 30 minutos, degenerações da bainha de mielina foram vistas e serão descritas em Alterações Celulares.

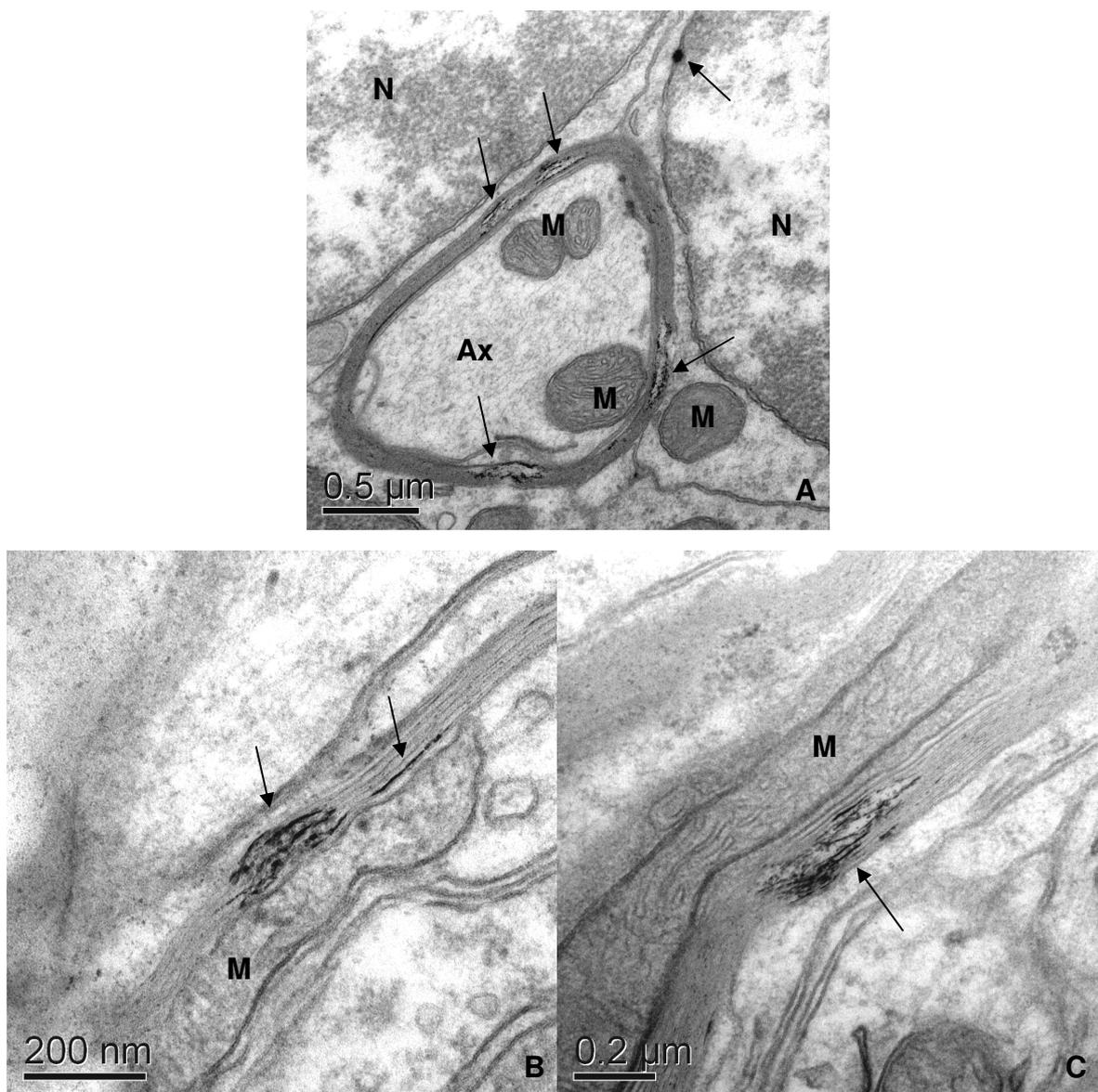


Figura 44: Bainha de mielina com PAM.– (A) Cerebelo, 30 minutos, 50k; (B) Cerebelo, 12 horas, 150K; (C) cerebelo, 12 horas, 100k. Setas: NM; N: núcleo de neurônio; M: mitocôndria; Ax: axônio.

As **Sinapses** são estruturas de comunicação química e elétrica entre os neurônios. A presença de PAM nas sinapses (Fig. 45) ocorre nos tempos iniciais e intermediários principalmente com 2 dias, e as localizações destas incluem o citoplasma do botão sináptico (Fig. 46A), vesículas sinápticas e terminais sinápticos (Fig. 46B).

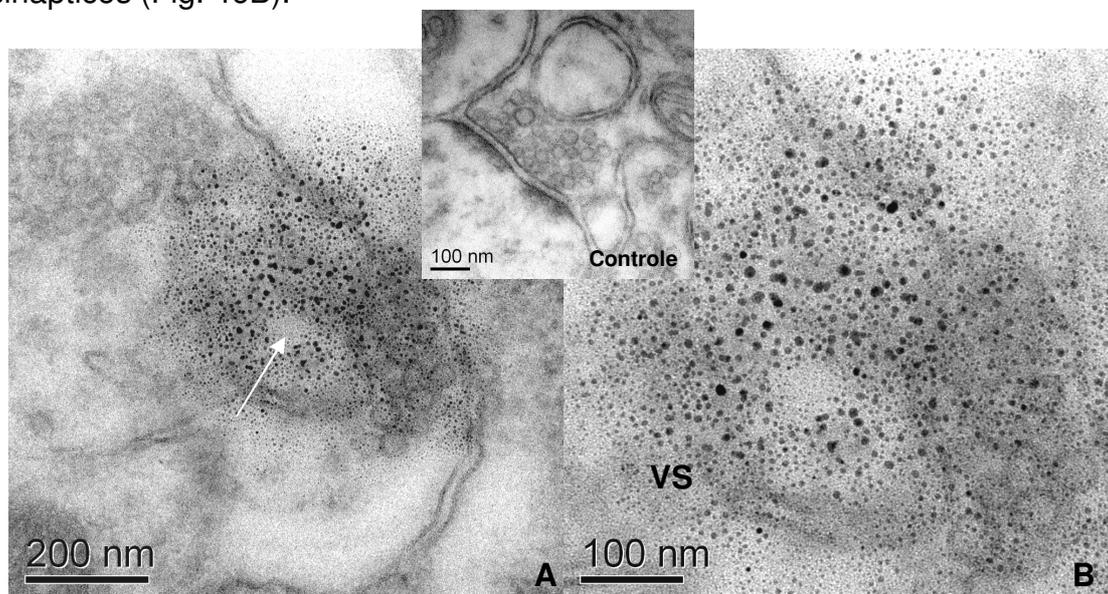


Figura 45: Sinapses com PAM, córtex temporal, 6 horas – (A)150K; (B)250k. Setas: NM; VS: vesículas sinápticas. Tamanho \cong das NM: 10nm.

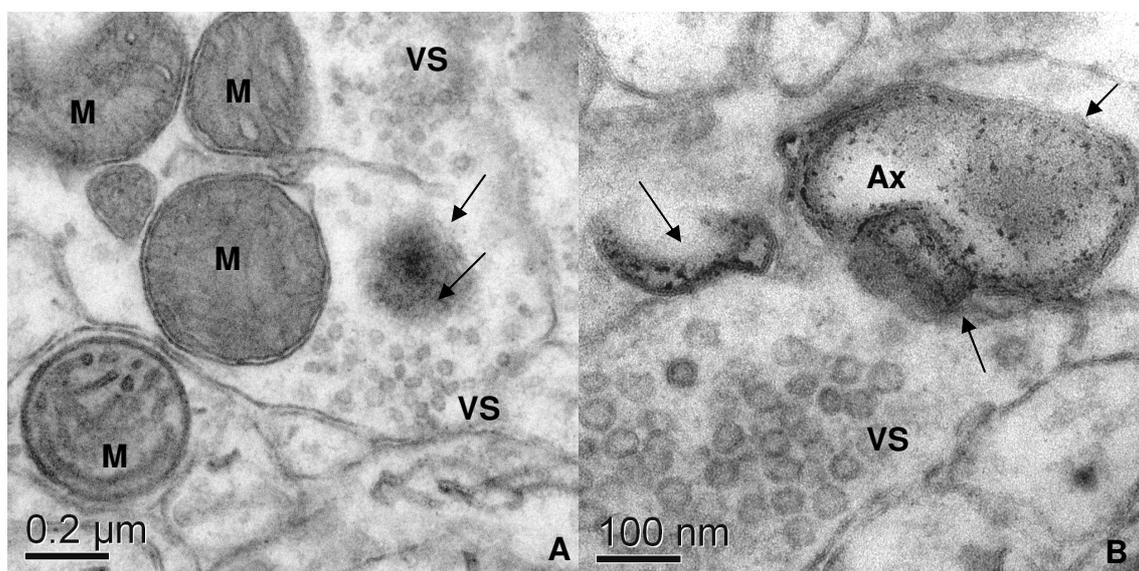


Figura 46: Sinapses com PAM, córtex frontal, 2 dias – (A) Citoplasma do botão sináptico, 100K; (B) Terminal sináptico, 200k. Setas: NM; M: mitocôndrias; Ax: axônio; VS: vesículas sinápticas.

Os **Fagossomos** são estruturas multilamelares, resultantes da fagocitose celular. Fagossomos com PAM foram observados em tempos iniciais, porém não foram freqüentes.

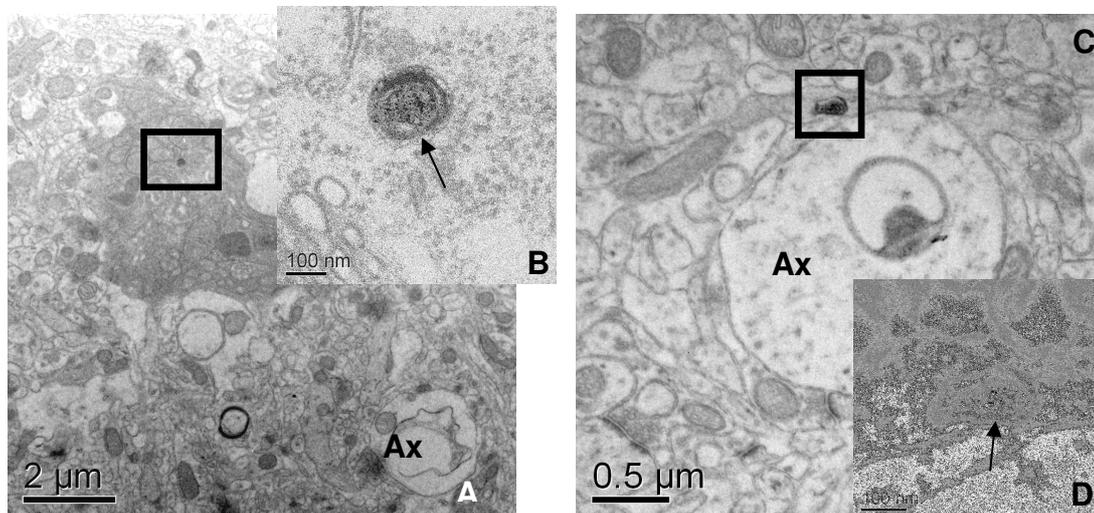


Figura 47: Fagossomo com PAM em citoplasma de célula do SN - Micróglia do córtex temporal, 6 horas – (A) 12K; (B) 120K; Prolongamento celular, córtex frontal, 6 horas – (C) 40K; (D) 250K. **Ax:** axônio. Setas: PAM/NM.

Lipofucsina é considerado o pigmento do envelhecimento, formado de proteínas e lipídeos não digeridos. A presença de NM neste material foi visualizada com 6 horas, 2 dias e 7 dias, embora não tenha sido freqüente.

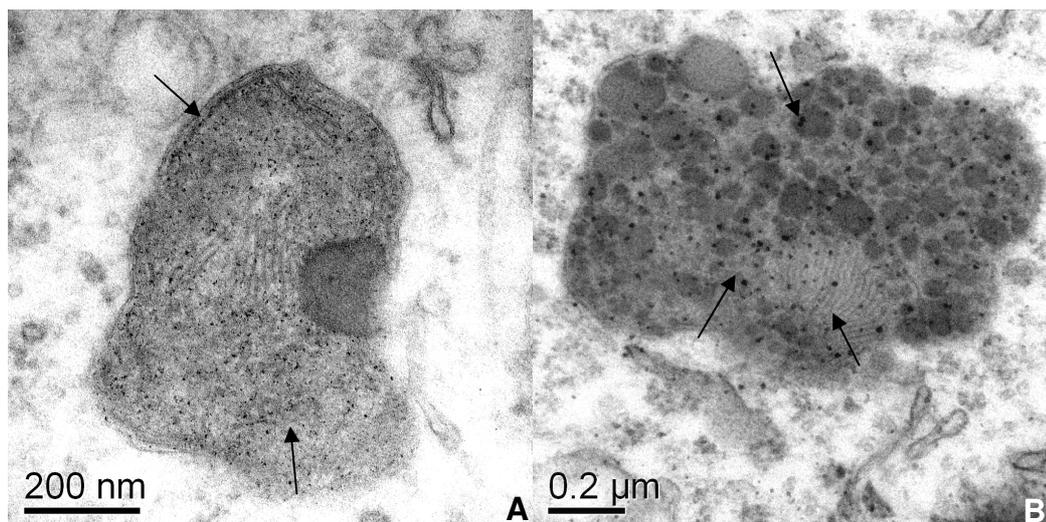


Figura 48: Lipofucsina em neurônios com PAM. (A) tronco encefálico, 6 horas – 150K (B) córtex frontal, 2 dias – 100k. Setas: NM.

As Cisternas são estruturas tubulares presentes também nos prolongamentos das células do SN. A presença de PAM no interior de cisternas foi vista com 2 dias nos dendritos (Fig. 49) e 30 dias também nos dendritos, mas próximo às mitocôndrias sinápticas (Fig. 50).

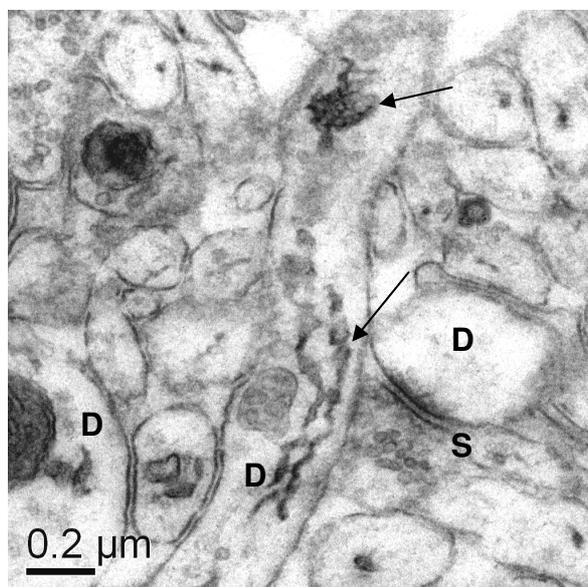


Figura 49: Cisternas em prolongamentos de neurônio, com PAM, córtex frontal, 2 dias – 80K; D: dendritos; S: sinapse; Setas: PAM/NM.

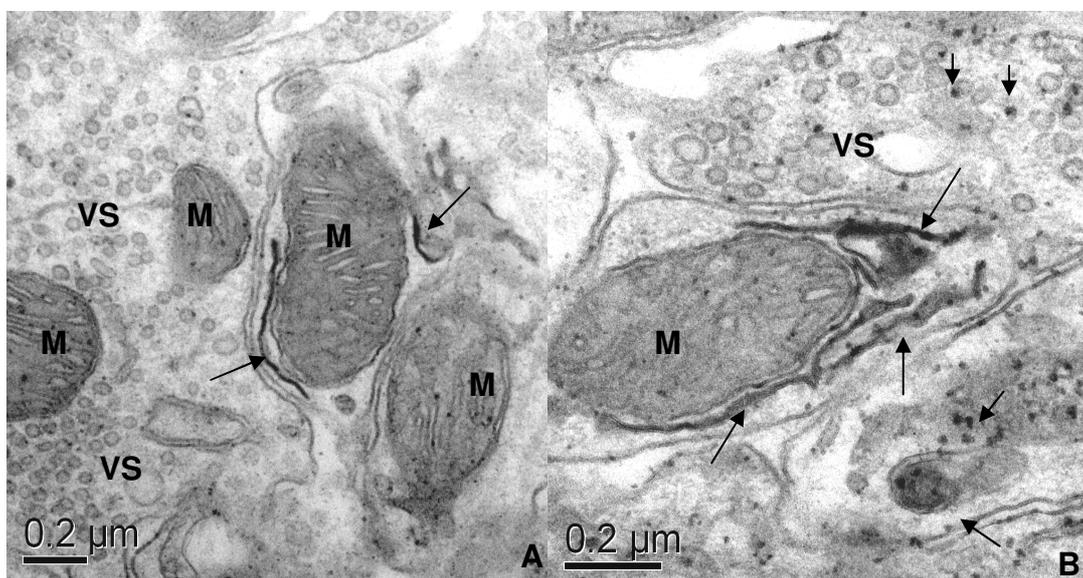


Figura 50: Cisternas em sinapses de neurônio, com PAM, cerebelo, 30 dias- (A) 80k; (B) 120k. M: mitocôndria; VS: vesículas sinápticas; Setas: PAM/NM

As **Vesículas Exocíticas** servem para excreção de alguns metabólitos. No caso do ferro, existe um sistema no neurônio em que a vesícula é formada no corpo celular, deslocada por transporte axonal anterógrado e excretada pela sinapse. O aparecimento de vesículas exocíticas com PAM ocorreu em prolongamentos celulares em tempos tardios. Com 7 dias eram visíveis as vesículas ainda nos axônios (Fig. 51) e com 30 dias foi possível ver a exportação do conteúdo da vesícula em uma sinapse com axônio (Fig. 52).

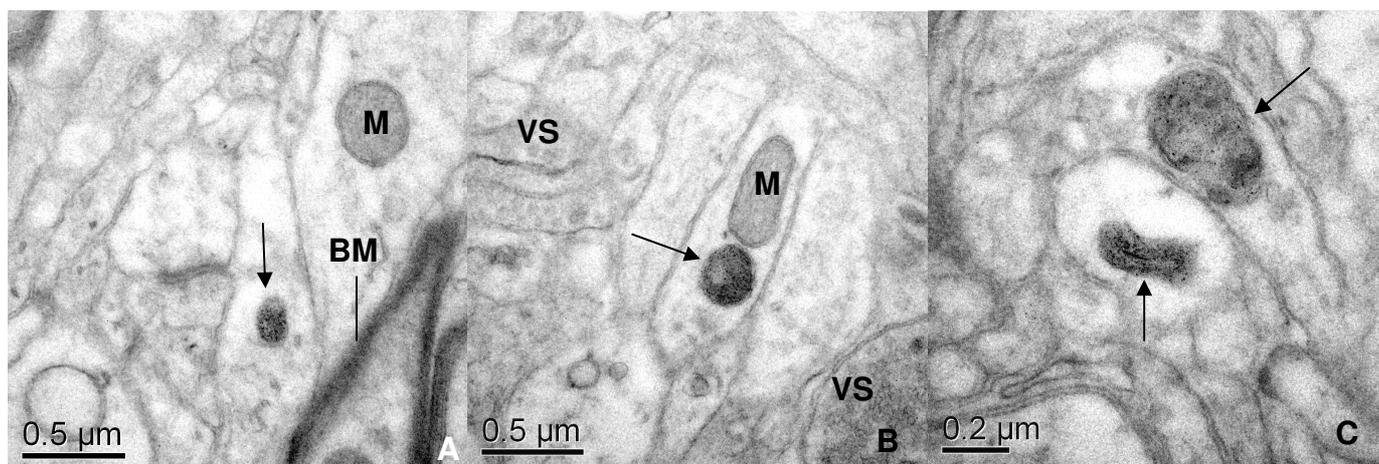


Figura 51: Vesículas exocíticas com NM em prolongamentos celulares, diencéfalo, 7 dias – (A) 60K; (B) 60K; (C) 100k. M: mitocôndria, VS: vesículas sinápticas, BM: bainha de mielina. Setas: vesículas com NM.

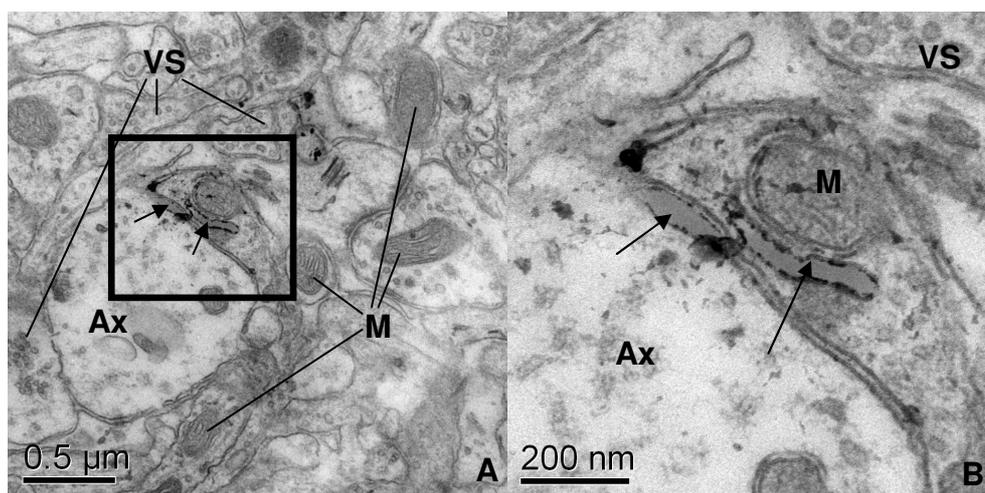


Figura 52: Região de exocitose com NM no botão sináptico, liberadas para prolongamento neuronal, córtex frontal, 30 dias – (A) 50K; (B) 150k. M: mitocôndria; VS: vesículas sinápticas; Ax: Axônio. Setas: cisternas com NM.

O **Núcleo** foi mais um compartimento atingido pelo PAM, além das organelas membranosas. O PAM foi encontrado de 2 formas: concentrado em uma região do núcleo (Figs. 53, 54, 56,) ou com as NM dispersas (Fig. 55), principalmente em regiões de heterocromatina nos tempos iniciais e intermediário.

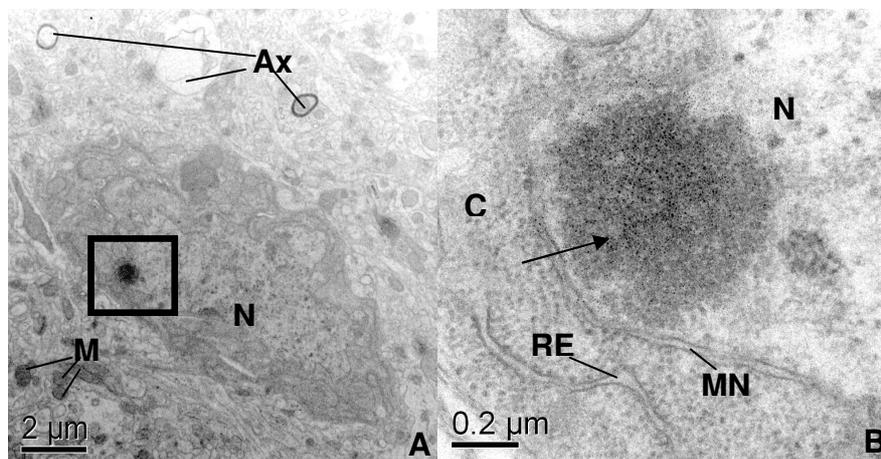


Figura 53: Núcleo de célula da glia com PAM concentrado, córtex temporal, 6hs – (A) Aglomerado de PAM de $\cong 600$ nm, 10K; (B) NM de PAM com $\cong 10$ nm, 100K; Ax: Axônio; M: mitocôndria; N: núcleo; MN: membrana nuclear; C: citoplasma; RE: retículo endoplasmático; Seta: PAM.

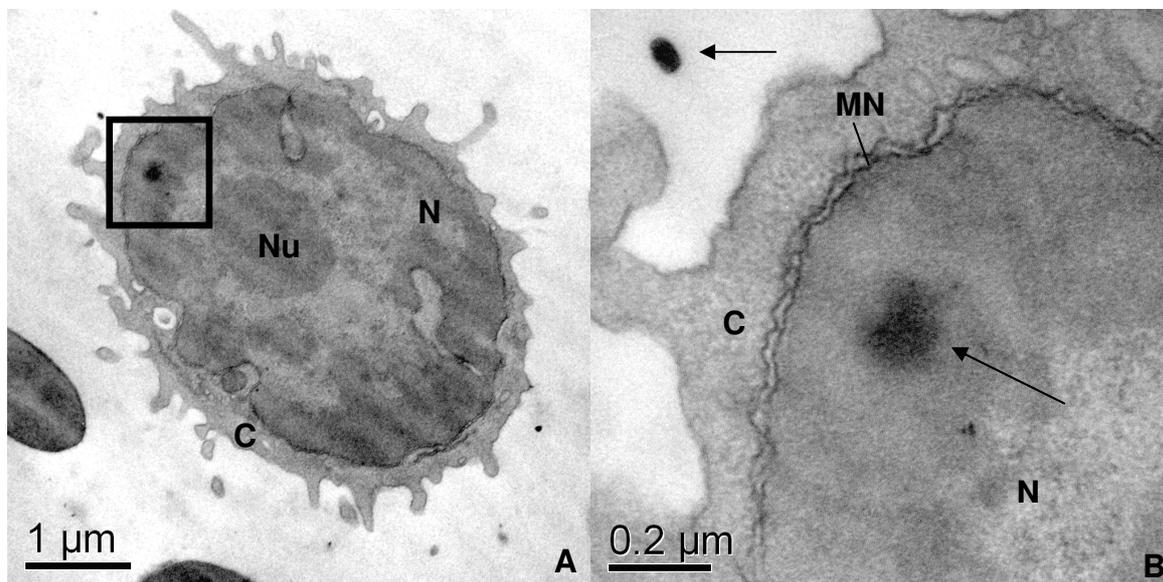


Figura 54: Núcleo de linfócito com PAM, sangue, 2 dias – (A) 30K; (B) 120K; Setas: microesfera e NM de PAM (fora do linfócito $\cong 75$ nm). N: núcleo; C: citoplasma; Nu: nucléolo; MN: membrana nuclear.

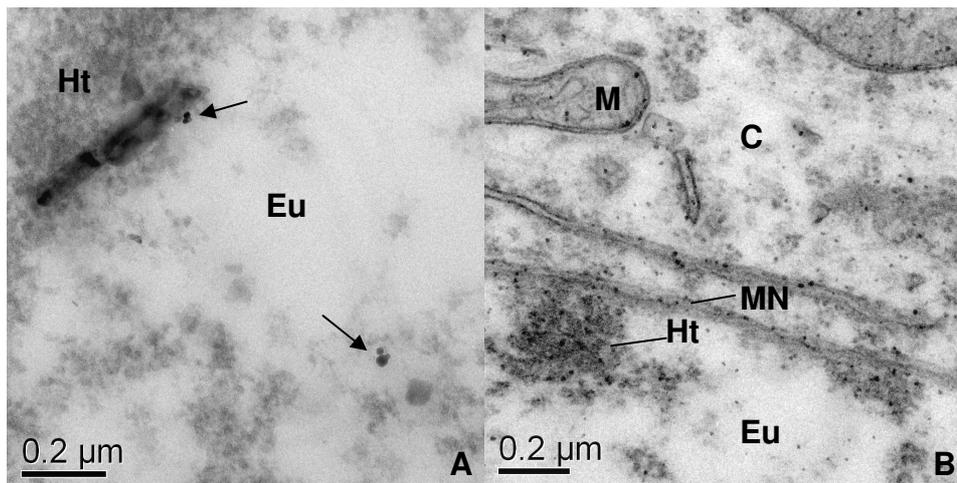


Figura 55: NM de PAM, dispersas no núcleo – (A) Cerebelo, 6 horas, 120K (B) Córtex frontal, 2 dias, 100k. C: citoplasma, M: mitocôndria; Eu: eucromatina; Ht: heterocromatina; MN: membrana nuclear; Setas: NM

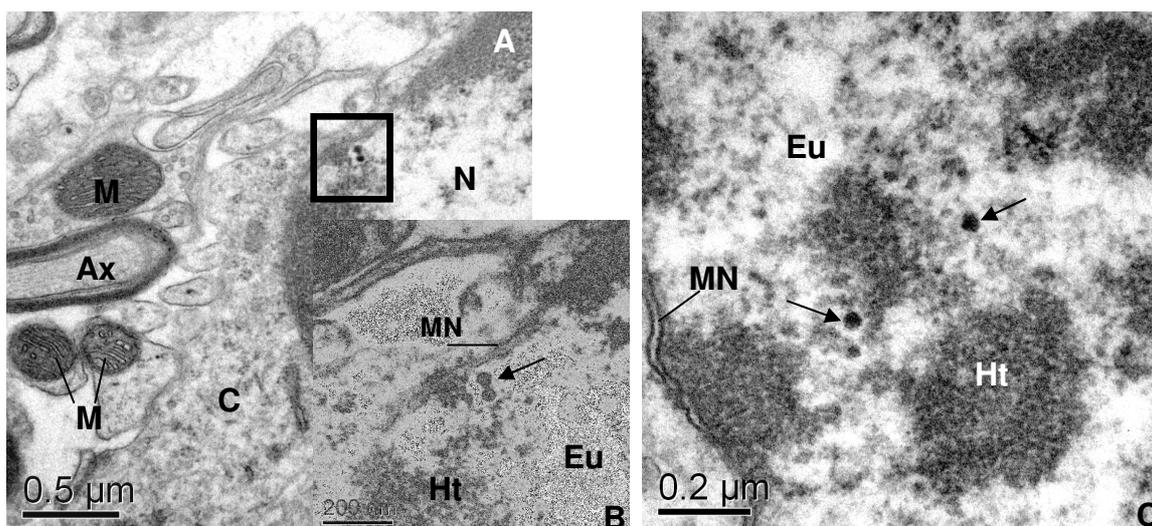


Figura 56: Núcleo de células da glia com PAM – Medula, 30 minutos (A) 50K; (B) 150K; (C) 120K. Setas: PAM, esferas com \cong 30nm de diâmetro. N: núcleo; MN: membrana nuclear; Ht: heterocromatina; Eu: eucromatina; C: citoplasma; M: mitocôndria; Ax: axônio.

As **Estruturas Incomuns** referem-se à presença de estruturas normalmente não presentes no SN, mas que possuem composição férrica, podendo ser artificial ou uma resposta biológica incomum possivelmente em resposta ao tratamento. As estruturas consideradas artificiais são as NM de PAM introduzidas nos animais, e visualizadas sem associação com alterações

morfológicas. Estas NM no citoplasma apresentaram diâmetro dentro da média de aproximadamente 10 nm (Fig. 57), formando aglomerados. Outras NM, de ocorrência rara, estavam isoladas e tinham diâmetros muito maiores do que a média, com aproximadamente 100 nm (Fig. 60).

As estruturas tidas como respostas biológicas incomuns ao tratamento com PAM são: a) cristais dentro de organelas e b) partículas eletrondensas, revestidas com membrana lipídica, semelhantes aos magnetossomos de bactérias magnetostáticas.

A presença de PAM ou NM dentro de organelas ou núcleos foi citada anteriormente, porém, PAM também foi encontrado no **Citoplasma** principalmente de hemácias (Fig. 59) e em células da glia (Figs. 57, 58). NM isoladas e grandes foram encontradas em regiões de axônios (Fig. 60A) e dendritos (Fig. 60B).

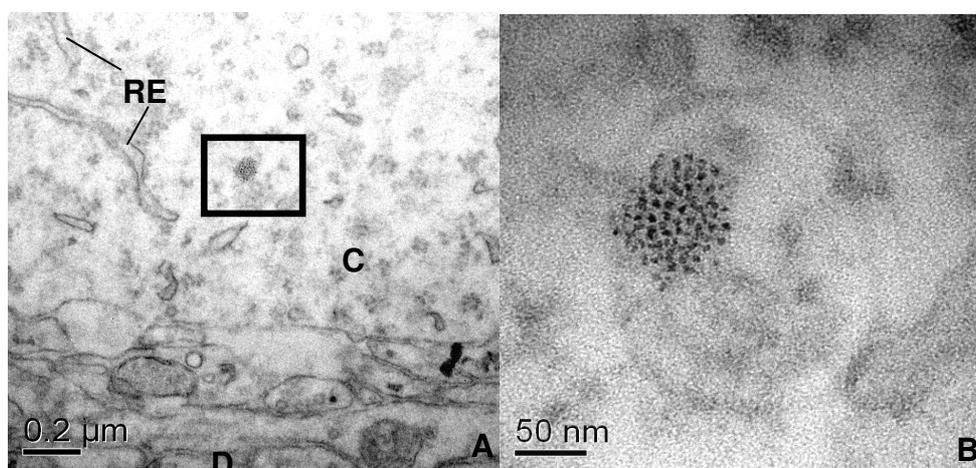


Figura 57: PAM no citoplasma de célula da glia, Diencéfalo, 6 horas – (A) 80K; (B) 400K. Nanoesfera de PAM com \cong 75nm e NM com \cong 10nm. C: citoplasma; RE: retículo endoplasmático; D: dendrito.

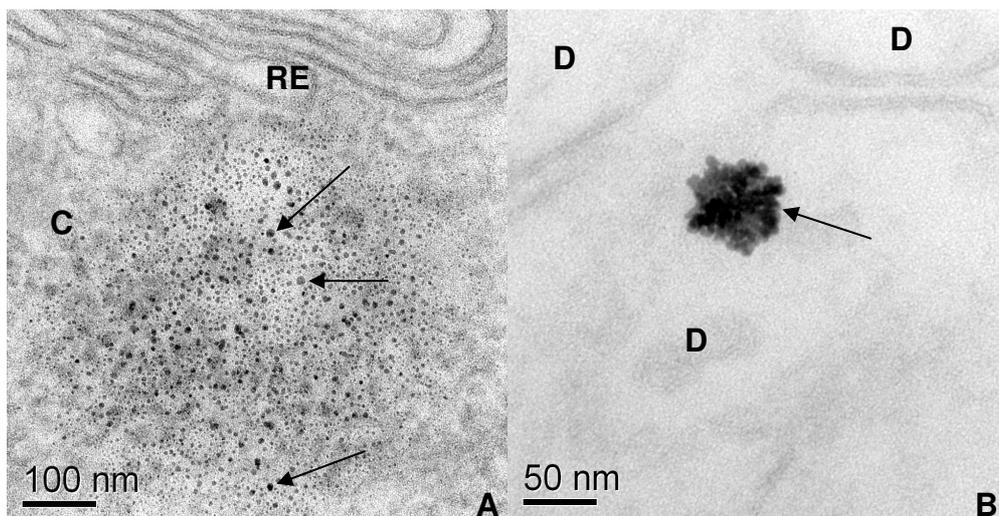


Figura 58: PAM no citoplasma de célula da glia, Córtex temporal, 6 horas – (A) 200K; (B) 400k. RE: retículo endoplasmático, C: citoplasma, D: dendrito. Setas: NM com $\cong 10$ nm. Note que em A as NM estão dispersas e em B estão aglomeradas.

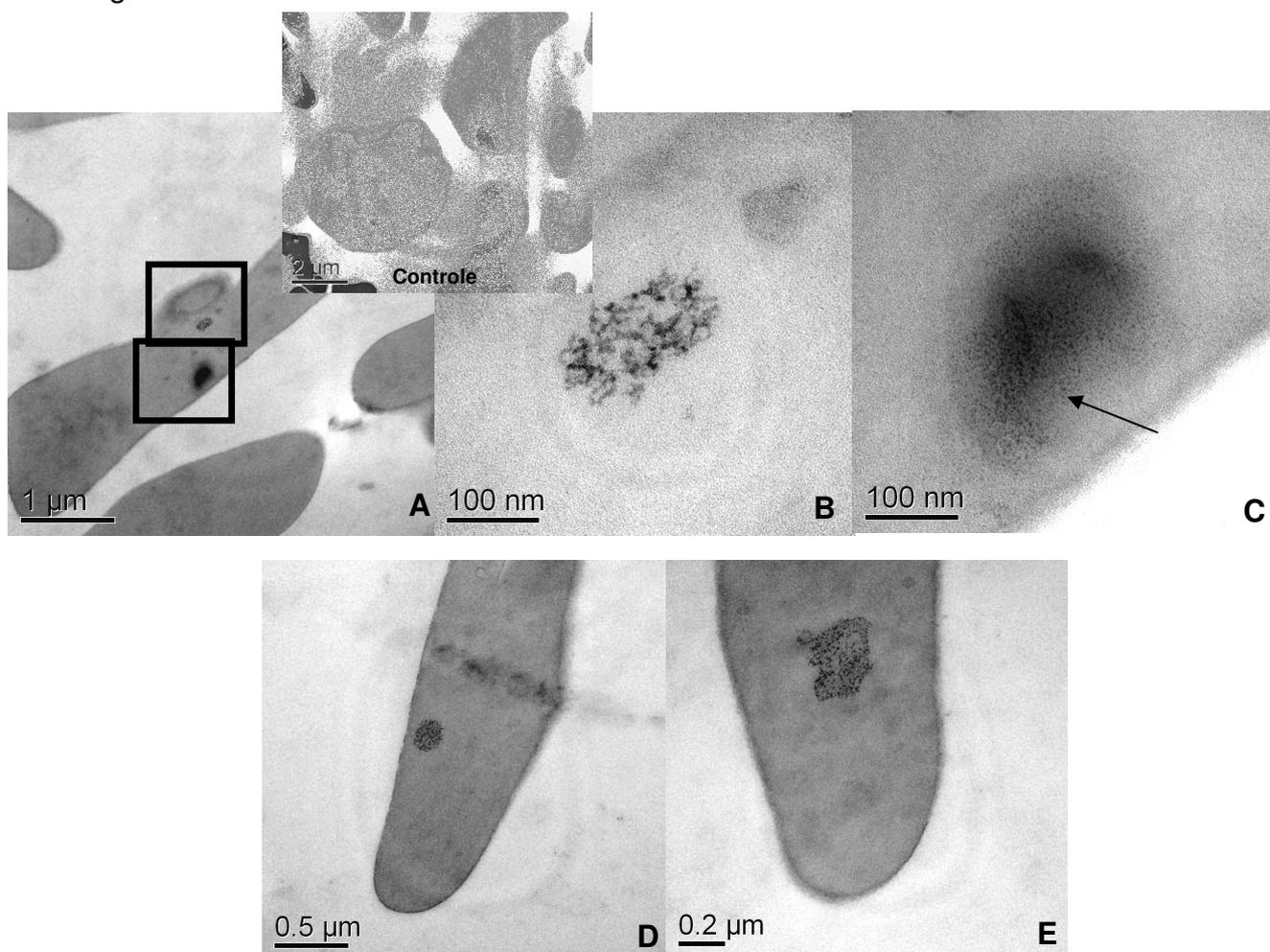


Figura 59: Hemácias com PAM, Sangue, 2 dias – (A) 30K; (B) 300K; (C) 300K; (D) 50K; (E) 80K. Note que PAM aparece em duas formas: semelhante ao modelo da Fig. 1 com NM e matriz de albumina (B,D,E) e apenas as NM dispersas (C).

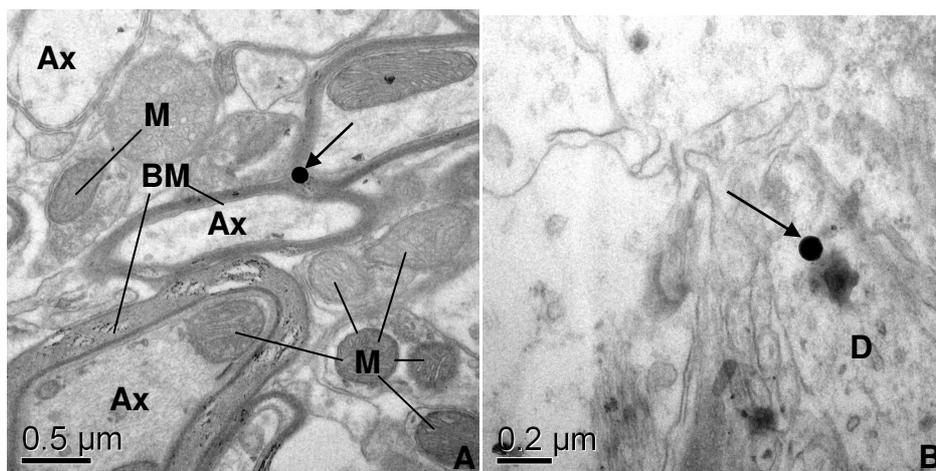


Figura 60: NM isoladas com $\cong 100\text{nm}$ de diâmetro, no neurópilo, 30 minutos– (A) Medula espinhal, 40K; (B) Diencefalo 80K. Setas: NM; BM: bainha de mielina; Ax: axônio; M: mitocôndria; D: dendrito.

Os **Cristais em organelas** foram notados como a presença de estruturas com tramas de cristais dentro de organelas membranosas, porém, foram eventos raros e presentes apenas nos animais tratados nos tempos iniciais e no córtex temporal. As organelas que podem ter cristais são os peroxissomos, mas nestes casos, em uma das organelas (Fig. 61B) NM estavam associadas e na outra a característica do cristal era diferente dos cristais normalmente vistos nos peroxissomos (Fig. 61A).

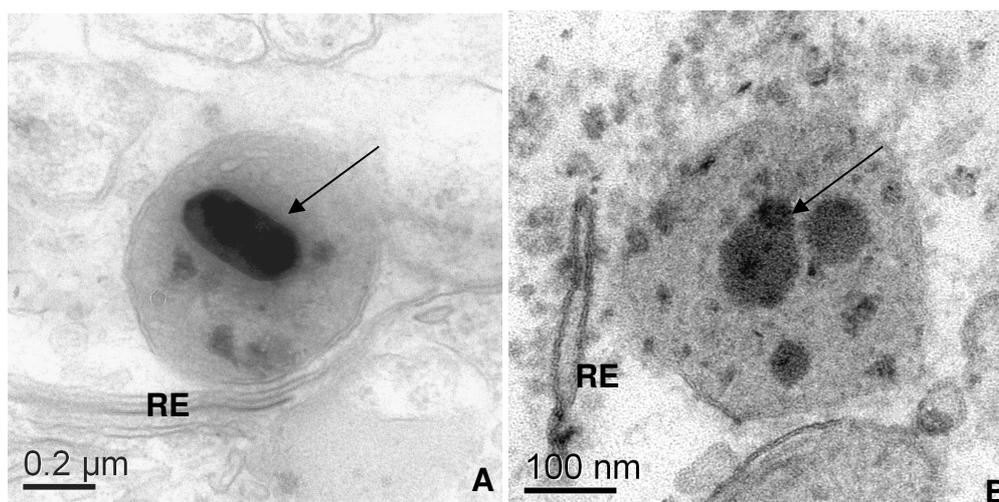


Figura 61: Cristais em organelas de células do SN no córtex temporal – (A) 30 minutos, 100K; (B) 12 horas, 250K. RE: retículo endoplasmático; Setas: cristais.

Os **Magnetossomos *like*** são estruturas semelhantes aos magnetossomos de bactérias magnetostáticas e foram encontradas apenas em animais tratados nos tempos iniciais e intermediários. Estas estruturas aparentemente têm uma evolução na formação e foram encontradas em regiões de dendritos e axônios (Figs. 62, 63).

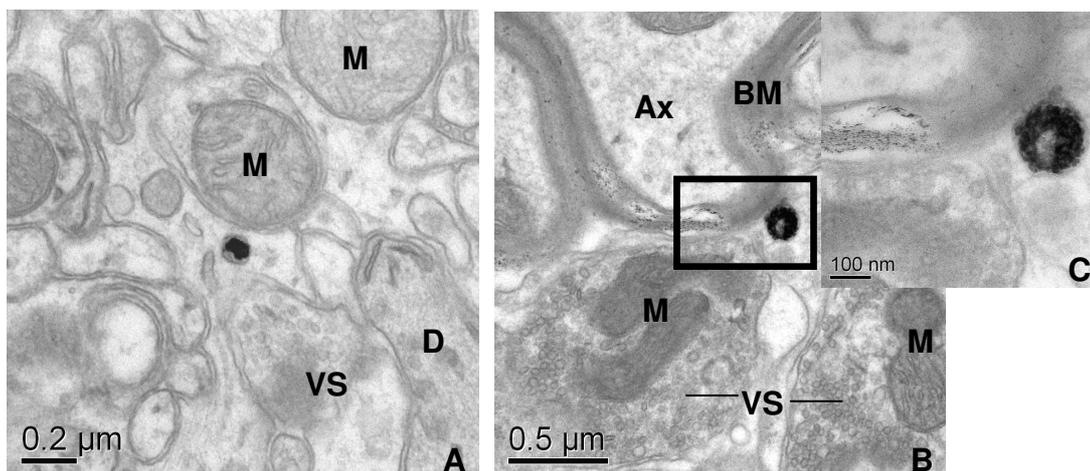


Figura 62: Estruturas semelhantes à magnetossomos – (A) Cerebelo, 30 minutos, 80K; (B) Medula espinhal, 30 minutos, 60k; (C) 200K. D: dendritos, M: mitocôndria; VS: vesículas sinápticas; Ax: axônio; BM: bainha de mielina.

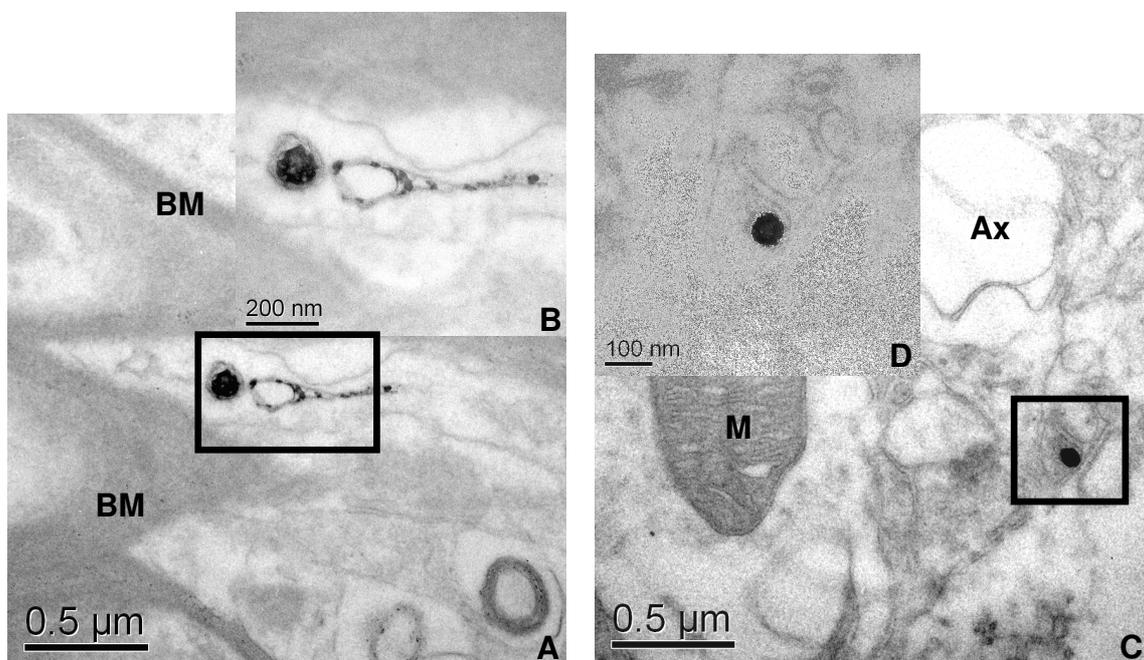


Figura 63: Estruturas semelhantes à magnetossomos – (A) Diencefalo, 6 horas, 60k; (B) 150K; (C) Diencefalo, 2 dias, 60k; (D) 200k. Ax: axônio; M: mitocôndria; BM: bainha de mielina.

Alterações Celulares

Aparentemente, surgiram alterações pouco freqüentes, e em componentes celulares com estruturas lipídicas, incluindo mitocôndrias (Figs. 64, 65) e prolongamentos celulares como dendritos (Fig. 66), axônios mielinizados (Fig. 67) e axônios não mielinizados (Fig. 68). As causas destas alterações não estão definidas, mas podem estar relacionadas ao PAM. Estas alterações estão presentes nos tempos iniciais (30 minutos e 6 horas), tempos intermediários (2 dias) e tardios (30 dias).

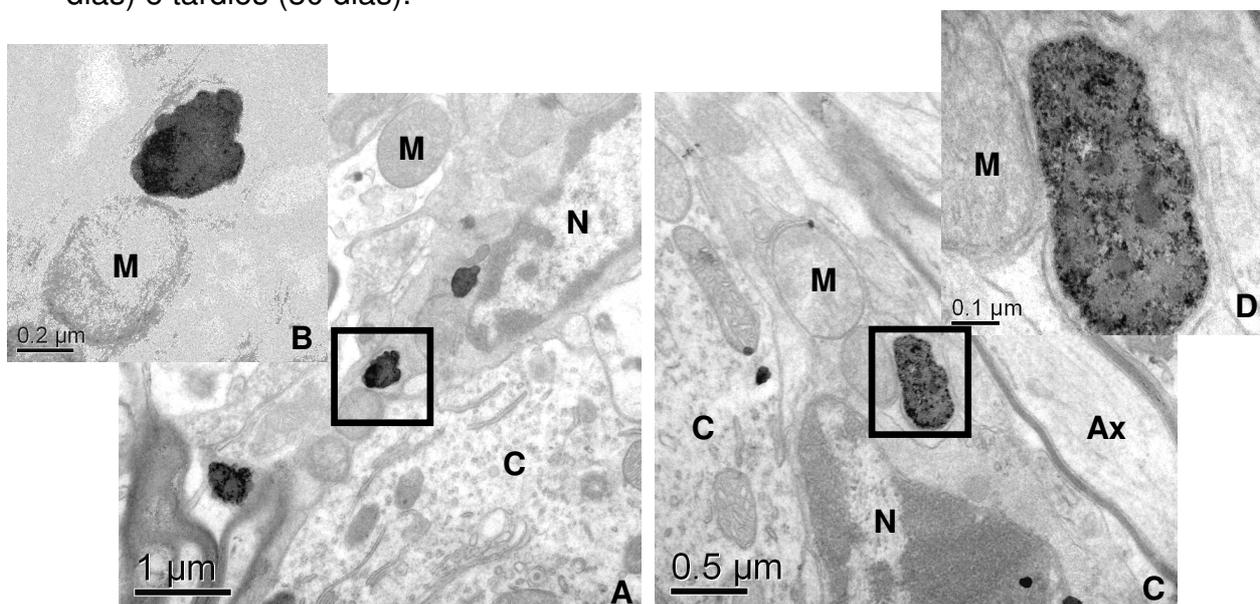


Figura 64: Estruturas com PAM, em regiões de mitocôndrias. Diencéfalo, 30 minutos – (A) 25k; (B) 120K; (C) 40k; (D) 200k. M: mitocôndria, Ax: axônio; N: núcleo; C: citoplasma.

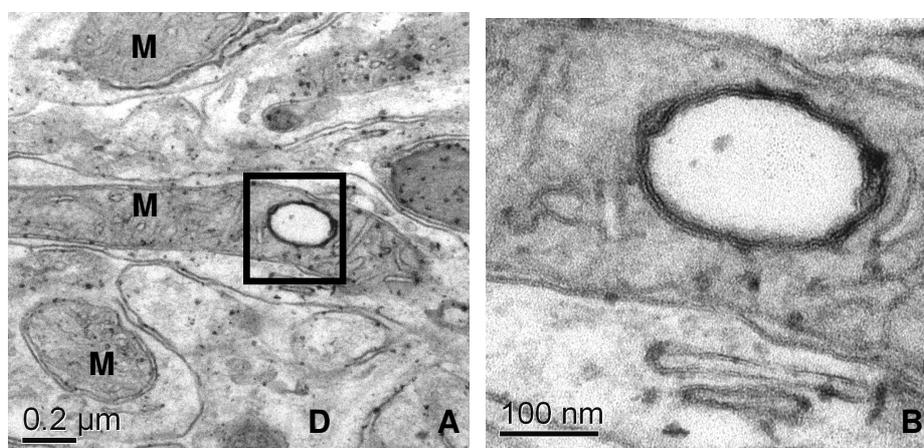


Figura 65: Mitocôndria com estrutura alterada circular. Cerebelo, 30 dias – (A) 80k; (B) 300K. M: mitocôndria; D: dendritos

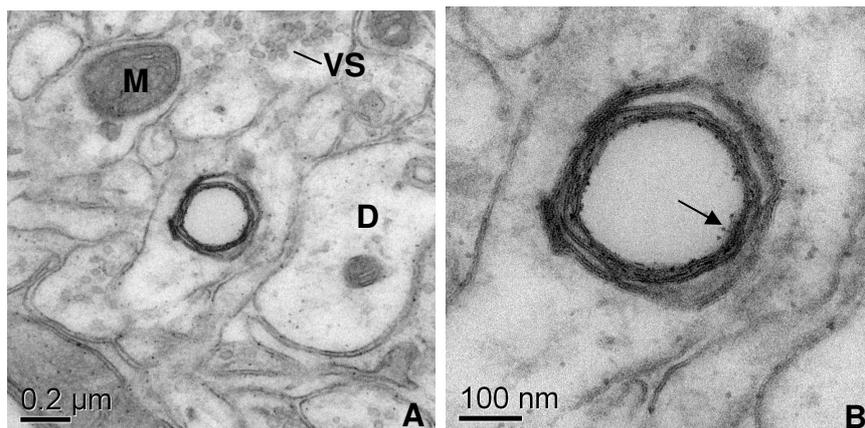


Figura 66: Estrutura alterada no centro de dendrito. Córtex frontal, 2 dias – (A) 80k; (B) 200K. D: dendrito; M: mitocôndria; VS: vesículas sinápticas. Setas: NM

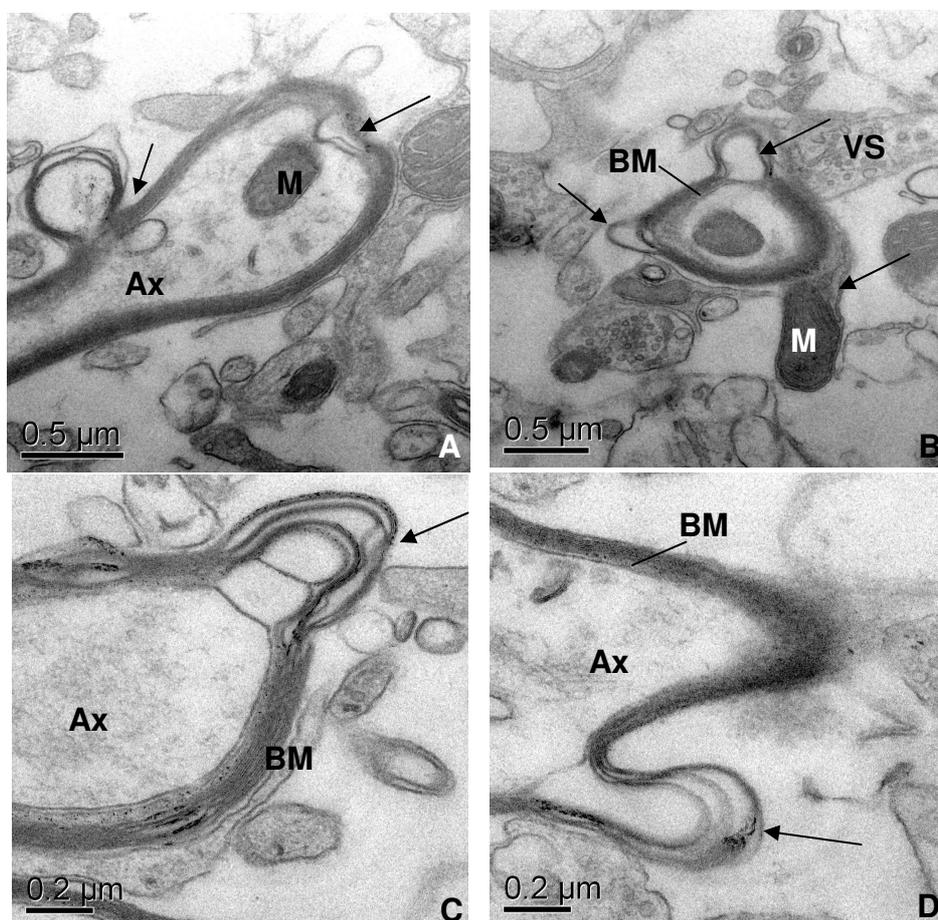


Figura 67: Axônios mielinizados com PAM e alterações nas bainhas de mielina. Córtex frontal, 30 minutos – (A) 60k; (B) 50K; Cerebelo, 30 minutos: (C) 100k; (D) 100K. BM: bainha de mielina; M: mitocôndria; Ax: axônio

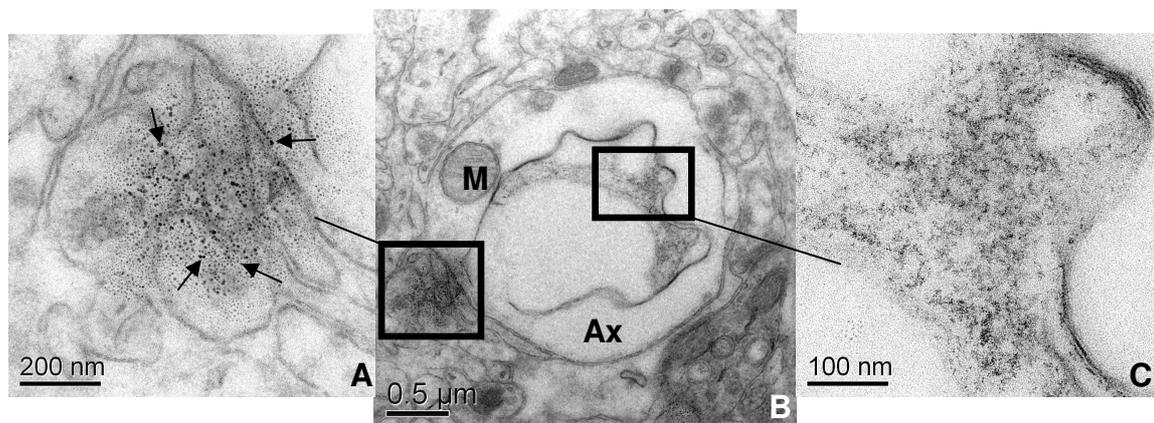


Figura 68: Axônio sem mielina com PAM na superfície e estrutura alterada no centro. Córtex temporal, 6 horas – (A) 150k; (B) 40K; (C) 300k. Ax: axônio; M: mitocôndria; Setas: NM

Foi notado apenas em um animal tratado e com 30 dias, o provável momento de excreção de ferro em uma vesícula exocítica por um neurônio. Este tipo de vesícula é liberado de uma sinapse (Fig. 69), onde o conteúdo pode ficar na fenda e ser fagocitado por células da glia, ou ser absorvido pelo terminal sináptico, no caso, outro neurônio. Aparentemente ocorreu, e mais de uma vez, a segunda alternativa porque o axônio do neurônio atingido demonstra sinais de degeneração.

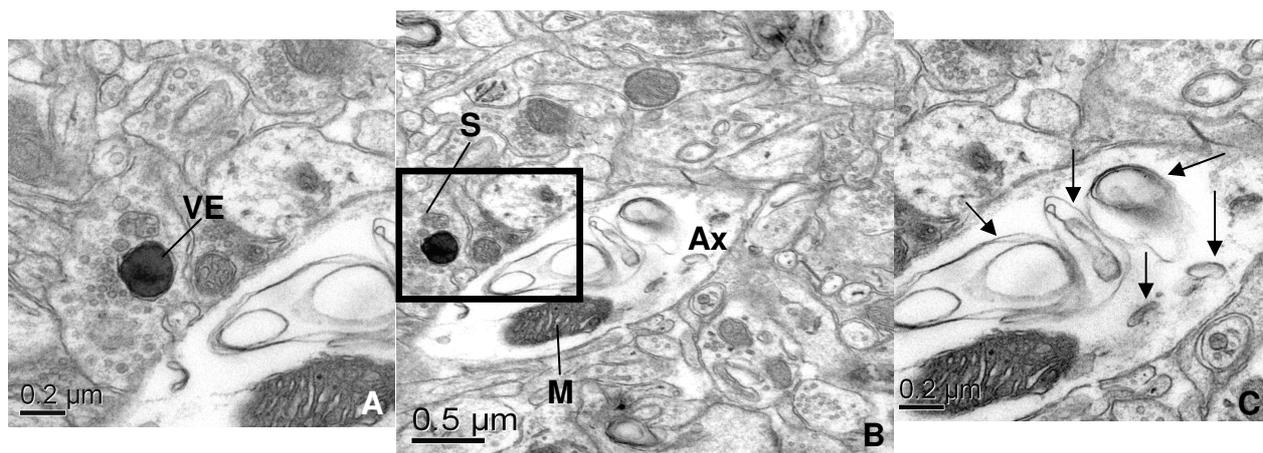


Figura 69: Axônio sem mielina e com alterações no centro. Presença de vesícula exocítica em sinapse adjacente. Córtex frontal, 30 dias – (A) 80k; (B) 40K; (C) 80k. M: mitocôndria; S: sinapse; Ax: axônio; VE: vesícula exocítica. Setas: estruturas alteradas no axônio

6. Discussão

Esta dissertação foi especialmente focada no estudo histológico e ultra-estrutural do sistema nervoso central de camundongos tratados com PAM. A escolha do SNC deu-se pelo fato de não haver estudos específicos no grupo CNANO de biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas neste tecido, sendo necessário o desenvolvimento de tais estudos para futuras aplicações clínicas pouco invasivas no SN.

Em uma primeira etapa nesta dissertação fez-se a determinação dos principais sítios de distribuição e citolocalização de PAM no SNC e detecção de possíveis alterações anormais, patológicas ou não. A discussão foi direcionada nas relações entre o comportamento de PAM e metabolismo de ferro do SNC. A partir dos resultados obtidos nos experimentos, foram comparados com dados da literatura sobre aspectos histológicos, fenotípicos, epigenéticos e potenciais novas aplicações de PAM.

6.1. As amostras de PAM

O ponto inicial para qualquer estudo de desenvolvimento de novos fármacos ou materiais para uso biológico é o reconhecimento das propriedades físicas e químicas relevantes, que determinarão o sucesso da aplicação desejada. Para os dados de propriedades físicas das amostras de PAM, estas foram caracterizadas morfológicamente por MET nesta dissertação e por microscopia eletrônica de varredura (MEV) pelo grupo que a desenvolveu (Simioni *et al*, 2007), a fim de comparar com os resultados histológicos obtidos.

A função principal desejada para PAM consiste primariamente em ultrapassar a BHE sem alterar sua integridade e distribuir-se pelo tecido nervoso sem provocar efeitos tóxicos significantes. A partir daí estaria disponível para diferentes aplicações já utilizadas (entrega de drogas, contraste na ressonância magnética e magnetohipertermia controlada para o tratamento de tumores). Para o PAM, teoricamente dois fatores são essenciais para ultrapassar a BHE: tamanho das microesferas e das nanopartículas e as cargas de superfície. Para responderem a campos magnéticos e ultrapassar a BHE as nanopartículas devem

ser maiores que 4nm, e menores do que 100nm (Gao & Jiang, 2006). Devem possuir também carga neutra ou levemente aniônica para não alterarem a integridade da BHE (Lockman *et al* 2004; Cengeli *et al*, 2006; Saito *et al*, 2006), apesar de existirem trabalhos que usam carreadores para o SN com cobertura catiônica (Bickel *et al*,2001).

As NM da PAM referentes às amostras 1 e 2 caracterizadas no MET demonstraram comportamentos diferentes, sendo que na amostra 1 apresentaram-se polidispersas e com diâmetro modal de 9,2 nm ($\sigma = 0,34$), e de acordo com as fotos em MEV (Fig. 70), as microesferas possuem organização homogênea e diâmetro modal de 30 μ m (Simioni *et al* 2007). Já a amostra 2 apresentou maior

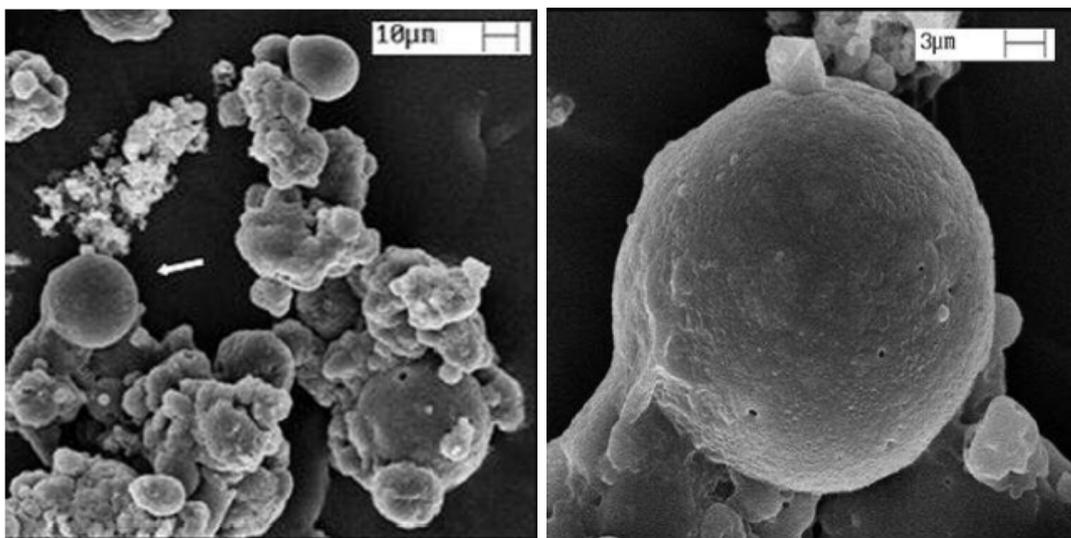


Figura 70: Fotomicrografias em MEV da amostra 1 de PAM – Microesferas de albumina carregadas com nanopartículas de maghemita ($2,28 \times 10^{16}$ partícula/mL) (Simioni *et al*, 2007).

monodispersão das NM com diâmetro modal de 8,9nm ($\sigma = 0,25$) e microesferas bem menores com diâmetro modal de 73nm ($\sigma = 0,37$), sendo chamadas de “beads”. Esta modificação resultou em uma melhor diluição da amostra, facilitando a caracterização e injeção nos camundongos. Segundo Tedesco (comunicação pessoal), os polímeros de albumina formam estruturas micrométricas e não nanométricas. Uma possível explicação para a presença de esferas nanométricas da amostra 2 pode ser sugerida a partir da forma como foi

sintetizada. Para a realização da ligação entre a albumina e as NM, existe uma etapa de aquecimento com um total de 35 minutos a 100°C em óleo de girassol (Simioni *et al*,2006). A desnaturação da albumina normalmente ocorre em torno de 42°C (Silva *et al*, 2005), então, na etapa de aquecimento ocorre a desnaturação parcial da albumina formando os “beads” que podem atingir a escala nanométrica.

Ambas as amostras 1 e 2 de PAM possuem características de tamanhos das NM compatíveis para ultrapassar a BHE, com pequena variação entre elas. Nos testes *in vitro* (Simioni *et al*, 2006, 2007). o contato e efeitos celulares de PAM foram diretos, enquanto que nos testes *in vivo* existiram variáveis como barreiras biológicas, metabolização parcial e alterações de pH tecidual por exemplo, que podem ter alterado a conformação, estabilidade, revestimentos e cargas de superfície de PAM, facilitando ou dificultando a capacidade de atingir o SN.

A partir dos dados de MET e MEV, foi proposto um esquema das amostras de PAM, com o tamanho das microesferas da amostra 1 e dos “beads” da amostra 2 (Fig. 71).

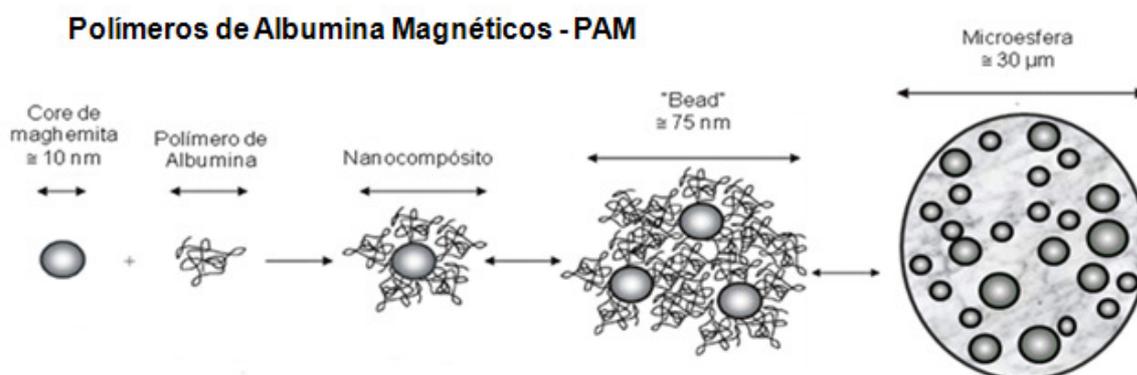


Figura 71: Esquema das amostras de PAM – Formas intermediárias (nanopartícula, polímero de albumina e nanocompósito), “beads” da amostra 2 e microesfera da amostra 1 (Cengeli *et al* 2006, modificado).

Além dos diâmetros das NM, microesferas e “beads”, propriedades químicas do vetor de albumina bovina (BSA) são relevantes para determinar a eficiência de PAM no SN. A albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo dos vertebrados. A cadeia única de polipeptídeos contém

aproximadamente 585 resíduos de aminoácidos resultando em carga negativa em pH neutro (Peters Jr., 1985), compatível com o requisito de carga de superfície aniônica que facilita a interiorização de fármacos pela BHE. Entretanto, moléculas catiônicas são melhores para absorção e interiorização celular, inclusive pela BHE, mas têm maior potencial citotóxico e antigênico (Bickel *et al*, 2001; Cengelli *et al*, 2006). Efeitos tóxicos já descritos de moléculas catiônicas incluem o aumento da permeabilidade periférica e cerebrovascular (Vehaskari *et al*, 1984). A quebra da permeabilidade da BHE pelas moléculas catiônicas pode ser causada por mudanças nas interações eletrostáticas entre as cargas negativas do glicocálix luminal das células endoteliais e as cargas positivas dos aminoácidos das proteínas plasmáticas, não ocorrendo a cobertura normal do glicocálix pelas proteínas plasmáticas, aumentando a permeabilidade de membrana (Bickel *et al*, 2001).

Outra característica da albumina é a capacidade de interagir com diferentes membranas lipídicas e influenciar o transporte molecular e a entrada de moléculas para as células. Estas interações albumina-membranas lipídicas variam em função do tipo de proteína e composição lipídica (Galántai & Bárdos-Nagy, 2000). Além das interações eletrostáticas e interiorizações interendoteliais (Vogel *et al*, 2001), também existe a interação da albumina mediada por receptor específico de membrana celular, a gp60 (glicoproteína 60), uma proteína que se liga especificamente à albumina e media a transcitose por células endoteliais da BHE por via dependente de tirosina kinase (Tiruppathi *et al*, 1997, Vogel *et al*, 2001).

Resumindo, as duas amostras possuem características de tamanho de partículas, carga de superfície e propriedades químicas do vetor, no geral, em concordância com dados da literatura sobre entrega de fármacos para o SN, podendo justificar a especificidade de PAM para tal tecido.

6.2. Interação de PAM com o SNC

O ferro é o principal metal presente no SNC e a habilidade deste estocá-lo e prontamente disponibilizá-lo é essencial para o funcionamento neurológico normal. Eventos dependentes de ferro no SNC são relacionados com a idade (mielinização) e regiões específicas (núcleos sintetizadores de dopamina)

(Connor *et al*,2001). Como em outros órgãos, o ferro é essencial em várias atividades metabólicas, mas a alta produção de ATP explica o alto requerimento de ferro e a alta necessidade de energia do SN. A alta demanda de ATP no cérebro é para manter os gradientes iônicos de membrana, transmissão sináptica, transporte axonal (Beal, 1998), síntese de neurotransmissores (Chen, *et al*,1995), síntese de DNA, síntese de lipídeos e colesterol, substratos importantes para produção de mielina nas quais enzimas metabólicas estão em alta concentração em oligodendrócitos (Connor & Menzies, 1996), atividade do sistema GABAérgico (Taneja *et al*,1990) e para sistemas antioxidantes, sendo que o alvo principal dos radicais livres são os lipídeos, um dos componentes celulares e estruturais predominantes do SN.

6.2.1. Regiões e tipos celulares atingidos por PAM

Pela microscopia de luz foi confirmado que a amostra de PAM chega ao cérebro e a distribuição e concentração destas NM no tecido nervoso está diretamente relacionada com o tempo. A presença de PAM foi dividida de 2 formas: como pigmento férrico (marrom) e ferrocianeto férrico (azul brilhante). As duas formas, marrom e azul, apareceram na coloração de Perls, um dado diferente da literatura (Chaves, 2002; Barbosa, 2004; Sadeghiani, 2004) em que somente o azul aparece nesta coloração. A hipótese para tal ocorrência é que os aglomerados marrons seriam o PAM com as NM ainda sem apresentarem a dissociação do óxido do ferro em Fe^{+3} por estarem protegidas pelos polímeros de albumina e não sofrerem ação tecidual. A atividade enzimática tecidual normalmente inicia a degradação das NM, disponibilizando os sítios de íons férricos para a reação com o ferrocianeto de potássio e formação do ferrocianeto férrico. O azul do Perls seria visível apenas em situações de metabolização parcial de qualquer composto de ferro. A presença de aglomerados marrons também foi visível em neurônios dopaminérgicos dos controles. Isto se deve à presença de neuromelanina, também formada de aglomerados de ferritinas, estruturas nas quais possuem cristais de ferrihidrato, semelhantes à composição das NM de PAM.

Uma hipótese para a existência de 2 picos do pigmento férrico (marrom) seria: o primeiro pico como biodistribuição normal após o tratamento e o segundo pico resultante da liberação posterior de hemácias seqüestradas por órgãos como o baço ou novas gerações de hemácias que interiorizaram PAM durante a fase de produção e maturação na medula óssea. Sendo que as primeiras regiões a serem atingidas foram: (a) a substância cinzenta do córtex superficial a partir dos pequenos capilares e (b) regiões profundas próximas e no plexo coróide do ventrículo lateral e do 4º ventrículo, como o cerebelo. Esta ocorrência aparentemente confirmou o efeito de menor eficiência em conter solutos da BHE próxima aos órgãos circunventriculares (OCV) (Misra & Shah, 2003).

Entretanto, a presença do ferrocianeto férrico (azul) atingiu o pico em todas as estruturas analisadas em 2 dias, o que pode indicar o metabolismo e degradação de PAM. Os íons dissociados de Fe^{+3} seriam provenientes das células do SN que o interiorizaram, metabolizaram e excretaram o excesso no neurópilo, e da circulação sanguínea e do líquido encéfalo-raquidiano, resultantes de metabolização precoce de PAM antes de chegar ao SN.

O SNC, devido às suas características intrínsecas de composição e funcionamento, é mais ácido do que os outros órgãos (Moos & Morgan, 2004), porém, o ferro é mais solúvel em pH baixo (Schafer & Buettner, 2000). Talvez, estes dados expliquem porque o PAM foi liberado das hemácias e em seguida interiorizado pelas células endoteliais, atravessando a BHE e atingindo as demais células do parênquima nervoso. Esta situação de rápida interiorização do ferro principalmente por células da glia, pode ter acontecido como um sistema de defesa do tecido. O ferro em ambiente ácido é liberado de sítios “seguros”, e por meio de reações Fenton são produzidos hidroperóxidos, que aumentam a peroxidação lipídica mediada por radicais livres, de células e seus componentes, além de influenciar nos processos metabólicos (Schafer & Buettner, 2000). Alterações de processos metabólicos por baixo pH já foram reportadas em tumores humanos (Schafer & Buettner, 2000) e diminuição da afinidade da transferrina de se ligar ao Fe^{+3} (Qian *et al*, 1999), o que implicaria inclusive, em diferenças nos sistemas de interiorização de ferro por células do SN em relação aos tecidos periféricos.

Aparentemente, as **hemácias** funcionaram como veículos para transporte e proteção de PAM contra células do sistema retículo fagocitário e metabolização dos demais órgãos. Análises histológicas de PAM nos pulmões, fígado, baço e rins não demonstraram a presença significativa do pigmento férrico e ferrocianeto férrico (Estevanato L.L.C., comunicação pessoal), isto quer dizer que o PAM tem alta especificidade para o SN.

Estudos de interação de hemácias com NM já foram reportados por Soler *et al* (2007). Em seu estudo a interiorização de NM dependeu da concentração e raios hidrodinâmicos dos fluidos magnéticos testados e sugeriram que a travessia das NM ocorreu por difusão passiva ou endocitose mediada por receptor. Para o PAM a interiorização pode ter ocorrido através de endocitose mediada por transferrina ou albumina. Mas outra forma de interiorização é sugerida, através de alterações da fluidez da membrana celular das hemácias pelos íons de ferro dissociados das NM de PAM, que afetaram a estrutura e funções das bicamadas fosfolipídicas. Este efeito já foi reportado em estudos *in vitro* com íons de Fe^{+3} e Fe^{+2} em modelos moleculares de biomembranas. Nesta investigação o Fe^{+3} induziu as maiores perturbações na estrutura multilamelar (Suwalsky *et al*, 2005). Em concordância com o estudo anterior, a dissociação das NM de maghemita do PAM só produz Fe^{+3} , agente principal das alterações das membranas das hemácias. Não só hemácias podem ser afetadas, mas já foi reportado, por exemplo, que altas concentrações de íons de ferro aumentam a fluidez da membrana neuronal (Ohba *et al*, 1994), efeito que pode alterar a permeabilidade dos neurônios.

Soler e colaboradores (2007) quando descreveram a interiorização de NM em hemácias, também detectaram que estas NM interferiam na curva de dissociação da oxihemoglobina, ou seja, as hemácias permaneciam saturadas com O_2 por mais tempo. Estes achados têm grande potencial de acontecerem com as hemácias com PAM, adicionando mais um tipo de NM como sistema de entrega com vetores fisiológicos, no caso, as hemácias.

A linha de frente que recebeu o PAM no SNC foram as **células da BHE**, que incluem as células endoteliais, pericitos e astrócitos. No SNC regiões do cérebro e alguns tipos celulares têm maior predisposição para adquirir ferro. Esta

variação da distribuição de ferro está relacionada com a composição, funções das populações celulares habitantes e da BHE, que protege áreas do cérebro regulando regionalmente a aquisição de ferro (Connor *et al*, 2001). O ferro quando atravessa a BHE é capturado pelas células que a compõem e também pelos oligodendrócitos próximos aos vasos sanguíneos (Burdo *et al*, 1999). As tendências de ultrapassagem de NM pela BHE e distribuição no SNC estão diretamente relacionadas com características inerentes à NM, como a cobertura (composição, carga superficial, etc) e tamanho, além de características da BHE, como composição celular, regiões de atividade, estado de saturação de íons e moléculas da BHE entre outras. Os astrócitos, por exemplo, dependendo de características do meio no momento, são capazes de modular a permeabilidade da BHE atuando nas células endoteliais, induzindo na formação de “*tight junctions*” (Dehouck *et al*,1990), expressão e localização de proteínas de transporte, concentração de íons, neurotransmissores (Ullian *et al*, 2004) e vasodilatação durante aumento da atividade neuronal (Takano *et al*,2006).

No caso de PAM, o transporte através da BHE pode ter ocorrido pela cobertura de albumina, que tem receptores específicos e afinidade pelas células endoteliais (Tiruppathi *et al*,1997; Vogel *et al*, 2001; John *et al*, 2003), ou pelo sistema de transferrina, ambos com formação de vesículas endocíticas. Transportadores de nutrientes identificados em capilares do cérebro estão sendo utilizados para a entrega de peptídeos e proteínas para a travessia da BHE. Vários receptores específicos foram identificados como, para insulina (van Houten *et al*, 1979), fatores de crescimento insulina “like” (IGF-I, IGF-II) (Duffy *et al*, 1988), interleucina 1 (Hashimoto *et al*, 1991), transferrina (Connor *et al*, 2001) entre outros. Porém, a transcitose através da BHE *in vivo* por enquanto é mais convincente para a transferrina, que também pode ser regulada pela insulina ao alterar a redistribuição de receptores de transferrina intracelulares para a membrana plasmática (Davis *et al*,1986). As rotas de interiorização de PAM pela BHE podem ocorrer a partir da cobertura (albumina) ou pelas NM de óxido de ferro via os transportes com ou sem transferrina, representados nas rotas 2, 3a, 3c,3d e 4 da figura 72.

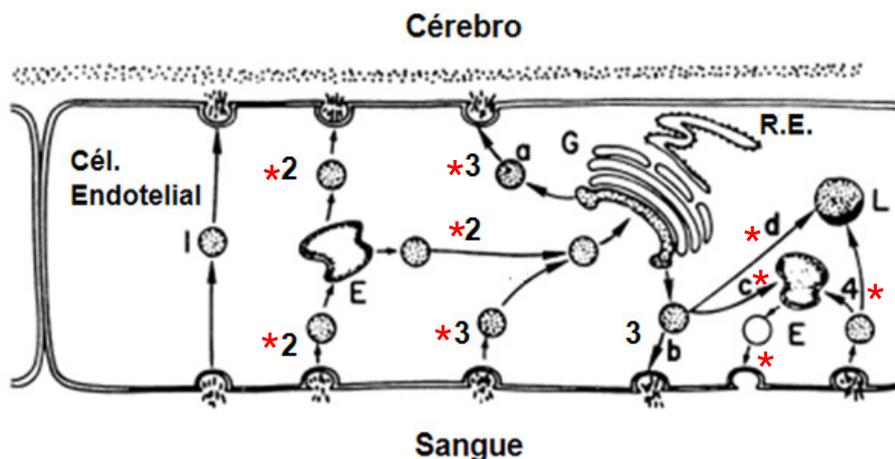


Figura 72: Rotas possíveis de interiorização de PAM através das células endoteliais da BHE – A interiorização pode acontecer por endocitose ou por transcitose mediada por receptor. (1) Transferência vesicular transendotelial direta; (2) Endocitose com formação de endossomo (E) sem ou com fusão indireta com sáculos do complexo de Golgi; (3) Fusão direta de vesículas endocíticas com sáculos do Golgi e exocitose: (a) na membrana celular abluminal, (b) membrana celular luminal, (c) fusão do lisossomo primário derivado do Golgi com endossomo, (d) fusão direta do lisossomo primário com vesícula endocítica formando um lisossomo secundário (L); (4) Reciclagem da superfície da membrana celular interiorizada. (Broadwell, 1989, modificado).

Outro mecanismo de transporte de ferro para o cérebro menos estudado é pelo sistema ventricular, formado pelas **células ependimárias** e **plexo coróide**. As células do plexo coróide também contêm os mesmos tipos de receptores envolvidos na interiorização de ferro como as outras células do SN, porém, em estudos com injeção de ferro marcado e outros metais, demonstram o acúmulo destes componentes dentro de 1 hora no plexo coróide (Malecki *et al*, 1999). Em deficiência de ferro a interiorização é preferencialmente no plexo coróide (Dwork, 1995). Entretanto, devem-se considerar diferenças que possam contribuir para o acúmulo de ferro no plexo coróide, como o alto fluxo sanguíneo e BHE pouco eficiente.

As células do plexo coróide como mencionado, também possuem receptores para transferrina, mas a quantidade destes receptores corresponde em apenas um pouco mais de 5% do total de receptores de transferrina no cérebro (Bartlett *et al*, 1991). Vale ressaltar que a expressão de mRNA de transferrina no plexo coróide é espécie específica, variando grandemente entre as espécies e

não sendo expresso em células do plexo coróide de humanos (de Arriba Zerpa *et al*, 2000). Este fato pode ser relevante para qualquer aplicação de sistemas de direcionamento e entrega de drogas, que seja com ferro e aplicado para o SN de seres humanos. O plexo coróide é a principal fonte de transferrina para o fluido cérebro-espinhal (FCE), mas o influxo de transferrina do fluído intersticial do cérebro para o FCE não é significativo (Connor *et al*, 2001). Em estudos de perfusão e transporte de ferro no SN de ratos com ferro marcado, a interiorização de ferro ligado à transferrina foi acima de 35% menor do que a interiorização de ferro livre para o tecido nervoso, mas em contrapartida a entrada de ferro ligado à transferrina foi quase o dobro para o FCE em comparação com o ferro livre (Deane *et al*, 2004). Estes dados sugerem que a interiorização de PAM no SN em um primeiro momento, para o parênquima pode acontecer principalmente por sistemas não dependentes de transferrina e no FCE o contrário. E em um segundo momento, o ferro do FCE seria disponibilizado para o parênquima nervoso diretamente ou pelo sistema ventricular. Esta situação pode explicar a existência do segundo pico de pigmento férrico.

A interiorização de ferro por mecanismos não dependentes de transferrina incluem principalmente o DMT1, um transportador divalente de metais presente em células endoteliais da microvasculatura, no plexo coróide e células endimárias dos ventrículos (Connor *et al*, 2001). Por este sistema pode ser justificado, por exemplo, a presença de NM aparentemente sem cobertura no citoplasma de células do SN. Em estudos com ratos Belgrado com defeito em DMT1, estes animais apresentaram menor quantidade de ferro e interiorização dependente de transferrina no cérebro (Oates & Morgan, 1996), sugerindo que a interiorização de ferro por transferrina não seja a principal forma de transporte deste metal no parênquima nervoso.

Além da presença de PAM dentro das células do sistema ventricular, foi observada a presença de grânulos no interstício do plexo coróide. Estes grânulos podem ser aglomerados de NM ou PAM, que foram retidos após ultrapassarem a BHE. Este fato pode ter acontecido devido ao alto fluxo de sangue nesta região, à BHE pouco eficiente dos OCV que permitiu a passagem de aglomerados maiores de PAM ou NM e pela tendência de concentração de ferro no plexo coróide.

O **neurópilo** é a região constituída pelos prolongamentos das células de suporte e principalmente dendritos e axônios dos neurônios. Esta região foi a que mais concentrou ferro (Fe^{+3}) após a aplicação de PAM. Aparentemente, não foram visíveis formações com pigmento férrico nesta região, presentes apenas nos corpos das células do SN.

Microesferas de $30\mu\text{m}$ também foram visualizadas no SN podendo significar que partículas acima de 100nm ultrapassaram a BHE e é provável que a interiorização para o cérebro tenha ocorrido pelo plexo coróide dos ventrículos laterais, já que tal microesfera estava próxima da região do diencéfalo e de estruturas subcorticais (Connor *et al*, 2001) do córtex parietal. Este fato está em concordância com o que já foi relatado, segundo a qual a concentração de ferro é maior em áreas do cérebro associadas com as funções motoras como o córtex parietal (Connor *et al*, 1992).

Observa-se principalmente a presença do ferro como “manchas” no neurópilo circundando núcleos de neurônios. Esta característica significa que os íons de Fe^{+3} estão dispersos no parênquima nervoso e tem potencial de interagir com as membranas lipídicas das células. As interações dos íons férricos com fosfolipídios das bicamadas podem levar a perturbações das estruturas das membranas celulares (Suwalsky, *et al* 2005) e diminuir a fluidez das membranas neuronais (Ohba *et al*, 1994). Neste mesmo trabalho também foi relatado os efeitos de íons ferrosos em aumentar a fluidez de membranas neuronais, talvez por eventos de peroxidação lipídica. As alterações estruturais das membranas podem levar a uma maior interiorização de ferro por modificações de permeabilidade e este metal interagir com estruturas dos citoesqueletos neuronais, por exemplo, podendo interferir nos sistemas de transporte axonal e formação sináptica.

O ferro ao ser interiorizado pela célula, para estar no citoplasma precisa estar na forma de Fe^{+2} e esta forma tem alta afinidade ao ATP e AMP (Qian *et al*, 1997). A presença de NM de óxido de ferro nos prolongamentos neuronais pode levar a duas formas de alteração: a) oxidação de componentes celulares como proteínas envolvidas nos processos de transporte axonal e b) seqüestro de ATP pelo excesso de íons de ferro e diminuição da formação de complexos entre os microtúbulos e as proteínas de transporte ou alteração das velocidades de

transportes nestes sistemas. Novos estudos devem ser feitos para determinar se as NM são capazes de interferirem nos fluxos axonais e se são significativas para alterarem as transmissões sinápticas e conseqüentemente o comportamento cerebral.

As **células da glia** formam redes estruturais e funcionais com complexas vias de comunicações intercelulares, que permitem sinalizações rápidas e lentas entre elas e com os neurônios. São também as células de suporte dos neurônios garantindo a organização e funcionamento do tecido nervoso. O SN só perde para o fígado na quantidade e processamento de ferro não heme, correspondendo em aproximadamente 60mg (Hallgren & Sourander, 1958), sendo que 1/3 a 3/4 é estocado nas células da glia (Morris *et al*, 1992). O conteúdo de ferro no SN é restrito a determinadas regiões e dependente do estado de maturação e idade (Pintero *et al*, 2000).

A interferência das células gliais no metabolismo de ferro e proteínas exógenas, como a albumina bovina, tem como finalidade a manutenção do equilíbrio do microambiente nervoso e minimização dos efeitos negativos. Devido à aplicação de PAM, as células da glia responderam de acordo com as funções e regiões de concentração, havendo dois sítios de acúmulo de PAM, observados na microscopia de luz: a) córtex, principalmente células associadas aos neurônios, provavelmente astrócitos e b) substância branca em células associadas ao neurópilo, provavelmente os oligodendrócitos.

A interiorização de PAM pelos astrócitos pode ocorrer em um primeiro momento como uma resposta de proteção. Entretanto, um novo receptor foi reportado por estar associado com a interiorização de albumina pelos astrócitos, além do gp60, o TGF- β Rs (transforming growth factor β receptors). A interiorização de albumina por este receptor é acompanhada pela redução do tamponamento do potássio extracelular pelos astrócitos, resultando em hiperexcitabilidade neuronal mediada por receptores NMDA (n-methyl-d-aspartate receptor) e eventual atividade epileptiforme (Ivens *et al*, 2007). A atividade epileptiforme também foi associada com a presença de ferro (Gorter *et al*, 2005) e alterações dos níveis de aminoácidos neurotransmissores. Em um experimento realizado com a injeção de solução de cloreto de ferro, os níveis de aspartato e

glutamina diminuíram e de glicina e alanina aumentaram. Estes resultados sugeriram que tais aminoácidos estão envolvidos em convulsões agudas e formação de focos crônicos de epilepsia induzida por ferro em ratos (Shiota *et al*, 1989), sendo necessário o aprofundamento de estudos referentes a PAM e até possíveis restrições de uso. Como os astrócitos participam na neuroproteção contra o estresse oxidativo, um dos principais antioxidantes do SN, a glutathiona, está presente nestas células (Smythies, 1999).

Os oligodendrócitos são as células do SN que mais são coradas pelo ferro. Todos os tratos de substância branca do SN contêm oligodendrócitos ferro positivos (OFP) nas espécies já utilizadas em experimentos (humanos, macacos, ratos, camundongos e porcos) (Connor *et al*, 2001). Normalmente a substância branca tende a acumular mais ferro do que a substância cinzenta (Rajan *et al*, 1976). Em concordância com estes dados da literatura, após a aplicação de PAM, a substância branca do SN (neurópilo) e suas células estiveram fortemente coradas com ferro, sugerindo indicar os oligodendrócitos. Intracelularmente o ferro em oligodendrócitos é encontrado no citoplasma do pericário (ao redor do núcleo) e nos prolongamentos (Connor & Menzies, 1996). Durante o desenvolvimento normal do SN o ferro aparece primeiro na micróglia da substância branca e em seguida nos oligodendrócitos, não sendo detectado mais na micróglia. O aparecimento de ferro nos oligodendrócitos corresponde espacialmente e temporalmente ao aparecimento e produção de mielina (Connor & Menzies, 1996). Em cérebros de adultos os oligodendrócitos estão mais próximos a BHE (Burdo *et al*, 1999).

A micróglia corresponde a aproximadamente 1/10 de todas as células gliais (Banati, 2003). É o tipo celular do SN que mais acumula ferro em situações de lesão, mas raramente são vistas acumulando ferro em SN normais (Sastry & Arendash, 1995). Já foi demonstrado que existem dois tipos de micróglia: a não ativada e a ativada, ambas influenciando o crescimento e sobrevivência de oligodendrócitos, sendo que a primeira é capaz de aumentar a sobrevivência e a segunda é tóxica. Neste mesmo trabalho também foi indicado que a ferritina liberada pela micróglia é uma fonte importante de ferro para os oligodendrócitos (Zhang *et al*, 2006), explicando em parte o aparecimento inicial de micróglia com ferro durante o desenvolvimento do SN, seguidas pelos oligodendrócitos. As

micróglias respondem precocemente às inflamações, desde tecidos aparentemente normais histologicamente até doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, encefalopatia do HIV (Human immunodeficiency vírus) e doenças priônicas (Streit *et al*,2004). A ativação de micróglias (Fig. 73) pode ocorrer com o aumento do potássio extracelular (Boucsein *et al*,2000), ondas de Ca^{+2} liberadas por astrócitos (Schipke *et al*, 2001) e por estímulos de citocinas liberadas por neurônios lesados e outras células gliais.

Uma das citocinas que ativa micróglias participa em processos inflamatórios e tem relação com o metabolismo de ferro é a interleucina 6 (IL-6). A elevação da IL-6 é uma característica comum das lesões cerebrais e patologias neurodegenerativas, sendo que a ativação microglial induzida por ela não é observada em macrófagos periféricos (Shafer *et al*,2003). Os efeitos da IL-6 no SN incluem também regulação da regeneração de neurônios, ativação de astrócitos e sobrevivência de oligodendrócitos (Klein *et al*, 1997).

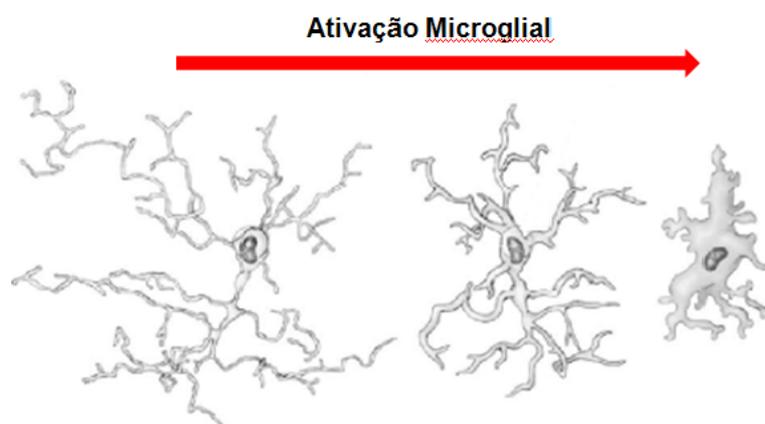


Figura 73: Padrão morfológico de ativação glial. Normalmente a micróglia não ativada tem mais ramificações, e no processo de ativação, ficam morfológicamente semelhantes aos macrófagos teciduais dos órgãos periféricos. (Banati, 2003, modificado).

Em estudos do grupo CNANO foi reportado a secreção de IL-1 e IL-6 por células pulmonares após a aplicação de fluido magnético a base de NM de magnetita recobertas por DMSA (Chaves, 2002), podendo indicar uma leve resposta inflamatória. Em outro estudo, foi relatado a expressão de hepcidina, um peptídeo antimicrobiano e regulador do metabolismo de ferro (Park *et al*, 2001),

em macrófagos alveolares após estímulo com lipopolisacarídeo (LPS) e ferro marcado ligado à transferrina; como consequência houve a produção de IL-1 e IL-6, que não afetaram a síntese de hepcidina, mas ambas aumentaram a importação celular de ferro e diminuíram a exportação de ferro pelos macrófagos alveolares (Nguyen *et al*, 2006).

Extrapolando estes resultados para PAM, hipoteticamente ocorreria um aumento da interiorização de NM, da expressão de hepcidina e de interleucinas pró-inflamatórias, que também poderiam ser induzidas pela presença da BSA, uma albumina bovina aplicada em camundongos. Todos estes fatores resultariam na ativação de micróglia, efeito não desejado, mas relacionado com neuroinflamações. No entanto, resultados em órgãos periféricos não necessariamente serão iguais para o SN, necessitando de novos estudos específicos para PAM, uma vez que esta amostra apresentou alta especificidade para o SNC.

Em **neurônios**, a interiorização de PAM/NM foi visualizada tanto pela microscopia de luz como pela microscopia eletrônica. Os neurônios, assim como os outros tipos de células de outros tecidos, também possuem os receptores e toda a maquinaria para manutenção da homeostasia do ferro. O metabolismo das ferritinas neuronais tem algumas variações como formação no corpo celular, maturação, degradação e exportação nos axônios e terminais sinápticos (Rouault, 2001) (Fig. 74). As ferritinas têm importância fundamental no estoque, disponibilização e manutenção das funções neuronais, estando em diferentes formas e distribuição celular. Alterações na quantidade de ferro ou da funcionalidade das ferritinas podem provocar o acúmulo de Fe^{+2} neuronal até os terminais sinápticos, ocorrendo estresse oxidativo dos componentes celulares (Rouault, 2001).

As células nervosas também têm outros sistemas que auxiliam no controle do ferro devido a sua constituição ricamente lipídica, alta necessidade de ferro para manutenção das funções e impossibilidade de divisão como a maioria das outras células, que usam deste artifício para reduzir o conteúdo de ferro (Gaasch *et al*, 2007). Alguns exemplos destes sistemas são: as catecolaminas que têm

características antioxidantes (Smythies, 1999) e a síntese de neuromelanina (Zecca *et al*, 2003; Zucca *et al*, 2006), dentre outros.

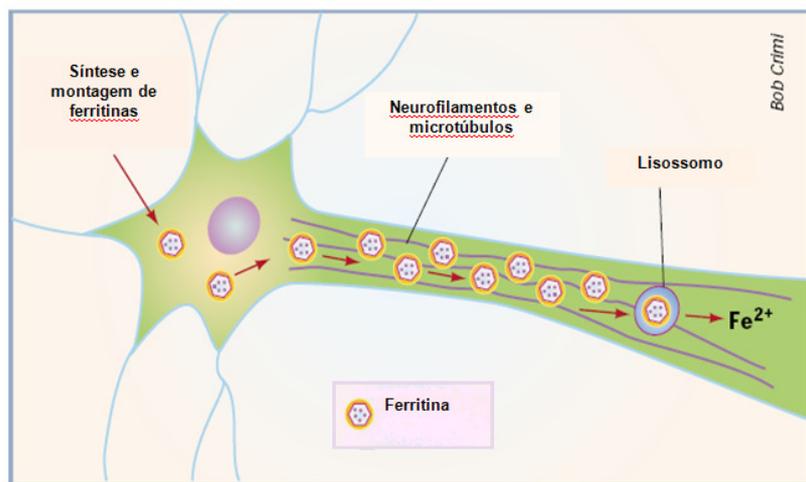


Figura 74: Formação e transporte axonal de ferritinas (Rouault, 2001).

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a exposição dos neurônios ao ferro induzem um aumento dose-dependente da peroxidação lipídica (Qian *et al*, 1999) e modificações dos padrões de fosforilação de proteínas (Egaña *et al*, 2003), levando à perda da viabilidade celular por meio da apoptose (Zhang *et al*, 2003). Inclusive em testes *in vitro* com células renais e tumorais de glândulas submandibulares testadas com PAM (Saldanha, 2007).

PAM/NM teve uma predileção de interiorização pelos neurônios menores do cerebelo. Deste fato podem ser sugeridas várias explicações, como a) diferenças da expressão de receptores envolvidos na importação de PAM/NM para estes tipos celulares; b) receptores que interiorizam outras moléculas também envolvidos na interiorização de íons de ferro, como canais de Ca^{+2} abertos por voltagem, do tipo-L (Gaash *et al*, 2007) e outros transportadores de membrana para íons divalentes; c) características regionais, como tendência de acúmulo de ferro em regiões envolvidas com funções motoras (Connor *et al*, 1992), como o córtex parietal e o cerebelo e d) composição do microambiente próximo aos neurônios, como pH (Schafer & Buettner, 2000); fatores que aumentem a solubilidade do ferro como a cisteína (Glahn & Campen, 1996), o ácido ascórbico (Smythies, 1999) e ATP (Weaver & Pollack, 1990); presença de

íons que interfiram na óxido-redução do ferro como o Na^+ (Egyed, 1991), K^+ e Cl^- (Nakagawa & Ono, 1985); intensidade de metabolização celular entre outros.

Aparentemente, o PAM não provocou alterações patológicas significativas, entretanto, em 30 dias após o tratamento foi observado a formação de aglomerados de pigmento azul em um dos pólos do pericário dos neurônios do córtex. Existem doenças do armazenamento lisossomal em caninos, felinos, ruminantes, eqüinos e primatas, incluindo os humanos, como a ceróide-lipofuscinose. Esta doença é caracterizada pelo aumento da peroxidação lipídica em neurônios cerebrais devido ao acúmulo de certos tipos de materiais nos lisossomos. Tem origem genética ou adquirida e histologicamente é semelhante às alterações neuronais com 30 dias após o tratamento com PAM (Fig. 75) (Carlton & McGavin, 1998).

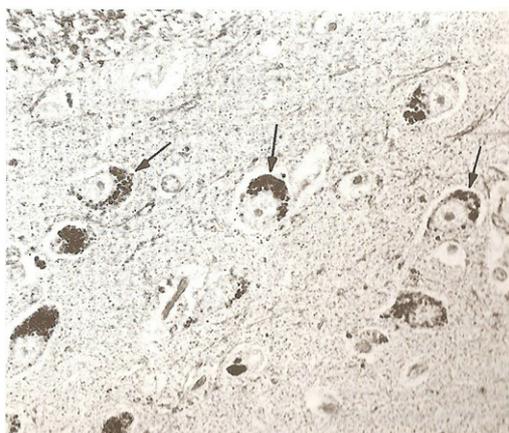


Figura 75: Ceróide-lipofuscinose no encéfalo de ovino. Os neurônios afetados possuem acumulação de material em um dos pólos. Coloração de Sudan-black para lipídeos (Carlton & McGavin, 1998).

O PAM naturalmente tem grande potencial em aumentar a peroxidação lipídica e estresse oxidativo em outras moléculas, devido à presença de NM de óxido de ferro e o SN tem características que contribuem para tais efeitos. Várias doenças neurodegenerativas estão associadas com problemas em sistemas que regulam o metabolismo de ferro, como Parkinson, Alzheimer, Ataxia de Friedreich, Huntington e outras (Dobson 2001; Moos & Morgan, 2004). É interessante relacionar, por exemplo, que a huntintina, proteína mutada na doença de Huntington é essencial para membranas e organelas de membrana nucleares e perinucleares, e na regulação da homeostasia e tráfico do ferro (Hilditch-Maguire

et al, 2000); a frataxina, também mutada na Ataxia de Friedreich, é uma chaperona mitocondrial que participa no metabolismo do ferro (Wilson, 2003). Estas mesmas regiões e estruturas também foram alvos de PAM, de forma que o PAM pode ser um candidato para a entrega de moléculas e terapia gênica em ambas doenças. A afinidade de PAM com os lipídeos também pode afetar a síntese e funcionamento de neuroesteróides simplesmente pela composição destes hormônios, podendo interferir na atividade hormonal do organismo como um todo, reorganização do SN e até alterações de comportamento (Baulieu, 1998).

O PAM demonstrou nesta dissertação e em outros estudos (Saldanha, 2007; Estevanato L.L.C., comunicação pessoal) o grande potencial clínico, porém, possíveis efeitos no SN merecem maiores investigações que possam garantir a segurança do uso de PAM.

6.2.2. Organelas e estruturas celulares atingidas por PAM

Após a aplicação de PAM nos camundongos, a análise do tecido nervoso demonstrou a presença de NM em diferentes organelas, principalmente nas que possuíam membranas lipídicas, e a formação de estruturas cristalizadas que podem ser de ferro. Estes resultados representam a alta afinidade das NM por lipídeos e o risco da peroxidação lipídica.

As **vesículas endocíticas** foram as primeiras organelas vistas com PAM/NM, mas estavam presentes apenas em células da BHE e células da glia. Um dos mecanismos que participou da interiorização de PAM nestas células, ocorreu por endocitose mediada por receptor. Os receptores envolvidos provavelmente dependeram dos tipos de substratos expostos, sendo eles a albumina ou íons de ferro.

Os **corpos multivesiculares** são endossomos tardios após fusão com lisossomos ou organelas nas quais os conteúdos estão compartimentados, sem necessariamente ter se fundido com um lisossomo (Bright *et al*, 2005). A degradação por pH ácido e ativação enzimática, geralmente presente nestes

compartimentos, podem ter desnaturado o restante de albumina, dispersando as NM nas diferentes vesículas destes corpos. Estas organelas foram vistas em células gliais e em neurônio, próximas ao pericário. Os destinos destes corpos podem ser a liberação do conteúdo de ferro após metabolização com direcionamento para diferentes sítios que utilizam ferro ou formação de corpos residuais não digeridos. Os corpos multivesiculares eventualmente poderiam se tornar exossomos e liberar o conteúdo para fora da célula ou distribuir o conteúdo entre diferentes tipos celulares por comunicação célula-célula (Fevrier *et al*, 2005).

A presença de PAM/NM no **retículo endoplasmático** (RE) e no **complexo de Golgi** pode ser explicada por 3 hipóteses: a) afinidade natural das NM por membranas lipídicas, b) existência de proteínas regulatórias de ferro (IRP- iron regulatory proteins) nas membranas destas organelas e no citoplasma (Patton *et al*, 2005), sugerindo também uma explicação para a presença de NM no citosol, dependendo da disponibilidade de ferro intracelular, que afeta a distribuição das IRPs, e c) existência de um sistema de exportação de ferro mediado pelo transportador de Fe dependente de ATP (Fe-ATPase), RE e transferrina (Barañano *et al*, 2000). A atividade de Fe-ATPase é enriquecida nas frações microsomais e atua transportando Fe^{+2} para o interior de frações de RE para subsequente exocitose. O ferro no interior das vesículas de RE se liga às transferrinas, que são requeridas para a liberação de Fe, no fígado (Baker *et al*, 1980), no cérebro e principalmente no baço (Barañano *et al*, 2000). É importante destacar que distúrbios provocados pelas PAM/ NM no funcionamento normal do RE podem levar a uma resposta de estresse celular conservada evolutivamente, podendo ativar vias de morte celular, reconhecidas em várias doenças como hipóxia, isquemia, neurodegenerações, doenças cardíacas e diabetes (Xu *et al*, 2005).

Outro tipo de organela com membrana lipídica atingida por PAM/NM foram as **mitocôndrias**. Existem dois tipos de mitocôndrias no SN, as sinápticas e não sinápticas. As mitocôndrias sinápticas aparentemente foram o principal tipo atingido pelas NM, mas não demonstraram nenhuma alteração morfológica significativa, enquanto que com as não sinápticas aconteceu o contrário. O fato

das mitocôndrias serem alvos de PAM/NM pode ser devido a importância destas organelas sintetizarem ATP, molécula altamente reativa com o ferro (Goucher & Taylor, 1964), participarem da biosíntese de heme e clusters de Fe-S, que funcionam como co-fatores de diversos tipos de proteínas essenciais para o funcionamento de células eucarióticas (Lill & Mühlhoff, 2006) e sintetizarem ferritinas **mitocondriais** (Levi *et al*, 2001). Depois que o ferro é interiorizado e processado, proteínas citosólicas, ATP e AMP (Goucher & Taylor, 1964; Weaver & Pollack, 1990; Qian *et al*, 1997) são encarregadas de transportá-lo para a mitocôndria. Em concordância com a literatura, proporcionalmente houve um maior acúmulo de PAM/NM nas mitocôndrias, principalmente as sinápticas, do que no citoplasma. Entretanto, alterações de mitocôndrias não sinápticas foram observadas. Estes efeitos podem ser devido à ação direta do estresse oxidativo nas estruturas mitocondriais ou por alterações na conformação do DNA mitocondrial, aumentando a susceptibilidade de mutações, alterações da transcrição e desestabilização das funções mitocondriais. Este efeito foi sugerido porque já foi relatada a capacidade do ferro em induzir modificações conformacionais no DNA mitocondrial (Yaffee *et al*, 1996).

PAM/NM foram encontrados nos **terminais pré e pós-sinápticos**. Proteínas do metabolismo de ferro também estão presentes nestas estruturas. Ferroportina, envolvida na exportação de ferro, é encontrada dentro de vesículas pré-sinápticas, indicando que o ferro pode ser transportado do citosol para dentro de vesículas sinápticas e daí para a fenda sináptica, permitindo que as membranas pré e pós sinápticas tenham contado com os íons de Fe^{+2} livres (Wu *et al*, 2004). A função do ferro dentro das vesículas sinápticas ainda é desconhecida, mas pode estar envolvida em mecanismos de tráfico de ferro no SN (Gaasch *et al*, 2007). Algumas funções para o ferro e produção de radicais livres seriam a modulação das espinhas sinápticas (Smythies, 1999), regulação da expressão gênica (Suzuki *et al*, 1997) e participação nos mecanismos de ação de fatores de crescimento de nervos (Dugan *et al*, 1997). As catecolaminas são potentes antioxidantes capazes de eliminar radicais livres e atuar como quelantes de ferro (Smythies, 1999).

Estes dados reforçam a importância do aprofundamento de potenciais efeitos de PAM no SN, uma vez que tal amostra atingiu sinapses de diferentes regiões e tem potencial efeito oxidante, que pode interferir indiretamente no comportamento.

De acordo com a microscopia de luz foi demonstrada a tendência de acúmulo de PAM/NM no neurópilo. Este dado foi confirmado ultra-estruturalmente pela presença de aglomerados de NM nas **bainhas de mielina** dos **axônios**, aumentando em acúmulo e tamanho dos axônios de acordo com tempo. A presença de alterações como “descamações” das bainhas de mielina e degenerações de prolongamentos devido à perda da rede interna de filamentos com o acúmulo de NM, foram visíveis somente nos tempos iniciais. Estas alterações estão associadas com os efeitos do ferro das NM de PAM e a peroxidação lipídica, a qual ocorre na presença dos íons de Fe^{+2} e Fe^{+3} , cujas valências determinam as velocidades das reações, sendo rápida ou lenta, respectivamente. A iniciação da peroxidação é determinada pela presença do radical hidroxila, produzido nas reações Fenton e pela presença de ferro (Ferreira & Matsubara, 1997). Outro fator que pode interferir na integridade das bainhas de mielina é o tamanho nanométrico das partículas de óxido de ferro, as quais são capazes de realizarem maiores interações intermoleculares do que partículas maiores. Como citado anteriormente, íons de Fe^{+3} provocam perturbações profundas na ultra-estrutura de bicamadas fosfolipídicas, podendo alterar a permeabilidade e estabilidade da membrana celular (Suwalsky *et al*, 2005). Apesar da susceptibilidade das membranas lipídicas aos efeitos de radicais livres, existem antioxidantes nestas membranas como a vitamina E (Smythies, 1999).

A presença de **fagossomos** e **lipofucsina** com PAM/NM reflete a afinidade das NM aos restos de lipídeos. No caso dos fagossomos, estas estruturas são multilamelares, possuem NM e são resultantes da fagocitose de debris celulares. As lipofucsinas são restos metabólicos que possuem lipídeos e proteínas não digeridas, que também acumularam NM.

As **vesículas exocíticas** com NM só foram vistas em neurônios nos tempos intermediário (7 dias) e tardio (30 dias). A formação destas vesículas está associada com a excreção do excesso de ferro, a fim de evitar efeitos resultantes da formação de radicais livres, como oxidação de estruturas, organelas e moléculas. Estas vesículas estavam presentes nos axônios e foram transportadas anterogradamente de acordo com o processamento de ferro nos neurônios.

Os **peroxissomos** ou **lisossomos** com NM e **estruturas incomuns** foram encontrados nos tempos iniciais de (30 minutos a 12 horas) e intermediário (2 dias). Durante este período, nas estruturas classificadas como incomuns foi detectada a presença de estruturas cristalinas de óxido de ferro de duas origens: artificial e provavelmente biológica. As estruturas artificiais foram as **NM de PAM** dispersas nos citoplasmas de células gliais e hemácias, com diâmetros médios de 10nm e NM maiores, com diâmetros aproximados de 100nm, presentes no neurópilo. As NM menores foram interiorizadas e aparentemente estavam sem cobertura, possivelmente desnaturada devido à acidez característica do citoplasma. As NM maiores não foram interiorizadas, mas estavam dispersas no neurópilo, região de maior concentração de Fe^{+3} , visualizado na microscopia óptica pela coloração de Perls. As estruturas de origem biológica são os **cristais** visualizados no interior de organelas e **magnetossomos like**.

Peroxisomos com NM e a possível formação de cristais podem ocorrer a partir do sistema de importação e deposição de proteínas para o interior de tal organela (Reddy *et al*, 1996). A partir deste sistema, a importação de PAM poderia ocorrer pela presença de uma seqüência de aminoácidos serina, lisina e leucina (a partir da posição 296 (NCBI, 2007)) na albumina bovina. Esta seqüência, igual ao peptídeo sinal C-terminal para importação de proteínas pelo peroxissomo, possivelmente seria exposta pela desnaturação parcial durante a síntese de PAM. Dependendo das condições no interior da organela como o pH e tipos de proteínas importadas, cristais de ferro também poderiam ser formados em algumas situações. Entretanto, NM e outras proteínas não naturais dos peroxissomos já foram importadas por tal organela, como na Figura 76.

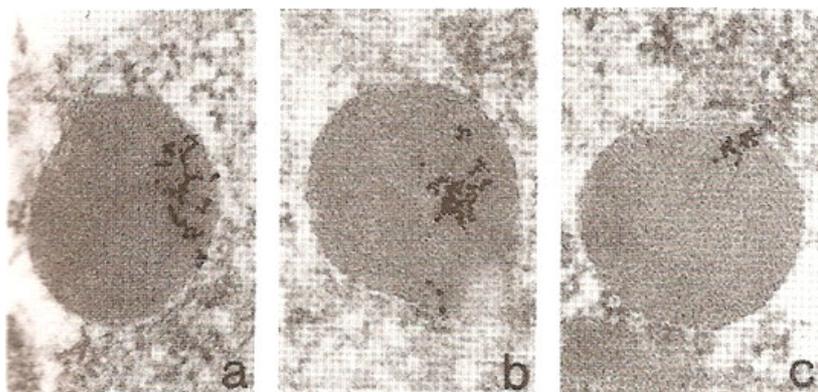


Figura 76: Importação peroxissomal de complexo de ouro/proteína (HSA-SKL- human serum albumin e C-terminal, serina, lisina e leucina). (Reddy *et al*, 1996).

A presença de NM e formação de cristais em lisossomos ou vesículas de excreção poderiam ter origem similar com a participação de um transportador de ferro dependente de ATP (Fe-ATPase) (Barañano *et al*, 2000). Os íons de Fe^{+2} dispersos no citoplasma após redução das NM de PAM seriam importados para o interior de tais organelas através de uma Fe-ATPase. Dependendo das condições destas organelas, como neutralização do pH, o Fe^{+2} poderia associar-se com elementos como o oxigênio e moléculas presentes no meio, formando estruturas cristalizadas em redes hexagonais semelhantes à Figura 77.

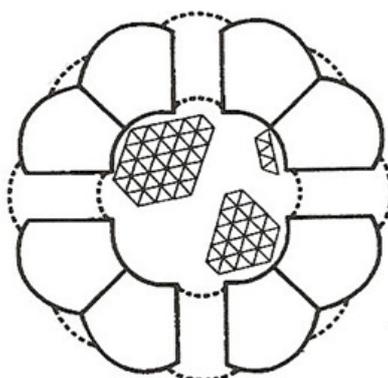


Figura 77: Cristais de óxido de ferro no core de uma ferritina. Rede hexagonal semelhante aos cristais de organela visualizados nesta dissertação (Fig. 61 B) (Harrison *et al*, 1974).

Foi observada a formação de estruturas semelhantes aos magnetossomos de bactérias magnetostáticas como o *Magnetospirillum magneticum*, e por isso foram denominadas **magnetossomos like**. Estas estruturas apresentaram uma

evolução de formação em até dois dias. A presença de cristais de óxido de ferro já foi relatada em tecidos do fígado e no SN e variavam de alguns nanômetros até acima de 100nm (Kirschvink *et al*, 1992; Pardoe & Dobson 1999). Estas estruturas foram denominadas de nanopartículas magnéticas biogênicas, sendo também documentadas em doenças neurodegenerativas (Dobson, 2001). Entretanto, a semelhança dos magnetossomos *like* com os magnetossomos bacterianos é a presença de uma membrana lipídica, constituindo uma organela com possíveis maquinarias de membrana que regulem a sua formação. Descrições sobre as proteínas de membrana bacterianas que regulam a formação dos magnetossomos citam bombas iônicas, como a família de bombas transportadoras de Na^+/H^+ (Matsunaga & Okamura,2003), presente também no cérebro de mamíferos. Serão necessárias maiores investigações para definir se a administração de PAM estimula a formação de nanopartículas biogênicas e magnetossomos *like*, determinar suas funções, se são capazes de interferir no metabolismo químico e elétrico do SN e se são afetadas por campos magnéticos externos.

E por fim, o **núcleo** também foi atingido pelo PAM/NM, que se distribuiu desde a membrana nuclear até o interior, formado principalmente de ácidos nucléicos e proteínas, sendo que a heterocromatina foi a região de maior acúmulo. A presença de PAM/NM na membrana nuclear pode ser explicada pela alta afinidade dos metais por lipídeos, como para outras estruturas de mesma natureza (bainha de mielina e etc.). A interiorização de PAM/NM pode ter ocorrido, por efeitos de peroxidação e desestabilização da bicamada lipídica com a participação das duas valências do ferro (Ferreira & Matsubara, 1997; Suwalsky *et al* ,2005) e transporte por receptores e canais nucleares.

A distribuição de PAM/NM no material genético nuclear pode ter ocorrido devido à afinidade do ferro em formar complexos com nucleotídeos, incluindo os fosfatados (Goucher & Taylor, 1964) e com proteínas nucleares que tenham alta afinidade ao ferro. O ferro, por exemplo, interfere na síntese de transferrina e ferritina por meio de interações com proteínas, que se ligam a elementos do DNA (ARE-antioxidant response elements) e/ou RNA (IRE-iron responsive elements), regulando a transcrição e tradução (Theil, 2006). Em reações de hidrólise de

ATP, metais bivalentes, como o ferro, funcionam como um catalizador, se combinando com a adenosina nas formas de ATP e AMP (Goucher & Taylor, 1964; Weaver & Pollack, 1990). O ATP e AMP são utilizados em reações tanto no citoplasma como no núcleo, constituindo sítios de interação com o ferro de PAM/NM. As reações diretas do ferro com nucleotídeos dos ácidos nucléicos podem interferir na configuração e funções por induzir a quebra de fitas únicas de DNA e ligações entre bases (Wacker & Vallee, 1959; Barbouti *et al*, 2001), potencialmente gerando mutações, com as quais, alterações da expressão gênica.

Um exemplo de proteína nuclear que o ferro de PAM pode interagir são as histonas H3 pelos resíduos de cisteína, aminoácido com alta afinidade ao ferro (Glahn & Campen, 1996). As interações e condições oxidativas proporcionadas pelo ferro podem modificar a conformação das histonas H3, refletindo nos nucleossomos como um todo, influenciando diretamente na arquitetura nuclear, regulação da expressão gênica, escolha do destino celular e memória epigenética (Hake & Allis, 2006).

Em resumo, PAM/NM no núcleo pode interagir com os ácidos nucléicos e proteínas, que atuam diretamente em sistemas de regulação gênica e epigenéticos, podendo conferir potencial interesse deste nanomaterial em terapias anticancerígenas por exemplo.

7. Conclusões

Na presente dissertação foram caracterizadas morfologicamente as duas amostras de PAM utilizadas e analisados os efeitos destas no sistema nervoso central de camundongos normais. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que:

1. A amostra 1 de PAM apresentou nanopartículas magnéticas em polidispersão e diâmetro modal igual a 9,2nm, enquanto que a amostra 2 apresentou maior monodispersão, com nanopartículas magnéticas em diâmetro modal de 8,9nm e “beads” com diâmetro modal de 73nm;
2. PAM foi capaz de ultrapassar a BHE dos animais tratados, distribuindo-se por todo o SNC, atingindo todos os tipos celulares deste tecido (hemácias, células da BHE, células ependimárias e do plexo coróide, células da glia e neurônios) e regiões de neurópilo, conforme evidenciado pela microscopia de luz;
3. Pela análise ultra-estrutural foi detectado que PAM teve uma tendência de distribuição em organelas e estruturas com membranas lipídicas (vesículas endocíticas, corpos multivesiculares, peroxissomos, lisossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, núcleo, mitocôndrias, fagossomos, vesículas exocíticas, bainha de mielina, terminais sinápticos) e estruturas não-membranosas (lipofuscinas e cisternas axonais);
4. Também por MET foi observada a presença de estruturas incomuns com diferentes origens: a) artificial: PAM e nanopartículas dispersas e b) biológica: cristais em organelas e magnetossomos *like*;
5. PAM apresentou alta-especificidade para o SN, demonstrando potencial biomédico específico e uma nova ferramenta para estudos de características magnéticas do SN.

8. Perspectivas

A potencial utilização de PAM para aplicações médicas incluem carreadores de drogas guiados por campos magnéticos externos, melhoria de contrastes para detecção de microtumores e na magnetohipertemia para o tratamento de tumores. Saldanha (2007) demonstrou em testes *in vitro* para células de rins e tumorais, que PAM leva à morte celular por mecanismos apoptóticos, características desejáveis para o tratamento de câncer. Esta é mais uma vantagem no tratamento de tumores específicos do SN, que exige a destruição controlada dos tecidos anormais, a fim de evitar efeitos colaterais como processos neurodegenerativos e conseqüentes alterações de comportamento. Para garantir com segurança as vantagens de PAM serão necessários desenvolver novos estudos de análises nanotóxicas, incluindo taxas de estresse oxidativo, metabolismo e modificações dos padrões de expressão gênica.

A característica superparamagnética de PAM permite a possibilidade de estudos das influências de campos magnéticos em modelos biológicos, tanto os efeitos elétricos, térmicos e não térmicos. Estudos elétricos não necessariamente com nanopartículas enfocam, por exemplo, o tratamento de cânceres (Telló *et al.* 2004) e modulação de sinais bioelétricos em tecidos para o entendimento de capacidades regenerativas (Levin, 2007). Estudos térmicos incluem a já citada magnetohipertermia antitumoral. E um campo bastante interessante são os estudos de efeitos magnéticos não térmicos, que refletem modificação dos padrões comportamentais, como o tratamento da depressão (Barros, 2004). Estas abordagens ocorreriam com a introdução de PAM, mas quais seriam as conseqüências da interação de NM artificiais com as NM biogênicas produzidas pelo SN (Kirschvink *et al.*, 1992)?

A presença de nanopartículas magnéticas biogênicas de óxido de ferro acontece em todos os organismos, desde proteobactérias até os animais superiores (Kirschvink *et al.*, 1992). Nos animais estas partículas magnéticas estão relacionadas com georientação magnética, sendo que nos humanos, tal função não é significativa no que se relaciona à distribuição das nanopartículas magnéticas no cérebro humano tende a se concentrar em estruturas com alto

metabolismo de ferro e nas meninges (Kirschvink *et al*,1992). Para explicar esse fato, algumas hipóteses poderiam ser a de proteção contra campos magnéticos externos e regulação no padrão de desenvolvimento, maturação e funcionamento do SN, porque a concentração varia com a idade. Outra hipótese interessante seria se o SN funcionaria como um modelo biológico com magnetoresistência gigante.

A magnetoresistência gigante (MRG) é um fenômeno de mudança da resistência elétrica de um material devido à aplicação de campo magnético. Este efeito de condutividade eletrônica acontece em materiais com multicamadas ferromagnéticas e não magnéticas. (Baibich *et al*, 1988). A natureza do SN apresenta esta característica devido à presença das nanopartículas magnéticas biogênicas, que seria a parte ferromagnética e o parênquima nervoso que seria a parte não magnética, as quais determinariam uma possível magnetoresistência gigante granular. Outra variável que corroboraria com o funcionamento do SN com MRG são as gerações de campos magnéticos durante as transmissões sinápticas elétricas. O estudo das características de condutividade eletrônica dos materiais é denominado Spintrônica, baseado nas cargas e nos spins dos elétrons. Este fenômeno atua na tecnologia dos Ipods, os quais os leitores de disco rígido trabalham a temperaturas entre 50-60°C e geram memórias magnéticas não voláteis (Baibich M., comunicação pessoal). O interessante do fenômeno de MRG no SN é, extrapolando um pouco, sugerir uma possível formação de uma memória não-volátil e não vinculada a estruturas específicas, mas dispersa no SN e a adição de mais um fenômeno físico que interfira no SN. Estudos recentes já relataram a existência de MRG no DNA (Wei *et al*, 2006).

Enfim, o PAM um dia poderá ser usado em aplicações neuroclínicas e quem sabe, como ferramenta de estudo de efeitos magnéticos externos e intrínsecos na dinâmica do funcionamento do SN, incluindo doenças neurodegenerativas, regeneração neuronal e comportamento. Estas perspectivas são inclusive objetos de pesquisa para a continuação de um doutorado.

9. Referências:

ABBOUD S. HAILE D.J., **A Novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism.** J. Biol. Chem. 275: 19906-19912, 2000;

ALBRETSEN, J., **The toxicity of iron, an essential element.** Toxicology Brief: managing common poisonings in companion animals. Veterinary Medicine, 2006;

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

BAIBICH M.N., BROTO J.M., FERT A., NGUYEN Van DAU F., PETROFF F., EITENNE P., CREUZET G., FRIEDERICH A., CHAZELAS J., **Giant Magnetoresistance of (001)Fe/(001)Cr Magnetic Superlattices.** Phys. Rev. Lett 61: 2472-2475, 1988)

BAKER E., MORTON A.G., TAVILL A.S., **The regulation of iron release from the perfused rat liver.** Br J Haematol, 45(4):607–620, 1980;

BANATI R.B., **Neuropathological imaging: in vivo detection of glial activation as a measure of disease and adaptative change in the brain.** British Medical Bulletin, 65: 121-131, 2003;

BANKS, W.J. **Histologia Veterinária aplicada.** Ed. Manole, São Paulo, 1991;

BAKUZIS, A.F., MORAIS, P.C., PELEGRENI, F., **Surface and exchange anisotropy fields in MnFe₂O₄ nanoparticles: Size and temperature effects.** J. Appl. Phys., vol. 85, 7480-7482, 1999;

BANNERMAN R.M. COOPER R.G., **Sex-linked anemia: a hypochromic anemia of mice.** Science 151: 581-582, 1966;

BARAÑANO D.E., WOLOSKER H., BAE B-II, BARROW R.K., SNYDER S.H., FERRIS C.D., **A mammalian Iron ATPase induced by iron.** The Journal of Biological Chemistry, 275(20): 15166-15173, 2000;

BARBOSA L.S., **Avaliação *in vivo* da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico.** Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, UnB – Universidade de Brasília, 2004.

BARBOUTI A., DOULIAS P-T., ZHU B-Z., FREI B., GALARIS D., **Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage.** Free Radical Biology & Medicine, 31(4), 490-498, 2001;

BARROS R.B., **O uso da estimulação magnética transcraniana de baixa frequência no tratamento da depressão.** Tese de doutorado em Ciências da Saúde, UnB – Universidade de Brasília, 2004;

BARTLETT W.P., LI X-S, CONNOR J.R., **Expression of transferrin mRNA in the CNS of normal and jimpy mice.** J.Neurochem 57: 318-322, 1991;

BAULIEU E.E., **Neurosteroids: a novel function of the brain.** Psychoneuroendocrinology, 23(8): 963-987, 1998;

BAZYLINSKI D.A., **Controlled nanoscale biomineralization of magnetic minerals by magnetotactic bacteria: from the origin of life to Mars.** Chem. Geol. vol.32, 191-198, 1996;

BEAL M.F., **Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases.** Biochim Biophys Acta 1366:211-223, 1998;

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

BOUCSEIN C., KETTENMANN H., NOLTE C., **Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices.** Eur J Neurosci, 12: 2049-2058, 2000;

BRIGHT N.A., GRATIAN M.J., LUZIO J.P., **Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells.** Curr Biol, 15: 360-365, 2005;

BROADWELL R.D., **Transcytosis of macromolecules through the blood-brain barrier: A cell biological perspective and critical appraisal.** Acta Neuropathol. 79: 117-128, 1989;

BURDO J.R., MARTIN J., MENZIES S.L., **Cellular distribution of iron in the brain of the Belgrade rat.** Neuroscience, 93; 1189-1196, 1999;

CAIRO G., TACCHINI L., SCHIAFFONATI L., RAPPOCCIOLO E., VENTURA E., PIETRANGELO A., **Translational regulation of ferritin synthesis in rat liver: effects of chronic dietary iron overload.** Biochem. J. **264**,925-928, 1989;

CARLTON W.W., McGAVIN M.D., **Patologia Veterinária Especial de Thomson/William.** Trad; Cláudio S.L.de Barros, 2 ed., Porto Alegre: ArtMed. 672pp.,1998;

CENGELLI F., MAYSINGER D., TSCHUDI-MONNET F., MONTET X., COROT C., PETRI-FINK A., HOFMANN H., JUILLERAT-JEANNERET L., **Interaction of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles with brain structures,** *The J. Pharmac. Experiment. Therap.*,318, 108-116, 2006;

CHAVES S.B., **Efeitos biológicos de fluídos magnéticos a base de magnetita recoberta por DMSA em camundongos: Análise por microscopia de luz, imunohistoquímica e ressonância magnética.**, Dissertação de Mestrado em Biologia Animal, UnB- Universidade de Brasília 2002;

CHEN Q., BEARD J.L., JONES B.C., **Abnormal brain monoamine metabolism in iron deficiency anemia.** J Nutr Biochem 6:486-493, 1995;

CNANO, **Missão do Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia.** No site: <http://www.unb.br/ib/cnano/missao.htm> , disponível no dia 25 de outubro de 2007;

CONNOR J.R., SNYDER B.S., BEARD J.L., FINE R.E., MUFSON E.J., **Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease.** J. Neurosci Res 31: 327-335, 1992;

CONNOR J.R., MENZIES S.L., **Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination.** Glia 17: 83-93, 1996;

CONNOR J.R., MENZIES S.L., BURDO J.R., BOYER P.J., **Iron and Iron Management Proteins in Neurobiology.** Pediatric Neurology, vol.25,nº2, 118-129, 2001;

DAVIS R.J., CORVERA, S., CZECH M.P., **Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane.** J.Biol. Chem., 261: 8708-8711, 1986;

DEANE R., ZHENG W., ZLOKOVIC B.V., **Brain capillary endothelium and choroids plexus epithelium regulate transport of transferrin-bound and free iron into the rat brain.** J. Neurochem. Vol 88, 813-820, 2004;

de ARRIBA ZERPA G.A., SALEH M.C., FERNANDEZ P.M., GUILLOU F., ESPINOSA DE los MONTEROS A., de VELLIS J., ZAKIN M.M., BARON B., **Alternative splicing prevents transferrin secretion during differentiation of a human oligodendrocyte cell line.** J. Neurosci. Res., 61: 388-395, 2000;

De CUYPER M., **Impact of the surface charge of magnetoproteoliposomes on the enzymatic oxidation of cytochrome C.** Progr. Colloid Polym Sci, vol. 100, 306-310, 1996;

DEHOUCK M.P., MERESSE S., DELORME P., FRUCHART J.C., CECHELLI R., **An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro.** J Neurochem 54: 1798-180, 1990;

DOBSON J., **Nanoscale biogenic iron oxides and neurodegenerative disease.** FEBS Letters 496,1-5,2001;

DONOVAN A., ROY C.N., ANDREWS N.C., **The ins and outs of iron homeostasis.** Physiology 21: 115-123, 2006;

DUFFY K.R., PARDRIDGE W.M., ROSENFELD R.G. **Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor.** Metabolism 37: 136-140, 1988;

DUGAN L.L., CREEDON D.J., JOHNSON E.M.Jr., HOLTZMAN D.M., **Rapid suppression of free radical formation by nerve growth factor involves the mitogen-activated protein kinase pathway.** Proc Natl Acad Sci U.S.A., 94: 4086-4091, 1997;

DURÁN N., **A Rede de Nanobiotecnologia: passado, presente e futuro.** (online, 17.05.2005, <http://nanogen.lcc.uece.br/Inanogen/redeNanobiotecnologiaPassadoPresenteFuturo.pdf>);

DWORK A.J., **Effects of diet and development upon the uptake and distribution of cerebral iron.** J. Neurol. Sci., 134(suppl):45-51, 1995;

EGAÑA J.T., ZAMBRANO C., NUÑEZ M.T., GONZALEZ-BILLAULT C., MACCIONI R.B., **Iron-induced oxidative stress modify tau phosphorylation patterns in hippocampal cell cultures.** BioMetals, vol.16, 215-223, 2003;

EGYED A., **Na⁺ modulates carrier-mediated Fe²⁺ transport through the erythroid cell membrane.** Biochem J., vol 275, 635-638, 1991;

EISENSTEIN R.S., **Iron Regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism.** *Annu, Re. Nutr.* Vol 20, 627-662, 2000a;

EISENSTEIN R.S., **Discovery of the ceruloplasmin homologue hephaestin: new insight into the copper/iron connection.** *Nutr. Rev.* 58: 23-27, 2000b;

FERREIRA A.L.A., MATSUBARA L.S., **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Ver Ass Med Brasil*, 43(1): 61-68, 1997;

FEVRIER B., VILETTE D., LAUDE H., RAPOSO G., **Exosomes: a bubble ride for prions?** *Traffic*, 6: 10-17, 2005;

GAASCH J.A., GELDENHUYS W.J., LOCKMAN P.R., ALLEN D.D., VAN DER SCHYF C.J., **Voltage-gated calcium channels provide an alternate route for iron uptake in neuronal cell cultures.** *Neurochem. Res*, 2007;

GALÁNTAI R., BÁRDOS-NAGY I., **The interaction of human serum albumin and model membranes.** *International Journal of Pharmaceutics*, vol195, 207-218, 2000;

GAO K., JIANG X., **Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles,** *International Journal of Pharmaceutics*, 310, 213–219, 2006;

GLAHN R.P., CAMPEN D.R.V., **Iron uptake is enhanced in Caco-2 cell monolayers by cysteine and reduced cysteinyl glycine.** *The Journal of Nutrition*, 127(4): 642-647, 1996;

GORINSKY B., **Iron metabolism.** (Online: 30/04/2007, <http://www.cryst.bbk.ac.uk/research/trans/trans-p1.html>)

GORTER J.A., MESQUITA A.R.M., van VLIET E.A., da SILVA F.H.L., ARONICA E., **Increased expression of ferritin, an iron-storage protein, in specific regions of the parahippocampal cortex of epileptic rats.** *Epilepsia*, 46(9): 1371-1379, 2005;

GOUCHER C.R., TAYLOR J.F., **Compounds of ferric iron with adenosine triphosphate and other nucleoside phosphate.** *The Journal of Biological Chemistry*, 239(7): 2251-2255, 1964;

GROOTVELD M., BELL J.D., HALLIWELL B., ARVOMA O.I., BOMFORD A., SADLER P.J., **Non-transferrin bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis.** *J. Biol. Chem.* 264, 4417-4422, 1989;

GUNSHIN H., MACKENZIE B., BERGER U.V., GUNSHIN Y., ROMERO M.F., BORON W.F., NUSSBERGER S., GOLLAN J.L., HEDIGER M.A., **Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter.** *Nature* 388: 482-488, 1997;

HAKE S.B., ALLIS C.D., **Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: The "H3 barcode hypothesis".** *PNAS*, 103(17): 6428-6435, 2006;

HALLGREN B., SOURANDER P., **The effect of age on the non-haemin iron in the human brain.** *J Neurochem* 3:41-51, 1958;

HARRISON P.M., HOY T.G., MACARA I.G., HOARE R.J., **Ferritin iron uptake and release.** *Biochem j*, 143: 445-451, 1974;

HARRISON P.M., AROSIO P., **The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation.** *Biochem. Biophys. Acta* 1275: 161-203, 1996;

HASHIMOTO M., ISHIKAWA Y., YOKOTA L., SOTO F., BANDO T., SAKAKIBARA Y., IZIKI M., **Action site of circulating interleukin-1 on the rabbit brain.** *Brain Res.* 540: 217-223, 1991;

HILDITCH-MAGUIRE P., TRETTEL F., PASSANI L.A., AUERBACH A., PERSICHETTI F., MacDONALD M.E., **Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles.** *Human Molecular Genetics*, 9(19): 2789-2797, 2000;

IVENS S., KAUFER D., FLORES L.P., BECHMANN I., ZUMSTEG D., TOMKINS O., SEIFFERT E., HEINEMANN U., FRIEDMAN A., **TGF- β receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis.** *Brain*, 130 (2): 535-547, 2007;

JAIN K.K., **Role of nanotechnology in developing new therapies for diseases of the nervous system,** *Nanomedicine* 1, 9-12, 2006;

JOHN T.A., VOGEL S.M., TIRUPPATHI C., MALIK A.B., MINSHALL R.D., **Quantitative analysis of albumin uptake and transport in the rat microvessel endothelial monolayer.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 284: L187-L195, 2003;

KABANOV, A.V., BATRAKOVA, E.V., **New technologies for drug delivery across the blood brain barrier,** *Current Pharm.Design*, 10, n.12, 1355-1363, 2004;

KE Y., CHANG Y.Z., DUAN X.L., DU J.R., ZHU L., WANG K., YANG X.D., HO K.P., QIAN Z.M., **Age-dependent and iron-independent expression of two mRNA isoforms of divalent metal transporter 1 in rat brain.** *Neurobiology of Aging* 26, 739 -748, 2005;

KENNARD M.L., RICHARDSON D.R., GABATHULER R., PONKA P., JEFFERIES W.A., **A novel iron uptake mechanism mediated by GPII-anchored human p97.** Eur. Molec. Biol. Org. J., 14, 4178-4186, 1995;

KIERSZENBAUM A.L., **Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia.** Ed. Elsevier, Rio de Janeiro-RJ, 656p, 2004;

KIRSCHVINK J.L., KIRSCHVINK-KOBAYASHI A., WOODFORD B.J., **Magnetite biomineralization in the human brain.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 7683-7687, 1992;

KLEIN M.A., MÖLLER J.C., JONES L.L., BLUETHMANN H., KREUTZBERG G.W., RAIVICH G., **Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice.** Glia, 19(3): 227-233, 1997;

KREUTER J., **Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain,** *J. Nanoscien.Nanotech*, 4, n.5, 484-488, 2005;

KÜCKELHAUS S., GARCIA V.A.P., AZEVEDO R.B., LACAVA Z.B.M, 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, 93, 6707-6708, 2003;

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

LACAVA, Z.G.M., MORAIS, P.C., **Aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas**, publicado em 08.10.2004 (Online, 23.03.2006, http://www.universiabrasil.com.br/html/materia/materia_fcif.html);

LESUISSE E., HORION B., LABBE P., HILGER F., **The plasma membrane ferrireductase activity of *Saccharomyces cerevisiae* is partially controlled by cyclic AMP.** *Biochem. J.*,280, 545 – 548, 1991;

LEVI S., CORSI B., BOSISIO M., INVERNIZZI R., VOLZ A., SANFORD D., AROSIO P., DRYSDALE J., **A human mitochondrial ferritin encoded by a intronless gene.** *The Journal of Biological Chemistry*, vol 270, n° 27, 24437-24440, 2001;

LEVIN M., **Large-scale biophysics: ion flows and regeneration.** *TRENDS in Cell Biology*, 17(8):261-270, 2007;

LILL R., MÜHLENHOFF U., **Iron-sulfur protein Biogenesis in Eukaryotes: components and mechanisms.** *Ann Rev Cell Dev Biol*, 22: 457-486, 2006;

LILLIE R. D., **In Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.** McGraw-Hill Book Company, New York, 3rd edition, 405p, 1965;

LOCKMAN P.R., MUMPER R.J., KHAN M.A., ALLEN D.D., **Nanoparticle Technology for Drug Delivery Across the Blood Brain Barrier,** *Drug Dev. Indus. Pharm.* Vol.28, n.1,1-13, 2002;

LOCKMAN P.R., KOZIARA J.M., MUMPER R.J., ALLEN D.D., **Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability,** *J. Drug Targeting*,12, 635-641, 2004;

MALECKI E.A., COOK B.M., DEVENYI A.G., BEARD J.L., CONNOR J.R., **Transferrin is required for normal distribution of ⁵⁹Fe and ⁵⁴Mn in mouse brain.** *J. Neurol Sci* 170: 112-118, 1999;

MASSART, R., **Magnetic fluids and process for obtaining them.** US Patent 4329241, 1982;

MASSON P.L., HEREMANS J.F., DIVE C.H., **An iron binding protein common to many external secretions.** Clin.Chim. Acta 14, 735-739, 1966;

MATSUNAGA T., OKAMURA Y., **Genes and proteins involved in bacterial magnetic particle formation.** TRENDS in Microbiology, 11(11): 536-541, 2003;

MAY P.M., WILLIAMS D.R., LINDER P.W., **Biological significance of low molecular weight iron (III) complexes.** Metal Ions in Biological Systems, pp 29-76 (ed.H Sigel). Marcel Dekker Inc., NY, 1980;

MGR – **Mouse Genetic Resources**, publicado em 07.09.2006 (Online, 11.01.2008, <http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/strain/detail.php?sid=223>);

MISRA A., SHAH S.P., **Drug delivery to the central nervous system: a review.** J. Pharm Pharmaceut Sci. 6, 252-273, 2003;

MOOS T., MORGAN E.H., **The Metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review.** Ann N Y Acad Sci 1012: 14-26, 2004;

MORRIS C., CANDY J., KEITH A., OAKLEY A., TAYLOR G., PULLEN R., BLOXHAM C., GOCHT A., EDWARDSON J., **Brain iron homeostasis.** J Inorg Biochem 47: 257-265, 1992;

MUKHOPADHYAY C.K., ATTIEH Z.K., FOX P.L., **Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake.** Science, vol. 279: 714-717, 1998;

NAKAGAWA H., ONO Y., **Effects of Potassium Chloride on the reduction of iron oxides.** Transactions ISIJ. 25: 1021-1024, 1985;

NCBI, **CAA76847** (Online, 11.02.2008, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?view=graph&query_key=9&db=protein&dopt=graph&WebEnv=03cpF_2KeHxSEB8X8sNV5NJm7_kdzWRWeCaUufp8_1xvtYauw2pyVi8VEK4b%4025616CC47A1EC970_0179SID&WebEnvRq=1&term=&tool=query&qty=1);

NGUYEN N-B., CALLAGHAN K.D., GHIO A.J., HAILE D.J., YANG F., **Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291; L417-L425, 2006;

NICHOLLS J.G., MARTIN A.R., WALLACE B.G., FUCHS P.A., **From Neuron to Brain.** 4ed., Ed Sinauer Associates, Inc., 2001;

NISHI T., FORGAC M., **The vacuolar (H⁺)- ATPases: nature's most versatile proton pumps.** Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.3: 94-103, 2002;

OATES P.S., MORGAN E.H., **Defective iron uptake by the duodenum of Belgrade rats fed diets of different iron contents.** Am.J. Physiol, 270: 826-832, 1996;

OHBA S., HIRAMATSU M., EDAMATSU R., MORI I., MORI A., **Metal ions affect neuronal membrane fluidity of rat cerebral cortex.** Neurochemical Research, vol. 19, 3: 237-241, 1994;

OHGAMI R.S., CAMPAGNA D.R., GREER E.L., ANTIOCHOS B., McDONALD A., CHEN J., SHARP J.J., FUJIWARA Y., BARKER J.E., FLEMING M.D., **Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells.** Nat.Genet. 37: 1264 – 1269, 2005;

LOUDIT G.Y., SUN H., TRIVIERI M.G., KOCH S.E., DAWOOD F., ACKERLEY C., YAZDANPANAH M., WILSON G.J., SCHWARTZ A., LIU P.P., BACKX P.H., **L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy.** Nat.Med.9: 1187-1194, 2003;

PANKHURST Q.A., CONNOLLY J., JONES S.K., DOBSON J., **Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine**, J.Phys. D: Appl. Phys. **36**, 167-181, 2003;

PARDOE H., DOBSON J., **Magnetite iron biomineralization in rat brains: effects of iron loading**. Biometals, 12, 77-82, 1999;

PARK C.H., VALORE E.V., WARING A.J., GANZ T., **Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver**. The Journal of Biological Chemistry, 276(11): 7806-7810, 2001;

PATTON S.M., PIÑERO D.J., SURGULADZE N., BEARD J., CONNOR J.R., **Subcellular localization of iron regulatory proteins to Golgi and ER membranes**. Journal of Cell Science 118: 4365-4373, 2005;

PEPPAS, L.B., BLANCHETTE J.O., **Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy**, *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 1649-1659, 2004;

PETERS JR. T., **Serum Albumin**. Adv, Protein Chem. 17: 161-245, 1985;

PINERO D.J., LI N.Q., CONNOR J.R., BEARD J.L., **Variations in dietary iron alter brain iron metabolism in developing rats**. J. Nutr, 130: 254-263, 2000;

PU Y.M., WANG Q., QIAN Z.M., **Effect of iron and lipid peroxidation on development of cerebellar granule cells in vitro**. Neuroscience, vol.89, 855-861, 1999;

QIAN Z.M., TANG P.L., WANG Q., **Iron crosses the endosomal membrane by a carrier-mediated process**. Prog. Biophys. Molec.Biol., vol. 67, 1-15, 1997;

QIAN Z.M., PU Y.M., WANG Q., KE Y., YAO F.Y.D., CHEN W.F., SHEN X., FENG Y.M., TANG P.L., **Cerebellar granule cells acquire transferrin-free iron by a carrier-mediated process**. Neuroscience, vol.92, n°2: 577-582, 1999;

QUINTANA C., COWLEY J.M., MARCHIC C., **Electron nanodiffraction and high resolution electron microscopy studies of the structure and composition of physiological and pathological ferritin.** J. Struct. Biol. 147, 166-178, 2004;

RAJAN K.S., COLBURN R.W., DAVIS J.M., **Distribution of metal ions in the subcellular fractions of several rat brain areas.** Life Sci, 18: 423-431, 1976;

RANDELL E.W., PARKES J.G., OLIVIERI N.F., TEMPLETON D.M., **Uptake of Non-Transferrin-bound iron by both reductive and nonreductive processes is modulated by intracellular iron.** The Journal of Biological Chemistry, vol 269, 16046-16053, 1994;

REDDY J.K., SUGA T., MANNAERTS G.P., LAZAROW P.B., SUBRAMANI S., **Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease.** Annals of the New York Academy of Sciences, 804, 801pp, 1996;

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

ROUAULT T.A., **Iron in the brain.** Nature Genetics, 28: 299-300, 2001;

RUTHERFORD J.C., BIRD A.J., **Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells.** Eukaryot. Cell, vol 3(1), 1-13, 2004;

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 em Patologia Molecular, UnB – Universidade de Brasília, 2004;

SAITO R., KRAUZE M.T., NOBLE C.O., TAMAS M., DRUMMOND D.C., KIRPOTIN D.B., BERGER M.S., PARK J.W., BANKIEWICZ K.S., **Tissue affinity of the infusate affects the distribution volume during convection-enhanced delivery into rodents brains: implications for local drug delivery**, *Journal of Neuroscience Methods* 154, 225–232, 2006;

SAIYED Z.M., TELANG S.D., RAMCHAND C.N., **Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine**, *BioMagnetic Research and Technology*, 1, 1-8, 2003;

SALDANHA C.A., **Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos polímeros de albumina magnéticos**. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal, UnB – Universidade de Brasília, 2007;

SALFELDER K., ROMANOVICH J., DE LISCANO T.R., **Histopatologia: Guia de Trabajos Practicos**. Universidad de Los Andes, Mérida- Venezuela, 343p, 1967;

SASTRY A. ARENDASH G.W., **Time dependent changes in iron levels and associated neuronal loss within the substantia nigra following lesions within the neostriatum/globus pallidus complex**. *Neuroscience* 67:649-666, 1995;

SCHAFER F.Q., BUETTNER G.R., **Acidic pH amplifies iron-mediated lipid peroxidation in cells**. *Free Radical Biology & Medicine*, vol.28, 1175-1181, 2000;

SCHIPKE C.G., BOUCSEIN C., OHLEMEYER C., KIRCHHOFF F., KETTENMANN H., **Astrocytes Ca^{+2} waves trigger responses in microbial cells in brain slices**. *FASEB J*, 16: 255-257, 2001;

SCHROEDER U., SOMMERFELD P., ULRICH S., SABEL B.A., **Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood brain barrier**., *J. Pharm Sci*, 87, 1305-1307, 1998a;

SCHROEDER U., SOMMERFELD P., SABEL B.A., **Efficacy of oral dalargin-loaded nanoparticle delivery across the blood brain barrier.**, *Peptides*, vol.19, n.4, 777-780, 1998b;

SHAFER L.L., McNULTY J.A., YOUNG M.R.I., **Brain Activation of monocyte-lineage cells: involvement of interleukin-6.** *Neuroimmunomodulation*, 10(5): 295-304, 2003;

SHAYEGHI M., LATUNDE-DADA G.O., OAKHILL J.S., LAFTAH A.H., TAKEUCHI K., HALLIDAY N., KHAN Y., WARLEY A., McCANN F.E., HIDER R.C., FRAZER D.M., ANDERSON G.J., VULPE C.D., SIMPSON R.J., McKIE A.T., **Identification of an intestinal heme transporter.** *Cell* 122: 789-801, 2005;

SHIOTA A., HIRAMATSU M., MORI A., **Amino acid neurotransmitters in iron-induce epileptic foci of rats.** *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 66(1): 123-133, 1989;

SILVA W.C.,GUTERRES M.V.,FERREIRA M.M.C., VOLPE P.L.O.,**Análise do mecanismo de desnaturação da albumina utilizando a Resolução de Curvas Multivariadas (MCR).** 28ª Reunião Anual da Sociedade de Química, Poster, 2005;

SILVA G.A., **Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges.**, *Nature Reviews, Neuroscience*, 7, 65-74, 2006a;

SILVA O., **Síntese e Caracterização de Fluidos Magnéticos de Ferrita de Cádmio.** Tese de Doutorado em Física, UnB- Universidade de Brasília, 2006b;

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

SIMIONI A.R., MARTINS O.P., LACAVA Z.G.M., AZEVEDO R.B., LIMA, E.C.D., LACAVA B.M., MORAIS P.C., TEDESCO A.C. **Cell toxicity studies of albumin-based nanosized magnetic beads.** J. Nanosci. Nanotechnol. vol.6, 2413-2415, 2006;

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

SMYTHIES J., **Redox mechanisms at the glutamate synapse and their significance: a review.** European Journal of Pharmacology, 370: 1-7, 1999;

SOLER M.A.G., BÁO S.N., ALCÂNTARA G.B., TIBÚRCIO V.H.S., PALUDO G.R., SANTANA J.F.B., GUEDES M.H., LIMA E.C.D., LACAVA Z.G.M., MORAIS P.C., **Interaction of erythrocytes with magnetic nanoparticles.** Journal of Nanoscience and Nanotechnology, vol.7:1-3, 2007;

STREIT W.J., MRAK R.E. GRIFFIN W.S.T., **Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective.** Journal of Neuroinflammation 1(14): 1-4, 2004;

SUN I.L., CRANE F.L., MORRÉ D.J., LÖW H., FAULK W.P., **Lactoferrin activates plasma membrane oxidase and Na⁺/H⁺ antiport activity.** Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.176,1: 498-504, 1991;

SUWALSKY M., MARTÍNEZ F., CÁRDENAS H., GRZYB J., STRZALKA K., **Iron affects the structure of cell membrane molecular models.** Chemistry and Physics of Lipids, vol.134, 69-77, 2005;

SUZUKI Y.J., FORMAN H.J., SEVANI A., **Oxidants as stimulators of signal transduction.** *Free Rad Biol Med*, 22: 269-285, 1997;

TAKANO T. TIAN G.F., PENG W., LOU N., LIBIONKA W., HAN X., NEDERGAARD M., **Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow.** *Nat Neurosci* 9:260-267, 2006;

TANEJA V., MISHRA K.P., AGARWAL K.N., **Effect of maternal iron deficiency on GABA shunt pathway of developing rat brain.** *Indian J Exp Bio.* 28: 466-469, 1990;

TELLÓ M., RAIZER A., BUZAID A.C., DOMENGE C., DIAS G.A.D., ALMAGUER H.D., OLIVEIRA L.O., FARBER P.L., OLIVEIRA R.T., SILVA V.D., **O uso da corrente elétrica no tratamento do câncer.** EDIPURCS, Porto Alegre, 2004;

THEIL E.C., **Integrating iron and oxygen/antioxidant signals via a combinatorial array of DNA-(antioxidant response elements) and Mrna (iron responsive elements) sequences.** *Journal of Inorganic Biochemistry*: 100(12): 2074-2078, 2006;

TIRUPPATHI C., SONG W., BERGENFELDT M., SASS P., MALIK A.B., **Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase dependent pathway.** *The Journal of Biological Chemistry*, vol 272, 25968-25975, 1997;

TRIBL F., GERLACH M., MARCUS K., ASAN E., TATSCHNER T., ARZBERGER T., MEYER H.E., BRINGMANN G., RIEDERER P., **Subcellular proteomics of neuromelanin granules isolated from the human brain.** *Mol. Cell. Proteomics*, 7, 945-957, 2005;

TURI J.L., YANG F., GARRICK M.D., PIANTADOSI C.A., GHIO A.J., **The iron cycle and oxidative stress in the lung.** *Free Radical Biology and Medicine* vol.36, n.7, 850-857, 2004;

ULLIAN E.M., CHRISTOPHERSON K.S., BARRES B.A., **Role for glia in synaptogenesis.** *Glia* 47: 209-216, 2004;

UMBREIT J.N., CONRAD M.E., BERRY M.A., MOORE E.G., LATOUR L.F., TOLLIVER B.A., ELKHALIFA M.Y., **The alternate iron transport pathway: mobilferrin an integrin in reticulocytes.** *British Journal of Haematology*, 96, 521-529, 1997;

VAN HOUTEN M., POSNER B.I., KOPRIWA B.M., BRAWER J.R., **Insulin-binding sites in the rat brain: *in vivo* localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography.** *Endocrinology* 105: 666-673, 1979;

VIANNA G., **Nanopartículas de óxidos de ferro e espectroscopia Raman.** Seminários em Química I de 25 de outubro de 2006, Instituto de Química da Universidade de Brasília – não publicado;

VEHASKARI V.M., CHANG T.C., STEVENS J.K., ROBSON A.M., **The effects of polycations on vascular permeability in the rat.** *J. Clin. Invest.* 73: 1053-1061, 1984;

VOGEL S.M., MINSHALL R.D., PILIPOVIC M., TIRUPPATHI C., MALIK A.B., **Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells *in vivo* induced by albumin-binding protein.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 281: L1512-L1522, 2001;

WACKER W.E.C., VALLEE B.L., **Nucleic Acids and Metals.** *The Journal of Biological Chemistry*, 234(12): 3257-3262, 1959;

WEAVER J., POLLACK S., **Two types of receptors for iron on mitochondria.** *Biochem J*, 271: 463-466, 1990;

WEI J.H., XIE S.J., MEI L.M., BERAKDAR J., YAN Y.J., **Charge-transfer polaron induced negative differential resistance and giant magnetoresistance in organic spin-valve systems.** News J. Phys. 8(82), 2006;

WILSON R.B., **Frataxin and frataxin deficiency in Friedreich's ataxia.** Journal of Neurological Sciences, 207: 103-105, 2003;

WU K-J, POLACK A., DALLA-FAVERA R., **Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by *c-myc*.** Science, 283, 676 – 679, 1999;

WU L.J., LEENDERS A.G., COOPERMAN S., MEYRON-HOLTZ E., SMITH S., LAND W., TSAI R.Y., BERGER U.V., SHENG Z.H., ROUAULT T.A., **Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier.** Brain Res 1001: 108-117, 2004;

XU C., BAILLY-MAITRE B., REED J.C., **Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions.** The Journal of Clinical Investigations, 115(10): 2656-2664, 2005;

YAFFEE M., WALTER P., RICHTER C., MÜLLER M., **Direct observation of iron induced conformational changes of mitochondrial DNA by high-resolution field emission in lens scanning electron microscopy.** Proc Natl Acad Sci, 93:5341-5346, 1996;

ZECCA L., ZUCCA F.A., WILMS H., SULZER D., **Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics.** Trends Neurosci 26: 578 – 580, 2003;

ZHANG Z., WEI T., HOU J., LI G., YU S., XIN W., **Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid.** Eur. J Pharmacol 467: 41-47, 2003;

ZHANG X., SURGULADZE N., SLAGLE-WEBB B., COZZI A., CONNOR J.R.,
**Cellular iron status influences the functional relationship between microglia
and oligodendrocytes.** *Glia* 54(8): 795-804, 2006;

ZUCCA F.A., BELLEI C., GIANNELLI S., TERRENI M.R., GALLORINI M., RIZZIO
E., PEZZOLI G., ALBERTINI A., ZECCA L., **Neuromelanin and iron in human
locus coeruleus and substantia nigra during aging: consequences for
neuronal vulnerability.** *J. Neural Transm* 113:757-767, 2006;