



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Pós-graduação em Biologia Animal

**Estudos morfológicos dos efeitos de nanopartículas
magnéticas à base de magnetita recobertas com
DMSA, em fígado de camundongos Swiss**

Renata Miranda Parca

Brasília – D.F., 2006

Aos meus pais, pelo apoio e ensino. Sem vocês nada disso poderia acontecer.

Ao André, pela segurança, confiança e apoio nos momentos mais difíceis. Te amo meu amor!!!

À vovó e irmãos, pois a família é a base de tudo!!

Agradecimentos

Agradeço aos meus maravilhosos pais por toda oportunidade que me deram em vida, pois sem eles, com certeza, não teria chegado aonde estou agora.

Agradeço ao meu marido, amigo, cúmplice e razão do meu viver: André te amo!!!

Agradeço a toda minha família, em especial à vovó Julieta, pelo apoio e base necessária.

Aos amigos e técnicos do laboratório (Caroline Valois, Djalma, Sacha, Érica, João Paulo, Fernanda, Maitê, Luciano, Shélida...) a minha profunda gratidão pelo auxílio e suporte quando eu mais precisei.

Ao Dr. Norbert Buske da Empresa Berlin Hart pelo fornecimento do meu material de estudo.

Ao Prof. Ricardo Bentes, pelas contribuições, paciência e confiança que eu chegaria até o fim.

À Mônica, minha querida amiga, que me incentivou e não desistiu de mim!! Môm, te adoro!!!

À CAPES pelo financiamento do meu mestrado.

À rede NANOBIOTEC pelo auxílio financeiro dado na realização desta pesquisa.

Aos professores e técnicos, de laboratório e administrativo, tanto do departamento de Genética e Morfologia quanto dos demais departamentos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, pelo apoio.

Aos meus queridos amigos e companheiros da ANVISA, que me aturaram e me deram forças para continuar. Obrigada Gabriella, Valéria, Taciana, Lara, Daniel, Geni, Marília, Christiane, João, Ana Lúcia, Denise, Ana Paula, Sandro.

Aos meus chefinhos: Renato Spindel, José Antonio de Faria Vilaça e Amal Kosak. Muito obrigada pelo apoio e pelas liberações!!!

ÍNDICE

Abreviaturas	<i>viii</i>
Resumo	<i>ix</i>
Abstract	<i>x</i>
1) Introdução	01
1.1) Nanotecnologia	01
1.2) Nanopartículas magnéticas e fluidos magnéticos	03
1.3) Aplicações das nanopartículas magnéticas	06
1.4) Biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas	13
1.5) Possíveis efeitos adversos ao uso de nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA no organismo	14
1.6) Estudo de fluido magnético estabilizado com DMSA	18
2) Objetivos	22
3) Material e Métodos	23
3.1) Nanopartículas magnéticas recobertas por DMSA (NPMs-DMSA)	23
3.2) Caracterização das partículas de magnetita do FM-DMSA por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	23
3.3) Animais	24
3.3.1. Grupos experimentais	24
3.4) Microscopia de luz – ML	25
3.5) Contagem de focos inflamatórios nos cortes de fígado de animais controle e tratados com FM-DMSA	28
3.6) Microscopia eletrônica de transmissão – MET	29
4) Resultados	31
4.1) Caracterização do FM-DMSA por microscopia eletrônica de transmissão – MET	31

4.2) Estudo morfológico da biocompatibilidade da amostra de FM-DMSA analisada por meio de microscopia de luz – ML	32
4.3) Estudo da biocompatibilidade da amostra de FM-DMSA analisada por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)	39
4.4) Estudo da biocompatibilidade da amostra de FM-DMSA por meio da quantificação de focos de inflamação no parênquima hepático	40
5) Discussão	43
5.1) Análise da caracterização da amostra de FM-DMSA por meio de MET	43
5.2) Análise de biocompatibilidade da amostra de FM-DMSA em fígado de camundongos Swiss	48
6) Conclusões	57
7) Referências Bibliográficas	59

ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of variance (análise de variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
Colabs	Colaboradores
DMSA	Ácido meso-2,3-mercaptosuccínico
FDA	Federal Drug Agency (agência federal de drogas)
FM	Fluido magnético
H.E.	Hematoxilina e Eosina
IQUEGO	Indústria Química do Estado de Goiás
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
ML	Microscopia de luz
NPM	Nanopartícula magnética
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
GE1	Grupo experimental de 1 dia de tratamento com FM-DMSA
GE2	Grupo experimental de 2 dias de tratamento com FM-DMSA
GE7	Grupo experimental de 7 dias de tratamento com FM-DMSA
GE15	Grupo experimental de 15 dias de tratamento com FM-DMSA
GE30	Grupo experimental de 30 dias de tratamento com FM-DMSA
GE60	Grupo experimental de 60 dias de tratamento com FM-DMSA
GE90	Grupo experimental de 90 dias de tratamento com FM-DMSA
GE120	Grupo experimental de 120 dias de tratamento com FM-DMSA

RESUMO

Fluidos magnéticos (FMs) são suspensões coloidais estáveis contendo nanopartículas magnéticas (NPMs), com diâmetro usualmente variando entre 5 e 15 nm, recobertas por uma camada estabilizante de natureza orgânica ou inorgânica e dispersas em líquidos carreadores. As partículas magnéticas mais freqüentemente usadas são ferritas cúbicas, incluindo magnetita (Fe_3O_4) e maguemita (Fe_2O_3). Nos últimos anos, os FMs têm sido considerados materiais promissores visando a novas aplicações na área biomédica. Com a finalidade de compreender melhor os efeitos *in vivo* dos FMs, o presente estudo reporta testes de biocompatibilidade em fígado de camundongos com uma amostra de FM à base de NPMs de magnetita recobertas com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA). Os testes foram realizados entre um e cento e vinte dias após a injeção de 100 μl de amostra contendo $4,3 \times 10^{16}$ partículas/ cm^3 . Para as análises de biocompatibilidade, foram realizados estudos em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados de microscopia de luz revelam que a partícula, em fígado, foi considerada biocompatível, pois apesar de ter causado leve reação inflamatória no órgão, este não sofreu alterações morfológicas. As nanopartículas, a partir de um dia de tratamento, eram fagocitadas por células de kupffer e em quinze dias de exposição ao FM-DMSA foram detectadas dentro de células endoteliais. As análises de microscopia eletrônica confirmam esses dois dados. Ainda com quinze dias foram encontradas NPMs entre dois hepatócitos, o que sugere sua eliminação via canalículos biliares como compostos integrantes da bile. Aos trinta dias de tratamento com FM-DMSA houve um aumento do número de NPMs no fígado, observado visualmente em análises de microscopia de luz. Essa observação foi corroborada por dados da literatura, o que indica que o fígado tem papel central no metabolismo e eliminação das NPMs. Aos sessenta, noventa e cento e vinte de tratamento, NPMs foram encontradas, principalmente, em espaços-porta dentro de ductos biliares e em seu conjuntivo intersticial. A análise de contagem da média de focos inflamatórios no parênquima do fígado nos animais experimentais revelou que o FM-DMSA gera uma leve reação inflamatória que regride com o tempo, assemelhando-se ao grupo controle. Portanto, o FM-DMSA pode vir a ser utilizado, no futuro, como uma ferramenta na escala nanométrica para estudos de aplicações biomédicas no fígado.

ABSTRACT

Magnetic fluids (FMs) are stable colloidal suspensions containing magnetic nanoparticles (MNPs), with diameter usually ranging from 5 to 15 nm, surface-coated by an organic or inorganic stabilizer and dispersed in liquid carriers. Most frequently used magnetic nanoparticles are iron oxide, including magnetite (Fe_3O_4) and maghemite (Fe_2O_3). MFs have emerged as a promising material basis for new possibilities in the biomedical field. In order to better understand the *in vivo* effects of MFs, the present study reports the biocompatibility in mice liver of a magnetite nanoparticle surface-coated with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA). The test was performed from one to 120 days after intravenous injection of 100 μl sample containing about $4,3 \times 10^{16}$ particles/ cm^3 . Biocompatibility was investigated through light microscopy and electron transmission microscopy. Light microscopy results revealed that FM-DMSA is a biocompatible nanoparticle, because the liver did not show morphological alterations. The MNPs, at 1 day of treatment, were phagocited by kupffer cells and at 15th days, they were detected into endothelial cells. Electron microscopy results confirmed both data. In addition, at 15th days, the NPMs were also found between two hepatocytes, suggesting the elimination by the biliar canaliculi as a bile component. At 30th day of treatment with FM-DMSA the number of MNPs in the liver increased, as visually observed by light microscopy. It is confirmed by the literature, what indicates the liver central role in the metabolism and elimination of the MNPs. At 60th, 90th and 120th day, the MNPs were mainly detected in liver portal space inside the bile ducts and in the interstitial connective. Inflammatory focuses counting revealed that FM-DMSA induced a small inflammatory reaction that reduces with time, became similar with the control group. The results above suggest that FM-DMSA could be a nanotool for specific biomedical studies and therapies in liver.

1) INTRODUÇÃO

1.1) Nanotecnologia

O prefixo nano, em grego, significa anão. A nanotecnologia é uma área de conhecimento que tem como principal objetivo aplicar a ciência em escala nanométrica. Dessa forma, a manipulação de átomos e moléculas torna-se viável, permitindo a redução ou mesmo a eliminação dos fatores intervenientes para o funcionamento de um sistema, seja este físico, químico ou biológico (Whitesides & Aliviatos, 2001).

O desenvolvimento de microscópios de tunelamento e força atômica permitiu a visualização dos materiais e estruturas em nível atômico. A observação de estruturas nanométricas, até então pouco conhecidas pela comunidade científica, abriu caminho para o conhecimento e aplicação da nanotecnologia. Em 1959, o físico Richard Feynman, em uma palestra no Instituto de Tecnologia da Califórnia, discorreu sobre a promissora aplicação de materiais nanoestruturados para o desenvolvimento da ciência. Em seu

discurso, Feynman sugeriu que engenheiros poderiam manipular átomos, construindo estruturas mais ordenadas e com características novas de comportamento.

O desenvolvimento da nanotecnologia na física, na engenharia e na ciência da computação foi muito marcante nos últimos anos, pois as áreas de conhecimento da informática e da robótica necessitam de manipulação atômica de componentes para seu bom funcionamento.

A aplicação da nanotecnologia de materiais na área da informática abriu caminho para sua utilização na biomedicina. Compostos biológicos ou químicos em escala nanométrica podem ser facilmente sintetizados e têm gerado excelentes resultados quando administrados em sistemas biológicos.

Materiais nanoestruturados na área da saúde podem ser utilizados na construção de fármacos, cosméticos e partículas magnéticas em escala nanométrica.

Os fármacos em escala nanométrica são formados por moléculas de compostos químicos recobertos por coberturas variadas, que vêm sendo extensamente utilizados por indústrias farmacêuticas para fins de terapia. Dentre as suas vantagens em relação aos fármacos comuns está sua fácil distribuição, o que

evita efeitos colaterais e uma deposição aleatória do medicamento pelo corpo (Tartaj *et al.*, 2003).

Dentro dessa mesma linha de ação direcionada dos nanomateriais, a indústria de cosméticos vem investindo maciços recursos na construção dos nanocosméticos (Pankhurst, 2003), que podem aumentar a absorção do composto pela pele, maximizando seu efeito no organismo.

As nanopartículas magnéticas serão melhor abordadas pois são o objeto deste trabalho.

1.2) Nanopartículas magnéticas e fluidos magnéticos

Nanopartículas magnéticas (NPMs) são moléculas extremamente pequenas, com tamanhos que variam de 3 a 15 nm (Sun *et al.*, 2004), que direcionam sua movimentação quando expostas a um campo magnético.

As NPMs possuem em sua composição básica um metal diretamente ligado a um óxido de ferro, cuja composição é exemplificada como MFe_2O_4 . Nestas partículas, o M pode representar um metal divalente como, por exemplo, níquel, cobalto, manganês ou zinco (Sun *et al.*, 2004).

As ferritas, consideradas nanopartículas magnéticas, possuem a estrutura básica de óxidos de ferro. A magnetita, uma ferrita de composição química Fe_2O_4 , tem sido extensamente utilizada em aplicações biomédicas de NPMs (Hutten *et al*, 2004, Gupta & Gupta, 2005). A magnetita isolada vem sendo aplicada como agente contrastante para imagens de ressonância magnética nuclear (Coroiu, 1999), tendo como principal evento adverso, a indução de processos inflamatórios nos órgãos utilizados para análise (Na, 2003). As nanopartículas magnéticas à base de magnetita podem ter inúmeras aplicações em terapias e diagnósticos.

Os fluidos magnéticos (FMs), ou ferrofluidos, são sistemas magnéticos coloidais nos quais o disperso é constituído de nanopartículas magnéticas com diâmetros usualmente variando entre 5 e 15 nm, recobertas por uma camada molecular estabilizante de natureza orgânica ou inorgânica, dispersa em um solvente orgânico ou inorgânico.

Para a obtenção de FMs estáveis em meio fisiológico, isto é, em pH neutro e força iônica apropriada (0,9% NaCl), é necessário o recobrimento adequado da superfície da nanopartícula (Halbreich *et al.*, 1998). Nessas suspensões, as interações partícula-líquido são suficientemente fortes para que o comportamento magnético seja transmitido ao líquido como um todo.

O tamanho das NPMs e o seu comportamento magnético no fluido permitem que as mesmas permaneçam em suspensão quando administradas em um sistema biológico. As NPMs são, dessa forma, partículas de suma importância para aplicações na área da biomedicina, pois possuem pequeno tamanho, o que facilita sua administração e eliminação pelo organismo, além de exibir comportamento magnético através da aplicação de um campo magnético externo (Tartaj *et al.*, 2003).

Fluidos magnéticos à base de magnetita possuem inúmeras aplicações biomédicas já descritas pela literatura e que estão apresentadas no próximo item. Entretanto, estudos básicos que envolvam análise de biocompatibilidade desses compostos ferrosos tornam-se imprescindíveis, visto que as novas tecnologias a serem incorporadas às práticas terapêuticas necessitam de estudos que comprovem a ausência ou redução de efeitos colaterais em humanos. Dessa forma, estudos básicos de fase I, que demonstrem aceitação e eliminação dessas partículas pelo organismo, são essenciais ao desenvolvimento da nanobiotecnologia, área do conhecimento que associa conceitos da nanociência à aplicação desses compostos pela área médica.

1.3) Aplicações das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas possuem inúmeras aplicações em sistemas biológicos, sendo utilizadas para fins de diagnósticos, laboratoriais e terapêuticos. Algumas aplicações e seus resultados são mais detalhadamente descritos a seguir:

a) Aplicações de NPMs para fins de diagnóstico por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

A Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica poderosa de diagnóstico médico que permite a formação de imagens em duas ou três dimensões. Sob efeito de um potente campo magnético, prótons do corpo são sensibilizados de maneira uniforme, induzindo passagem de átomos de hidrogênio dos compostos biológicos de um nível atômico menos energético para outro mais energético. Uma vez cessado o estímulo do campo magnético, o retorno dos átomos ao nível normal de excitação eletrônica induz liberação de fótons, que são absorvidos e detectados pelo aparelho, permitindo, assim, a identificação de lesões ou tumores com precisão maior que aparelhos mais tradicionais como, por exemplo, o raio X.

A técnica da ressonância magnética nuclear tem, entretanto, algumas limitações, pois não detecta tumores em fase inicial de

desenvolvimento, o que poderia facilitar o tratamento e a cura de doenças.

Inúmeros relatos de literatura (Coroiu, 1999; Lanza *et al.*, 2004; Rausch *et al.*, 2004) demonstram o potencial de aplicação das nanopartículas magnéticas como importantes agentes de aumento de contraste para fins de diagnóstico por ressonância magnética.

As NPMs agem como potencializadores da passagem dos átomos de hidrogênio corpóreo para um estado mais excitado na nuvem eletrônica atômica (Baker, 2004). Assim, células tumorais que possuem atividade fagocítica elevada para diversos compostos absorvem as nanopartículas magnéticas, aumentando contraste e, dessa forma, melhorando a formação de imagens pela técnica da ressonância magnética nuclear.

Vários agentes têm sido utilizados como potenciais agentes contrastantes. Partículas de magnetita, ou maguemita, estão sendo usadas para diagnóstico de derrames, infarto do miocárdio, lesões no fígado e tumores. Estas partículas tendem a se acumular em tecidos com características diferentes ou com intensos processos fagocíticos (Kim *et al.*, 2001).

Nesse sentido, Kim e colaboradores (2001), objetivando desenvolver um marcador para diagnóstico de alterações morfológicas e funcionais no cérebro, por meio de estudo de imagens de

ressonância magnética (RM), trabalharam com nanopartículas de magnetitas recobertas com 10-oleil éter polioxietileno, de diâmetro variando de 2 a 6 nanômetros. Eles observaram que estas nanopartículas têm uma propriedade superparamagnética detectável na varredura de RM, podendo, assim, ser este um possível substrato de agente contrastante de ressonância magnética. Além disso, observaram que as nanopartículas de pequeno tamanho podem ser seletivamente transportadas para espaços intercelulares nanométricos do cérebro, possibilitando também, no futuro, o seu uso na vetorização de drogas no tratamento de doenças neurodegenerativas, por exemplo, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e epilepsia.

A utilização de nanopartículas magnéticas como agentes contrastantes para o diagnóstico médico abre um extenso leque de técnicas para detecção de doenças e tumores. Entretanto, a biocompatibilidade das partículas a serem administradas em um sistema biológico deve ser analisada, de forma a serem medidas concentrações e formas de administração ideais de ferrofluidos. Estudos com ferritas comumente utilizadas para exames de RMN demonstraram que o ferro é fagocitado por células do sistema retículo-endotelial e armazenado em proteínas de ligação ao metal como, por exemplo, a ferritina (Roberts *et al.*, 2000). Análises bioquímicas e histológicas mostraram que, em aproximadamente três meses, o

material é eliminado do organismo (Bacon *et al.*, 1987). Diferentemente do trabalho de Bacon e colabs. (1987) e Roberts e colabs. (2000), alguns autores (Oswald, 1997; Na, 2003) citam alterações bioquímicas e teciduais em órgãos expostos ao tratamento com ferritas, demonstrando a necessidade de serem realizados estudos para analisar a compatibilidade de nanopartículas magnéticas.

b) *Aplicações das NPMs em processos de separação celular, a Magnetoferese*

Atualmente, muita atenção tem sido dada à extração sólido-fase como uma forma de isolar e pré-concentrar componentes de uma matriz. A Magnetoferese, processo que visa a separação de células por meio de um campo magnético, tem sido usada com fluidos magnéticos acoplados a anticorpos específicos para tipos celulares desejados. Quando expostas a um campo magnético, as células reconhecidas pelos anticorpos conjugados ao fluido magnético podem ser filtradas e separadas do conjunto restante (Da Silva *et al.*, 1997).

Os procedimentos de separação celular e molecular por técnica de aférese magnética vêm sendo extensamente utilizados como rotina laboratorial (Tartaj *et al.*, 2003). A aplicação da magnetoferese em laboratório de detecção celular é exemplificada no trabalho de Safarik & Safarikova (2003), no qual um anticorpo para receptores celulares

de linfócitos T auxiliares é conjugado a ferritas, que exibem comportamento magnético. As células conjugadas aos anticorpos ferromagnéticos são atraídas por um campo magnético e separadas do “pool” de células não-marcadas, permitindo a separação de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos, que são importantes para o estudo e desenvolvimento da imunologia celular.

c) Direcionamento de drogas utilizando NPMs.

O conceito proposto por Freeman e colabs. (1960) de que partículas finas de ferro poderiam ser transportadas pelo sistema vascular e serem concentradas em um ponto particular do corpo com o uso de um campo magnético (Figura 01) abriu espaço para a utilização de nanopartículas magnéticas como carreadoras de drogas ou anticorpos para tecidos ou órgão alterados. O processo de quimioterapia direcionada utiliza um agente quimioterápico acoplado à partícula magnética, que é direcionada ao local do tumor por um campo magnético. A droga interage diretamente no tumor, reduzindo os efeitos colaterais de uma quimioterapia tradicional (Kharkevich *et al.*, 1989). A utilização da técnica da quimioterapia direcionada foi descrita recentemente por Jain e colaboradores (2005), que utilizaram NPMs estabilizadas por ácido hialurônico e ácido oléico associadas ao quimioterápico doxorubicina. Os resultados mostraram a capacidade

antiproliferativa da partícula sob células tumorais, com efeito e duração dose-dependente.

Estudos de direcionamento de drogas utilizando NPMs podem ser utilizados também para concentração e direcionamento de outros fármacos, como, por exemplo, medicamentos administrados para doenças negligenciadas como a tuberculose, a malária etc.

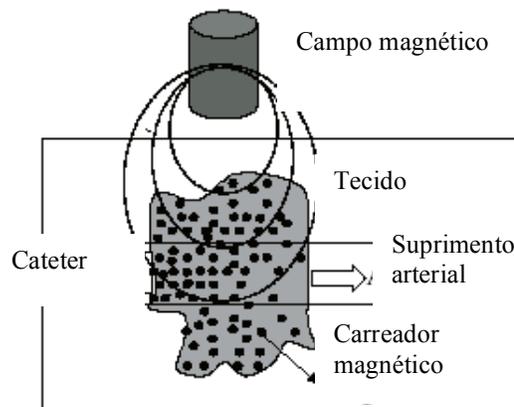


Figura 01. Representação esquemática de um carreador magnético usado no transporte de drogas para uma região específica do corpo. Um cateter é inserido em uma artéria que irriga um tumor. Um campo magnético direciona as nanopartículas magnéticas para a região levando consigo, por exemplo, um agente quimioterápico. Extraído de (Tartaj *et al.*, 2003).

d) *Utilização de NPMs no aquecimento e lesão de células tumorais, a magnetotermocitólise.*

A hipertermia é um procedimento terapêutico que consiste em aumentar a temperatura de regiões do corpo afetadas por crescimento de células tumorais. O aquecimento da massa tumoral a temperaturas que variam de 41 a 42° C induz a lise e conseqüente morte celular. (Wust *et al.*, 2002; Halbreich *et al.*, 2002). Entretanto, a técnica da hipertermia convencional não é muito efetiva, pois as áreas mais internas do tumor não são aquecidas uniformemente e, frequentemente, restam células tumorais vivas após o tratamento. A magnetotermocitólise, uma técnica que associa a utilização de NPMs à hipertermia, foi utilizada como terapia contra o câncer (Yanase *et al.*, 1997) e alcançou excelentes resultados, com redução ou completa eliminação de tumores sem grandes efeitos colaterais. Nanopartículas magnéticas, quando expostas a um campo magnético alternado, possuem a habilidade de vibração. Desta forma, a presença de NPMs dentro de células tumorais, quando expostas a um campo magnético alternado, vibram e induzem à lesão celular e conseqüente eliminação do tumor. A técnica da magnetotermocitólise foi recentemente utilizada por Ito e colaboradores (2004). Testes usando ferritas recobertas por lipossomas, denominadas magnetolipossomas, foram realizados recentemente com sucesso. Os magnetolipossomas

apresentavam, em sua superfície, anticorpos anti-HERII, um fator de crescimento epidermal muito importante para a propagação de tumores. Células neoplásicas em cultura foram destruídas quando incorporaram os magnetolipossomas e eram expostas a um campo magnético alternado, demonstrando o potencial de aplicação dos fluidos magnéticos na eliminação de inúmeros tipos de cânceres.

1.4) Biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas

A biocompatibilidade é definida como a habilidade de um material em criar uma reação específica no organismo, de forma a minimizar sua resposta tóxica e ser facilmente eliminado pelo indivíduo. Um composto biocompatível deve gerar mínima alteração homeostática e deve participar de vias metabólicas de eliminação (Williams, 1999). Para a utilização de fluidos magnéticos em suas possíveis aplicações em sistemas biológicos, faz-se necessário o estudo de sua biocompatibilidade, de forma a objetivar o conhecimento de seus efeitos toxicológicos antes de sua utilização em seres humanos.

Entre os estudos de toxicidade celular, podemos destacar os estudos básicos de biocompatibilidade das nanopartículas magnéticas, utilizando a técnica de microscopia de luz (ML) e microscopia

eletrônica (ME). A técnica de ML, apesar de ser tradicional, é muito utilizada para estudos toxicológicos. Por meio dessa técnica, podemos visualizar evidências de resposta do organismo a um composto exógeno, como, por exemplo, presença de infiltrados de células inflamatórias, formação de processos fibróticos e alterações morfológicas evidentes.

A microscopia eletrônica complementa as análises da microscopia de luz, fornecendo detalhes não visualizados, principalmente em relação a alterações celulares, e confirmando hipóteses levantadas por meio da ML.

1.5) Possíveis efeitos adversos ao uso de nanopartículas magnéticas no organismo

As nanopartículas magnéticas são ferritas cuja composição química é representada pela fórmula Fe_2O_3 . Óxidos de ferro circulando livremente na corrente sanguínea são absorvidos por células do sistema imunológico, principalmente fagócitos (Wunderbaldinger *et al.*, 2002). No meio intracelular, os óxidos de ferro são metabolizados e o metal em sua forma oxidada (Fe^{3+}) induz a formação de radicais livres (compostos ricos em radicais OH^-), que podem levar à peroxidação

lipídica no meio intracelular. A lesão de membrana, induzida pelo estresse oxidativo a que a célula fica submetida, gera síntese de prostaglandinas, importantes mediadores celulares de processos inflamatórios (Abbas *et al.*, 2002). As prostaglandinas são moléculas derivadas de ácidos graxos de membrana celular. Sua produção induz vasodilatação e ação quimiotática, atraindo células do sistema imunológico para a região da lesão. A atração celular e a liberação de citocinas pelas células do sistema imune induzem um processo inflamatório, que pode resultar em lesão tecidual (Abbas *et al.*, 2002).

A inflamação é morfológicamente caracterizada pelo acúmulo de fluidos e leucócitos na região injuriada, com o objetivo de destruir, diluir e isolar o agente exógeno. Os principais participantes celulares da inflamação são as células endoteliais, leucócitos, mastócitos, plasmócitos, fibroplastos e os macrófagos residentes no tecido. Na fase aguda da resposta inflamatória, os neutrófilos são os leucócitos mais numerosos, sendo também visualizados monócitos em grande quantidade. Já na fase crônica, o perfil da população celular se altera, sendo que os macrófagos e os linfócitos são os tipos celulares que permanecem mais tempo no local da injúria (Anderson, 1998; Babensee, 1998).

Diante do exposto, pode-se perceber que o excesso de ferro no meio intracelular induz a formação de processos inflamatórios nos

tecidos, o que pode levar à formação de processos fibróticos ou à neoplasia celular (Siah *et al.*, 2005).

A hemocromatose é uma doença de cunho genético causada pelo excesso de ferro no organismo. Esta patologia é caracterizada por mutação de genes responsáveis pela homeostase do ferro no organismo, que é continuamente absorvido na dieta sem mecanismos de retroalimentação negativa. Pacientes com quadro de hemocromatose manifestam os primeiros sintomas por volta de 40 anos, desenvolvendo quadros de cirrose, carcinoma hepatocelular e/ou insuficiência cardíaca. Gera-se, portanto, deposição excessiva de ferro nas células parenquimatosas, em especial as do fígado, pâncreas e coração (Souza *et al.*, 2001). O tratamento para a hemocromatose pode consistir na administração de quelantes de ferro como, por exemplo, o fármaco deferoxamina, ou a flebotomia, técnica simples que consiste em retirar pequenas doses de sangue do paciente, de forma a estimular a síntese de hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio no organismo (Siah *et al.*, 2005).

A administração de nanopartículas magnéticas à base de ferritas em camundongos pela via endovenosa poderia gerar fagocitose e depósito de compostos de ferro no organismo, que se assemelha, biologicamente, a hemocromatose. Sabe-se, no entanto, que o ferro é um componente essencial para a síntese de hemoglobina e de diversas

proteínas intracelulares, sendo vital para o desenvolvimento dos sistemas biológicos.

O íon férrico é prontamente absorvido pelo organismo na dieta, sendo transportado ativamente pelos enterócitos no intestino delgado. Parte dele é internalizado pelas células na forma de grupamentos heme ou como ferro oxidado (Anderson *et al.*, 2006). As ferroportinas, proteínas presentes na membrana basolateral dos enterócitos, conjugam o ferro intracelular aos transportadores plasmáticos desse metal, denominados transferrinas. As transferrinas são liberadas na corrente sanguínea e atingem diversos órgãos, principalmente o fígado e a medula óssea. O fígado é o órgão que mais armazena e processa o ferro transportado (Siah *et al.*, 2005). Os hepatócitos possuem receptores celulares para a transferrinas e ferritina, principal proteína de armazenamento de ferro endógeno. A ferritina é uma proteína intracelular capaz de armazenar estoques de ferro e disponibilizá-lo quando o mesmo for requerido pelo organismo.

A partir do que foi anteriormente exposto, pode-se prever que a utilização de nanopartículas magnéticas em sistemas biológicos pode gerar efeitos lesivos a tecidos, caso a concentração administradas seja elevada. A concentração de NPMs a ser injetada na circulação deve garantir efetividade de tratamentos, exibir comportamento magnético e permitir a metabolização do ferro pelo organismo. A concentração de

ferritina e transferrina plasmática deve ser continuamente monitorada, de forma a detectar precocemente intoxicação do organismo por excesso de ferro (Crichton & Charlotheaux, 2002).

1.6) Estudo de fluido magnético estabilizado com DMSA

Fluidos magnéticos recobertos por ácido meso-2,3-dimercaptosuccinico (DMSA) têm sido estudados como possíveis agentes de detecção e tratamento de doenças (Halbreich *et al.*, 1998). O DMSA é um agente quelante, comumente utilizado na desintoxicação de indivíduos expostos a metais pesados (Rademacher *et al.*, 2001). Este composto é hidrossolúvel e tem como função principal se ligar a metais pesados como, por exemplo, o chumbo, formando um complexo que, dessa forma, é facilmente eliminado da circulação pela urina. O uso do DMSA como agente quelante já foi aprovado por órgãos regulatórios internacionais e nacionais como o Federal Drug Agency (FDA), nos Estados Unidos e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil. Estes órgãos exigem, para aprovação e concessão de registro a um medicamento, testes clínicos que comprovem eficácia e baixa toxicidade ao organismo. O DMSA não

induz, portanto, nenhuma lesão significativa no organismo sendo considerado, até o momento, um composto biocompatível.

O DMSA é uma cobertura promissora para estabilizar os fluidos magnéticos, pois possui características moleculares singulares, que permitem estabilizar a partícula magnética e promovem a ligação de agentes efetores diretamente em sua estrutura (Halbreich *et al.*, 1997, Kalia *et al.*, 2005), como anticorpos, outras proteínas e enzimas. A utilização de NPMs recobertas com DMSA, caso ambas sejam biocompatíveis, abre possibilidade de aplicações biomédicas já citadas e descritas anteriormente.

Existem poucas pesquisas com a utilização do fluido magnético recoberto com DMSA *in vivo*. FMs recobertos por ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) têm sido estudados pelo nosso grupo de pesquisa desde 2002, quando Chaves (2002) injetou, intravenosamente FM-DMSA em camundongos, em períodos de tempo que variavam entre cinco minutos e 24 horas. Foram coletados o sangue e vários órgãos, entre eles fígado e pulmão. Após análise por microscopia de luz e ressonância magnética, observou-se a presença de aglomerados de partículas magnéticas a partir de cinco minutos de tratamento, principalmente nos pulmões. Além disso, os resultados de ressonância magnética mostraram a ausência de partículas magnéticas no sangue aos cinco minutos de tratamento. A ressonância

detectou também a presença de partículas magnéticas no fígado, o que não foi observado em análise de microscopia de luz, a qual não possui resolução para a visualização de partículas não aglomeradas. Os resultados sugerem que o FM é rapidamente retirado da circulação sanguínea, alojando-se, neste curto período de tempo, principalmente no tecido pulmonar e pouco no tecido hepático.

Recentemente, Garcia (2005) analisou os efeitos de FM-DMSA em pulmão de camundongos Swiss, no período de um a 90 dias de tratamento, analisando sua biocompatibilidade e biodistribuição. Em suas análises de ressonância magnética, as NPMs inicialmente apresentaram-se como um sinal maior no pulmão, mas no 30º dia a quantidade de partículas era comparativamente maior no fígado, sugerindo, segundo a autora, que o FM-DMSA sofre uma redistribuição no organismo, apesar das NPMs ainda serem detectadas no pulmão até 90 dias após o tratamento. Análises de biocompatibilidade por meio de técnicas de ML e ME demonstraram que o FM-DMSA, em pulmão, causou uma resposta inflamatória moderada, mas que regrediu em noventa dias de tratamento.

Assim, a análise da biocompatibilidade em fígado de animais submetidos ao tratamento com FM-DMSA, nos mesmos períodos investigados por Garcia (2005) torna-se necessária, uma vez que o fígado é o segundo órgão preferencial de depósito das NPMs. Além

disso, a elucidação dos reais efeitos do FM-DMSA no organismo, a médio e curto prazo, é de fundamental importância para avaliar as prováveis aplicações biomédicas deste tipo de fluido magnético no futuro.

2) OBJETIVOS

Tendo em vista o potencial de utilização de FMs nas aplicações biomédicas e a necessidade da caracterização biológica dos biomateriais, o objetivo deste trabalho é estudar os efeitos biológicos subagudos e crônicos de FM constituído por partículas de magnetita recobertas por ácido 2,3 meso-dimercaptosuccínico (DMSA), em fígado de camundongos Swiss, por meio de técnicas de microscopia de luz e de microscopia eletrônica.

Objetivos específicos

- 1) Determinar a distribuição log-normal e o diâmetro médio das nanopartículas da amostra de FM-DMSA.
- 2) Determinar, após administração endovenosa de FM-DMSA *in vivo* a biocompatibilidade da partícula em fígados de camundongos *Swiss*, no período de 1 a 120 dias, por meio de técnicas de Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica;
- 3) Verificar a dinâmica do processo inflamatório induzido por FM-DMSA por meio da contagem de focos inflamatórios no tecido hepático no período de 1 a 120 de tratamento.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Nanopartículas magnéticas recobertas por DMSA (NPMs-DMSA)

Amostras de FM contendo nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) estabilizadas pelo recobrimento com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) em meio aquoso, foram produzidas e gentilmente cedidas pelo Dr. Nobert Buske, da empresa Berlin-Heart (Berlin-Alemanha). A amostra continha $4,3 \times 10^{16}$ partículas/ cm^3 .

3.2.) Caracterização das partículas de magnetita do FM-DMSA por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Amostra de FM foi diluída 1000 vezes em água destilada e colocada sobre telas de microscopia eletrônica recobertas com Formvar[®]. Após secarem por duas horas, as telas foram levadas para análise e fotomicrografias em um microscópio eletrônico JEOL 1011, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília. Os diâmetros das partículas magnéticas ($n = 467$ partículas) foram obtidos por análise computacional, utilizando-se o programa ImagePro

4.0. A distribuição de diâmetros das partículas foi obtida utilizando-se o melhor ajuste de distribuição lognormal (Morais *et al.*, 2002).

3.3) Animais

Camundongos Swiss fêmeas, com sessenta dias de vida, obtidos da Indústria Química do Estado de Goiás (IQUEGO, GO), foram mantidos no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (IB-UnB), com temperatura controlada ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com fornecimento de água e ração a vontade.

3.3.1) Grupos Experimentais

Os animais foram separados em 2 grupos:

- a) Grupos experimentais (GE) - cada animal recebeu uma injeção única, via endovenosa (EV), de 100 μL de FM na concentração de $4,3 \times 10^{15}$ partículas/ cm^3 em solução salina. Os animais, num total de seis para cada grupo experimental, foram mortos em intervalos de um dia (GE1), dois dias (GE2), sete dias (GE7), 15

dias (GE15), 30 dias (GE30), 60 dias (GE 60), 90 dias (GE90) e 120 dias (GE120).

b) Grupo controle (GC) – cada animal recebeu uma injeção única com 100 μ L de solução salina. Os animais, num total de dezesseis, foram mortos nos mesmos tempos de cada grupo experimental (dois animais para cada grupo).

Os animais foram mortos por deslocamento cervical e tiveram seu fígado coletado para análises em microscopia de luz e microscopia eletrônica.

Este procedimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília em setembro de 2003.

3.4) Microscopia de Luz - ML

Todo o tecido hepático coletado foi cortado em pequenos fragmentos e estes fixados refrigerados a 4°C, por 12 horas em solução de Davidson para microscopia de luz (ML). O fixador de Davidson foi selecionado para a realização deste trabalho, pois sua

penetração, em tecidos muito moles como o fígado, é mais lenta e, dessa forma, diminui seu ressecamento. A composição da solução estoque do fixador de Davidson utilizada nesse trabalho foi: 400 mL de glicerina, 1200 mL de álcool etílico a 95%, 800 mL de formol a 37% e 1200 mL de água destilada. Na hora do uso, foi realizada uma mistura da solução estoque do fixador e de ácido acético, na proporção de 1:9.

Após o período de fixação, as peças foram desidratados com etanol, em uma série de concentrações crescentes, a 70, 80 e 90%, durante uma hora cada, e três vezes de uma hora a 100%. Em seguida, as peças foram colocadas para diafanizar em uma solução 1:1 de álcool e xileno por uma hora, seguido por três banhos em xileno puro de 1 hora cada. Para a inclusão, o material foi submetido a três banhos de resina Histosec[®] (Merck, Alemanha) e mantidos em estufa a 59°C, sendo o primeiro banho sob vácuo. Por último, o material foi incluído na mesma resina, em blocos moldados por barras de Leuckhart. Após a solidificação da resina, foi utilizado um micrótomo Leica RM2125RT para obtenção de cortes de 5 µm de espessura.

Para uma melhor análise do órgão dos animais de cada grupo estudado, foram realizados cortes semi-seriados dos blocos: para cada 16 cortes de tecido coletado, (quatro cortes por lâminas – total de quatro lâminas), 10 fragmentos eram descartados. Dessa forma, quase toda a totalidade do órgão foi seccionado, gerando uma coleção

histológica com, aproximadamente, 50 lâminas, conforme detalhado na figura abaixo (figura 02).

O material foi montado em lâminas de vidro mantidas em estufa a 37°C, por no mínimo quatro horas, para melhor aderência dos cortes nas lâminas. Das quatro lâminas montadas de cada série

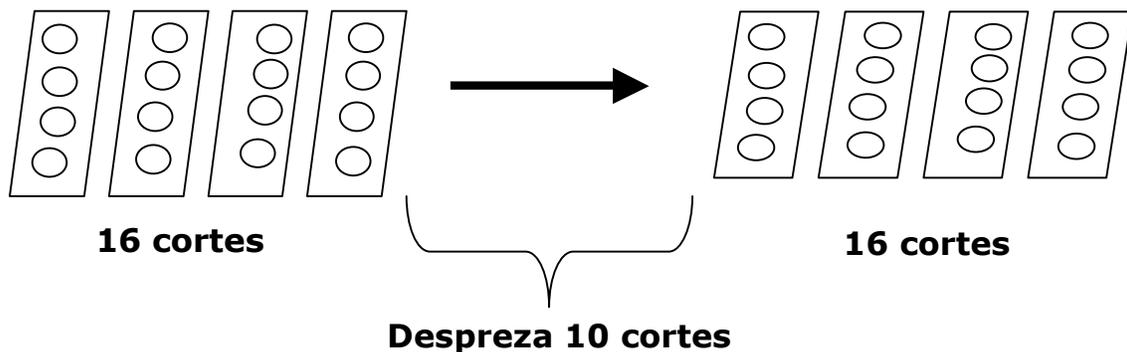


Figura 02: Esquema para realização de cortes semi-seriados em grupos controle e experimental de fígado.

de 16 cortes, somente as duas primeiras foram utilizadas para coloração, ficando as demais guardadas como reserva. Assim, para a coloração histológica, as lâminas foram submetidas a um processo de hidratação, com banhos em três soluções de xileno (um minuto cada), três soluções de álcool etílico 100% (um minuto cada), álcool etílico 90%, 80% e 70% (um minuto cada). Para a coloração por Hematoxilina e Eosina (H&E), as primeiras lâminas de cada série foram

colocadas em hematoxilina por três minutos e posteriormente em eosina por dois minutos (após breve banho em água corrente).

Visando à detecção de acúmulo de ferro em seu estado férrico (Fe^{3+}) no tecido, a coloração pelo método de Perls, ou azul da Prússia, foi utilizada. Esta técnica é útil para identificar grânulos de ferro intersticial ou celular no tom azul brilhante e intenso. Após desparafinização e hidratação, as segundas lâminas de cada série foram colocadas em solução 1:1 de ferrocianeto de potássio 2% e de ácido clorídrico 2%, por 15 minutos. Em seguida foram lavadas rapidamente em água destilada e coradas em vermelho neutro 2% por dois minutos. Depois da coloração, por qualquer um dos métodos descritos, o material foi desidratado em uma concentração crescente de etanol 70%, 80%, 90%, 100% (três vezes) e xileno puro (três vezes). Após o último banho de xileno, as lâminas foram recobertas com lamínulas utilizando-se Entellan® (Merck, Alemanha) para a aderência das mesmas e colocadas para secar na estufa, a 37°C, por 12 horas. As lâminas foram analisadas e as imagens capturadas em um microscópio Axioskop 20 da Zeiss, acoplado a uma câmara digital CCD-IRIS, utilizando o programa Pixel View Station ML.

3.5) Contagem de focos inflamatórios nos cortes de fígado de animais controle e tratados com FM-DMSA

Como descrito anteriormente, foram obtidas 50 lâminas de cortes semi-seriados de um lóbulo hepático de cada animal, tanto do grupo controle quanto dos grupos experimentais. Para análise dos focos de inflamação no tecido hepático de cada animal, foram selecionados cinco animais de cada grupo experimental e cinco do grupo controle. De cada animal selecionado foram escolhidas aleatoriamente cinco lâminas, eqüidistantes, de forma que o método permitisse abranger a representatividade do órgão. Desta forma, foram analisadas, por exemplo, uma lâmina bem no início da coleção histológica, outra próxima da lâmina 13, uma próxima da de número 25, outra próxima da lâmina 37 e uma última junto do final da coleção.

A contagem dos focos de inflamação foi realizada no microscópio Axioskop 20 da Zeiss com magnificação de 10x, sendo que todo o corte selecionado foi analisado quanto a presença de infiltrados inflamatórios. O número médio de focos inflamatórios observados em cada grupo foi submetido à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste de Fisher (EstatView para Windows) em nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.6) Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram coletadas amostras de fígado de todos os animais. O material cortado foi reduzido a peças de aproximadamente 1 mm³. As amostras foram fixadas por duas horas a 4°C em fixador Karnovisk modificado, que consiste de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2%, cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,2-7,4 e sacarose 3%.

Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes, por 15 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2-7,4), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (OsO₄) e tampão cacodilato de sódio 0,1M (1:1) por duas horas no escuro e lavadas com água destilada. Permaneceram em solução aquosa de acetato de uranila 2% por 12 a 14 horas no escuro e foram desidratadas em acetona (50%, 70%, 90%, e 100%) em banhos de 15 minutos cada, sendo que o banho de acetona 100% foi repetido quatro vezes. A infiltração foi realizada seguindo-se, em seqüência, as seguintes proporções de acetona e resina, respectivamente: (2:1), (1:1), (1:2) por seis horas cada, e finalmente resina pura. Em seguida as amostras foram

emblocadas com resina Spurr (Electron Microscopy Science, EUA) pura e polimerizadas a 60°C por dois dias.

A ultramicrotomia foi realizada em um ultramicrotomo (Leica Ultracut R) com facas de vidro, com cortes feitos à espessura de 70nm, esticados com clorofórmio, recolhidos com auxílio de uma espátula e depositados em telinhas de cobre. O material foi contrastado em uranila 2% por 40 minutos e em chumbo por 10 minutos e, posteriormente, analisado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM - 1011 Electron Microscope, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, da Universidade de Brasília.