

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

VANESSA CARVALHO MOREIRA

MÚLTIPLAS INJEÇÕES DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS A BASE DE  
MAGUEMITA RECOBERTAS COM ÁCIDO MESO-2,3-DIMERCAPTOSUCCÍNICO  
EM CAMUNDONGOS: BIOCMPATIBILIDADE E TOXICIDADE

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do Título de Mestre  
em Ciências da Saúde pelo Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Co-Orientador: Profa. Dra. Mônica Pereira Garcia

Brasília, 2012

VANESSA CARVALHO MOREIRA

MÚLTIPLAS INJEÇÕES DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS A BASE DE  
MAGUEMITA RECOBERTAS COM ÁCIDO MESO-2,3-DIMERCAPTOSUCCÍNICO  
EM CAMUNDONGOS: BIOCOMPATIBILIDADE E TOXICIDADE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Ricardo Bentes de Azevedo – (presidente)

Universidade de Brasília

Marcelo Henrique Sousa

Universidade de Brasília

Roseli Kunzel

Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

*Ao meu pai, Walter Maria Moreira (**in memorian**),  
pelo exemplo de caráter e dignidade deixado aos  
filhos como herança.*

*À minha mãe, meu porto seguro. Exemplo que miro  
minha vida e, quem sabe um dia, desejo me tornar  
ao menos parecida.*

*Ao meu irmão, Walter Jr., pelo exemplo de  
paciência e perseverança.*

*À Mariana Marzullo, minha querida amiga e braço  
direito neste trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida, por me fortalecer nos momentos de fraqueza, por me capacitar nos momentos de necessidade, pelas imensuráveis bênçãos, paz e alegria e principalmente por colocar pessoas tão especiais em minha vida.

À minha querida e amada mãezinha e ao meu irmão por todo o apoio, por torcer por mim e compreender minha ausência, por enxugar minhas lágrimas e relevar meu estresse. Sou grata pelo amor incondicional e verdadeiro.

Agradeço de maneira especial ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, pela oportunidade e generosidade ao me receber em seu laboratório. Obrigada pelo conhecimento transmitido, incentivo e confiança no meu trabalho. A você minha eterna gratidão e respeito.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Monica Pereira Garcia, pela indispensável orientação e colaboração durante toda a realização deste projeto. Obrigada pelos valiosos ensinamentos na área de histologia e por estar sempre presente nos momentos necessários.

Ao Prof. Dr. Sacha Braun Chaves, pela paciência e dedicação em me ensinar tudo o que sabe sobre tomografia computadorizada. Obrigada pelo apoio e valiosa transmissão de conhecimento.

Agradeço à professora Emília Celma de Oliveira Lima do Instituto de Química, da Universidade Federal de Goiás, por sintetizar e gentilmente ceder a amostra utilizada nos testes deste trabalho.

À minha amiga e companheira de projeto, Mariana Marzullo Pedreira pela amizade sincera e indescritível ajuda na realização deste projeto. Sem você nada disso seria possível. Meu eterno agradecimento e amizade.

Aos meus queridos amigos, por todas as vezes que disseram: “Calma, vai dar tudo certo!”. Em especial às “MARIAS” (Alice, JuGol, Rafa e Sayo), Ana Paula Carvalho, Andre Ono, Camila Torres e Luiz Henrique Moreira pela amizade, pelos incontáveis momentos de alegria, descontração, apoio e suporte em todos os momentos de desespero. Todos vocês são especiais.

À minha querida amiga Jaqueline Rodrigues, um grande exemplo de dedicação a ser seguido. Agradeço pela atenção, amizade, conselhos, incentivo e por sempre estar disposta a ajudar e a compartilhar seus conhecimentos.

Ao aluno Taynan Santos pela importante ajuda na coleta de macrófagos e com o citômetro de fluxo.

À Maria Luiza Fascineli pelos conselhos e ajuda na análise estatística.

Às queridas Camila Saldanha, Larissa Melo, Ludmila Souza, Maitê Mijan e Victoria Fuentes por todo o carinho e atenção. Obrigada por fazer os dias de trabalho mais prazerosos, felizes e divertidos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Beatriz Ma, Diego Iocca, Graziella Joanitti, João Paulo Longo, Juliana Braz, Juliana de Oliveira, Karen Rapp, Khéllida Loiane, Luciana Oliveira, Luis Muehlmann, Patrícia, Renata Carvalho, Sebastian Biswaro e Wilson Peternele. Obrigada pela ajuda, pelo carinho, conselhos, conversas e pelos agradáveis momentos que passei no laboratório.

À Livia Matos pelas trocas de conhecimento sobre tomografia computadorizada.

Aos alunos Camilo e Frederico pela ajuda na coleta de órgãos e Fernanda Burler pela contribuição na confecção das lâminas histológicas e morfometria.

Ao Antônio Djalma Santos que pacientemente me ensinou as técnicas de histologia e os pequenos detalhes necessários para a obtenção de excelentes cortes histológicos. Muito obrigada!

À Dona Zélia Madeira, que com sua extrema competência torna tudo tão simples e fácil para nós no laboratório. Sua ajuda é imprescindível.

A todos os funcionários da Pós-Graduação em Ciências da Saúde que nunca mediram esforços para ajudar no que fosse preciso.

Ao INCT e Capes, pelo auxílio financeiro durante a realização deste projeto.

E a todos aqueles que mesmo não acompanhando de perto o meu trabalho, torceram para mais uma conquista em minha vida.

*"Sei que o meu trabalho é uma gota no oceano, mas  
sem ele, o oceano seria menor."*

*(Madre Teresa de Calcutá)*

## RESUMO

A nanotecnologia representa, atualmente, uma área de grande interesse. Materiais nanoestruturados, como as nanopartículas magnéticas (NPMs) são uma ferramenta promissora para várias aplicações biomédicas como, por exemplo, sistemas entregadores de drogas, agente de contraste em imagem de tomografia computadorizada e ressonância magnética. No entanto, é necessário avaliar os efeitos causados por múltiplas administrações destas nanopartículas, para que estas possam se tornar uma ferramenta segura e amplamente utilizada. Desta forma, este trabalho tem o intuito de avaliar a biocompatibilidade e toxicidade de nanopartículas magnéticas a base de maguemita recobertas com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (NPMs-DMSA), após múltiplas injeções endovenosas, em camundongos Swiss macho. Para atingir este objetivo, 100  $\mu\text{L}$  de NPMs-DMSA contendo cerca de  $2,78 \times 10^{15}$  partículas/mL foram administrados a cada 15 dias até completar um período total de 45 dias, sendo eutanasiados 90 dias após o início da administração de NPMs-DMSA. Nos tempos de 30, 45, 60 e 90 dias os animais foram submetidos à microtomografia computadorizada. O tamanho e o potencial de carga de superfície das NPMs foram estudados e apresentaram diâmetro médio de 8 nm e carga negativa (- 53,7 mV). A análise dos animais no microtomógrafo mostrou que as nanopartículas magnéticas não causaram alterações pulmonares visíveis e nem promoveram diferença significativa entre as densidades do pulmão. Após 90 dias do início da aplicação de múltiplas injeções de NPMs-DMSA testes hematológicos e bioquímicos realizados no sangue não mostraram alterações relevantes; a viabilidade de células da medula óssea e peritoneais não foi afetada e a análise histopatológica, por microscópio de luz, revelou a presença de aglomerados de NPMs no rim, pulmão, baço e fígado. Não foram observadas alterações morfológicas nestes órgãos, apenas pequenos nódulos linfocitários perivasculares no rim (não observado nos controles). Os resultados mostraram que múltiplas administrações de NPMs-DMSA não geraram danos ao organismo dos camundongos, sugerindo ser um material biocompatível e com potencial para aplicações biomédicas.

**Palavras chaves:** nanopartículas magnéticas; maguemita; DMSA; múltiplas injeções; biocompatibilidade; toxicidade.

## ABSTRACT

Nowadays, nanotechnology represents an area of increasing interest. Nanostructured materials, such as magnetic nanoparticles (MNPs) are a promising tool for several biomedical applications, for example, drug delivery systems, contrast agent for tomography computed imaging and magnetic resonance. However, it is necessary to evaluate the effects caused by multiple administrations of these nanoparticles, so that they can become a safe and widely used. This way, this study aims to evaluate the biocompatibility and toxicity of maghemite based magnetic nanoparticles coated with meso 2,3-dimercaptosuccinic acid (NPMs-DMSA), after multiple intravenous injections in male Swiss mice. 100  $\mu$ L of NPMs-DMSA containing about  $2,78 \times 10^{15}$  particles/mL were administered every 15 days to complete a total period of 45 days. 90 days after the start of administration of NPMs-DMSA the animals were killed. In experimental times 30, 45, 60 e 90 days, the animals were submitted a microtomography analysis. The particle size and surface charge potencial of MNPs were determined. They presented a mean particle size of 8 nm and a negative surface charge, as determined by measuring the zeta potencial (-53,7 mV). The microtomography analysis showed that the magnetic nanoparticles did not cause lung changes visible neither promoted significant difference between the densities of the lung. After 90 days of the beginning of administration of multiples injections of NPMs-DMSA hematological and biochemical blood tests showed no significant changes; the viability of bone marrow and peritoneal cells was not affected. Histological analysis showed the presence of clusters MNPs in the kidney, lung, spleen and liver. There were no morphological changes in these organs, only small perivascular lymphocytic nodules in the kidney (not observed in controls). The results showed that multiple administration of NPMs-DMSA did not cause damage to the mice organism, suggesting being a biocompatible material with potential for biomedical applications.

**Keywords:** magnetic nanoparticles; maghemite; DMSA; multiple injections; biocompatibility; toxicity.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Delineamento experimental do tratamento dos animais

**Figura 2** - Microtomógrafo Skyscan-1026

**Figura 3** - Esquema da coleção de lâminas histológicas de cada animal

**Figura 4** - Peso corporal médio (g) dos camundongos ao longo do período experimental.

**Figura 5** - Densidade pulmonar, em Unidade de Housfield (HU), dos camundongos ao longo do período experimental.

**Figura 6** - Imagem de tomografia do pulmão de camundongo Swiss após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA.

**Figura 7** - Efeito da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA, após 90 dias, sobre a viabilidade celular das células da medula óssea de camundongos.

**Figura 8** - Efeito da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA, após 90 dias, sobre a viabilidade celular dos macrófagos peritoneais de camundongos.

**Figura 9** - Fotomicrografias de rim de animais após 90 dias do início da aplicação de múltiplas injeções de salina.

**Figura 10** - Fotomicrografias de rim de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA.

**Figura 11** - Fotomicrografias de rim de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de salina e NPMs-DMSA.

**Figura 12** - Fotomicrografias de pulmão de animais após 90 dias da administração de múltiplas injeções de salina.

**Figura 13** - Fotomicrografias de pulmão de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA.

**Figura 14** - Fotomicrografias de pulmão de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA.

**Figura 15** - Fotomicrografias de baço de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de salina e NPMs-DMSA.

**Figura 16** - Fotomicrografias de fígado de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de salina e NPMs-DMSA.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Características do NPMs-DMSA

**Tabela 2** - Tipos de métodos utilizados na análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

**Tabela 3** - Valores hematológicos para amostras controle e experimentais de camundongos Swiss após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA.

**Tabela 4** - Valores das enzimas de origem hepática, renal e ferro sérico para amostras controle e experimentais de camundongos Swiss após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA.

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**°C** - Graus Celsius

**CEMIB/UNICAMP** - Biotério Central da Unicamp

**CEUA** - Comitê de Ética no Uso Animal

**cm** - Centímetro

**DHL** - Desidrogenase láctica

**DMSA** - Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico

**DRX** - Difração de Raio X

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético

**FDA** - Federal Drug Agency

**FITC** - Isotiocianato de Fluoresceína

**FM** - Fluido magnético

**FSC** - Forward Scatter

**g** - Grama

**GC** - Grupo controle

**GE** - Grupo Experimental

**GEM-IB-UnB** - Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília

**GGT** - Gama glutamil transferase

**H&E** - Hematoxilina e Eosina

**HU** - Unidades de Housfield

**IB** - Instituto de Ciências Biológicas

**IP** - Iodeto de propídio

**IQ-UFG** - Instituto de Química de Universidade Federal de Goiás

**kg** - Quilograma

**kV** - Quilovolts

**L** - Litro

**mA** - Miliampere

**MET** - Microscopia Eletrônica de Transmissão

**mg** - Miligrama

**micro-CT** - Microtomografia computadorizada

**ML** - Microscopia de Luz

**mL** - Mililitro

**mm** - Milímetro

**mm<sup>3</sup>** - Milímetro cúbico

**MO** – Medula óssea

**mV** - Milivoltes

**µg** - Micrograma

**µL** - Microlitro

**nm** - Nanômetro

**NPs** - Nanopartículas

**NPMs** - Nanopartículas magnéticas

**NPMs-DMSA** - nanopartículas de maguemita estabilizadas com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico na forma de fluido magnético

**PAMs** - Nanopartículas magnéticas compostas por maguemita revestidas de albumina

**PBS** - Cloreto de sódio tamponada com fosfato

**rpm** - Rotações por minuto

**ROI** - Região de interesse

**SSC** - Side Scatter

**TGO ou AST** - Transaminase oxalacética

**TGP ou ALT** - Transaminase pirúvica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1 NANOTECNOLOGIA .....	3
1.2 NANOPARTÍCULAS .....	4
1.2.1 Aplicações das nanopartículas magnéticas .....	5
1.3 FLUIDO MAGNÉTICO .....	6
1.4 TESTES BIOLÓGICOS .....	8
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>10</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS POR DMSA .....	13
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO NPMS-DMSA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X E POTENCIAL ZETA .....	14
3.3 ANIMAIS .....	14
3.3.1 Grupos experimentais .....	15
3.4 PARÂMETROS CLÍNICOS .....	17
3.5 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA .....	17
3.6 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS .....	18
3.7 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDIO EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA E MACRÓFAGOS PERITONEAIS .....	19
3.8 MICROSCOPIA DE LUZ .....	21
3.8.1 Coloração .....	22
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	23
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NPMs-DMSA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X E POTENCIAL ZETA .....	25
4.2 PARÂMETROS CLÍNICOS .....	25
4.3 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA .....	27

4.4 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS .....	28
4.5 VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA E MACRÓFAGOS PERITONEAIS .....	31
4.6 ANÁLISE DA BIOCMPATIBILIDADE POR MICROSCOPIA DE LUZ.....	33
4.6.1 Avaliação histológica do Rim .....	33
4.6.2 Avaliação histológica do Pulmão .....	38
4.6.3 Avaliação histológica do Baço .....	43
4.6.4 Avaliação histológica do Fígado .....	45
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>71</b>

# 1 INTRODUÇÃO



## 1 INTRODUÇÃO

O uso de nanopartículas (NPs) como ferramenta nas aplicações biomédicas vem promovendo grandes avanços principalmente na área de diagnóstico por imagem e tratamento de doenças, onde as nanopartículas ao serem internalizadas podem ser direcionadas a sítios específicos como fígado, baço, pulmão e rim (1).

Dentre a grande variedade de NPs que vêm sendo produzidas merece destaque as nanopartículas magnéticas (NPMs) de maguemita, que apresentam menor toxicidade ao organismo, podendo ser estabilizadas com diferentes coberturas como citrato, ácido poliaspártico, dextran e principalmente o ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) que devido ao seu menor tamanho contribui para uma melhor bioestabilidade e difusão das NPs na circulação (2). Embora seja uma ferramenta promissora, a utilização de NPMs na biomedicina exige a realização de diversos testes biológicos objetivando avaliar seus efeitos no organismo antes de serem utilizados em seres humanos. Para tanto são realizados testes de toxicidade celular, ressonância magnética, histopatologia, análises hematológicas e bioquímicas, entre outros. Entretanto, em todos os trabalhos produzidos pelo grupo de Nanotecnologia-UnB foram administrados uma única injeção de nanomaterial, ao invés de múltiplas injeções, e dentre os testes nenhum utilizou a técnica de microtomografia computadorizada para acompanhamento longitudinal do experimento, o que torna este trabalho um diferencial.

Desta forma, tendo em vista as possíveis aplicações de NPMs em terapias com administração endovenosa, torna-se importante uma melhor compreensão da resposta do organismo sob exposição crônica através de múltiplas injeções de nanopartículas, visando sua utilização de forma segura como agente de contraste, constituinte de novos fármacos ou como carreador de drogas.

## 1.1 NANOTECNOLOGIA

O termo nanotecnologia foi introduzido pelo engenheiro japonês Norio Taniguchi, para designar uma nova tecnologia que ia além do controle de materiais e da engenharia em microescala (3). A nanotecnologia vem promovendo avanços na ciência e tecnologia mediante a manipulação de propriedades e processos em nível de átomos e moléculas que apresentam características peculiares como tolerância à temperatura, reatividade química, condutividade elétrica, entre outras (4).

A alta relação superfície-volume de materiais em escala nanométrica, os torna interessantes para aplicações em diversos ramos da ciência (5). Na área biomédica, se destaca por apresentar avanços importantes em diagnóstico, terapêutica e bioengenharia. A base de algumas de suas aplicações reside em utilizar o nanomaterial como agente de contraste em diagnóstico por imagem ou até mesmo como vetor para introduzir uma determinada substância ou fármaco no organismo vinculando-o de maneira efetiva e específica a uma parte do corpo do paciente possibilitando um tratamento mais efetivo e com menos efeitos secundários (6).

A nanotecnologia e sua aplicação nas ciências médicas podem resultar em um avanço importante no diagnóstico e tratamento de doenças que constituem um problema atual na morbidade, mortalidade e qualidade de vida da população. Porém, em qualquer caso, o uso da nanotecnologia deve se desenvolver de forma racional e responsável sem se esquecer da relação risco-benefício, já que seus efeitos dependerão das aplicações e finalidade a que são destinadas.

## 1.2 NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas (NPs) são materiais que se apresentam na escala nanométrica (7) podendo ser encontradas na forma de nanopartículas poliméricas, magnéticas, lipossomas, nanotubos de carbono, entre outras. Dentre essas, as nanopartículas magnéticas (NPMs) são de grande interesse por apresentarem considerável capacidade de magnetização e atração por magnetos (8,9).

As partículas magnéticas mais usadas são as ferritas, que tem a composição geral de  $MFe_2O_4$  (com M sendo um metal divalente como níquel, cobalto, manganês, zinco e ferro) incluindo os compostos de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) ou sua forma oxidada, a maguemita ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) que podem apresentar efeitos biológicos diferentes (10). A escolha da maguemita como componente do núcleo das nanopartículas magnéticas utilizadas neste estudo deve-se ao fato de que, por possuírem ferro em seu estado oxidado tendem a ocasionar menos danos ao organismo quando comparados a magnetita (11). Além disso, apresenta característica ferrimagnética à temperatura ambiente (12); alta estabilidade térmica e química (13) e quando em tamanhos entre 4 nm a 10 nm, tornam-se superparamagnéticas a temperatura ambiente (14,15).

Os materiais magnéticos, por apresentarem comportamentos magnéticos variados, são classificados como: diamagnético, paramagnético, superparamagnético e ferrimagnético. As nanopartículas diamagnéticas são aquelas cujo magnetismo tende a cancelar o efeito quando há aplicação do campo magnético externo. Já as nanopartículas paramagnéticas possuem a característica de alinhar os momentos magnéticos dos elétrons na mesma direção do campo magnético externo quando na presença deste. Assim, quando o campo magnético externo cessa, a magnetização também o faz. Por sua vez, as nanopartículas superparamagnéticas possuem o mesmo tipo de comportamento das partículas paramagnéticas, porém com maior intensidade. Por último, os materiais ferrimagnéticos são aqueles que mesmo após a retirada do campo magnético permanecem magnetizadas (16).

### 1.2.1 Aplicações das nanopartículas magnéticas

Dentre as aplicações das NPMs está a magnetohipertermia que consiste no tratamento de massas tumorais associando células cancerígenas e nanopartículas magnéticas (17). Neste método, toda a região de tratamento é submetida a um campo magnético alternado externo, que induz a vibração das NPMs e conseqüentemente aumento de temperatura no tecido adjacente gerando a lise das células tumorais (18). Quando associada à quimioterapia as NPMs podem também intensificar os efeitos da magnetotermocitólise sobre o câncer e, ao mesmo tempo, diminuir a toxicidade sistêmica das drogas utilizadas.

As nanopartículas magnéticas estão sendo utilizadas ainda como agentes de contraste em exames de imagem por ressonância magnética (19) e tomografia computadorizada possibilitando a localização de tumores em estágios precoces de desenvolvimento (20,21). O interesse ocorre devido ao tamanho das nanopartículas, sua elevada área de superfície e aos seus grupos funcionais que permitem a conjugação de múltiplas técnicas de diagnóstico (22).

Outra aplicação das NPMs é seu papel como carreadores de drogas, técnica considerada valiosa por otimizar a condução controlada de drogas ou fármacos a alvos específicos no organismo, empregando-se magnetos externos (23). São utilizados polímeros de ocorrência natural ou sintética (24), nanoemulsões (25) bem como os magnetolipossomos onde as nanopartículas estão contidas em vesículas lipídicas usadas como microcápsulas contendo drogas sensíveis a variáveis controláveis como calor ou pH e conduzidas por magnetos até o local desejado (26). Esta aplicação da nanobiotecnologia possui importância considerável, pois é uma forma de se obter a maximização do efeito da droga, minimizando seus efeitos colaterais.

Apesar das promessas a cerca das nanopartículas é preciso avaliar com mais cuidado suas aplicações biológicas uma vez que ao alcançar a circulação sanguínea, essas nanoestruturas encontram um ambiente complexo com proteínas plasmáticas e células imunitárias (27). Desta forma, a escolha do tipo de nanopartícula a ser utilizada no ramo biomédico deve atentar a quesitos básicos como biodegradabilidade, biocompatibilidade e a via de administração a ser utilizada (28).

### 1.3 FLUIDO MAGNÉTICO

Os fluidos magnéticos (FMs) também chamados de ferrofluidos são sistemas magnéticos coloidais constituídos de nanopartículas magnéticas, com diâmetros variando entre 5 e 15 nm (29) e recobertas por uma camada molecular estabilizante de natureza orgânica ou inorgânica, dispersas em um solvente de caráter orgânico ou inorgânico (30,11).

O tamanho das NPMs e o seu comportamento magnético no fluido permitem que permaneçam em suspensão na forma de entidades isoladas, evitando aglomeração e precipitação na parede dos vasos sanguíneos ou nos tecidos quando administradas em um sistema biológico e sob ação da gravidade. As interações entre as partículas magnéticas e o fluido carreador são tais que se comportam como um sistema homogêneo, onde sob aplicação de um campo magnético a suspensão é deslocada como um todo e não somente as nanopartículas magnéticas (31,30). Entretanto, para manter a estabilidade e biocompatibilidade do sistema é necessário controlar o diâmetro das nanopartículas, a temperatura, o estado químico e presença de carga na superfície, o equilíbrio entre as forças repulsivas e atrativas, e as interações partícula-partícula e partícula-solvente (32,33) além da necessidade de um recobrimento adequado da superfície da nanoestrutura com material biocompatível e que possa ser funcionalizada permitindo o acoplamento de fármacos, anticorpos ou outros componentes (34,35). Tais características explicam o crescente interesse que os FMs têm despertado no meio científico e tecnológico.

Um dos compostos utilizados como cobertura de nanopartículas magnéticas é o ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA). O DMSA é um agente quelante bastante utilizado na desintoxicação de indivíduos expostos a metais pesados como cádmio, chumbo e mercúrio (36). Age aumentando a excreção e reduzindo a toxicidade destes metais que ao se ligarem ao DMSA formam um complexo que é facilmente eliminado da circulação pela urina (37) embora quando administrado em grande quantidade possa causar distúrbios hematopoiéticos, desequilíbrio do metabolismo celular e na síntese de DNA, RNA e proteína (38,39). Seu uso 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 (40).

O DMSA quando utilizado como agente estabilizante de superfície das NPMs tende a torná-las hidrossolúveis, biocompatíveis, altamente bioestáveis e evita a agregação das mesmas (2,41). Ele é capaz de formar complexos fortes com a superfície das nanopartículas (42) e imobilizar moléculas na superfície devido aos seus grupamentos químicos disponíveis. Segundo Auffan *et al*, 2006 (43), os mecanismos de interação do DMSA com as NPMs condicionam a sua estabilidade durante a interação com as células.

Diferenças nas formas com que a estabilidade coloidal é promovida levam a diferentes tipos de FM, tais como os iônicos e os surfactados. Nos FMs iônicos a superfície das partículas é carregada eletricamente, formando uma camada superficial de carga que evita a aproximação entre as partículas por repulsão eletrostática. Já nos FMs surfactados a superfície das partículas magnéticas é coberta por uma camada molecular que acaba por criar uma camada estabilizante, surfactante, que causa repulsão estérica entre partículas mantendo a estabilidade coloidal (30).

## 1.4 TESTES BIOLÓGICOS

A utilização de nanopartículas magnéticas na biomedicina exige a realização de testes toxicológicos preliminares, objetivando avaliar os efeitos das NPs no organismo. Entre os testes estão os estudos de toxicidade aguda, subcrônica e crônica, que visam à análise de efeitos adversos provocados pelas NPMs a curto, médio e longo prazo. Para tanto, são utilizados testes como o do micronúcleo, cometa e principalmente o teste de Anexina V/FITC e Iodeto de propídio. A anexina V quando conjugada ao corante Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) é útil na detecção de células apoptóticas devido à alta afinidade por fosfolipídeos carregados negativamente, como a fosfatidilserina exposta no início do processo apoptótico (44,45). Sua utilização concomitante ao marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio (IP), torna possível verificar as alterações nucleares características dos estágios tardios de apoptose (46) através da citometria de fluxo. O mecanismo ocorre pelo fato de que marcadores de DNA com elevado peso molecular, como iodeto de propídio, não conseguem penetrar na célula intacta devido ao seu tamanho, assim como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática.

Alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos são também ferramentas imprescindíveis na avaliação da biocompatibilidade e toxicidade dos fluidos magnéticos e podem indicar a extensão de possíveis alterações teciduais. Boa parte dos fármacos induz desordens no sistema hematopoiético, e embora possam representar uma fração pequena das reações adversas às drogas, pode diminuir funções vitais como defesa imune, integridade vascular e transporte de oxigênio (47). Outros parâmetros importantes para avaliar a possível toxicidade de nanomateriais são o monitoramento do peso corporal, a ocorrência de letalidade e casos de atividade motora diminuída, atonia e queda de pêlos (48,49).

Para avaliar os efeitos das nanopartículas nos tecidos e conhecer os sítios de deposição e o tempo de permanência no organismo são utilizadas as técnicas de Microscopia de Luz (ML) que possibilita visualizar alterações teciduais como, por exemplo, o estabelecimento de processos inflamatórios e formação de processos fibróticos.

Com o crescente número de modelos de patologia pulmonar utilizando pequenos roedores, há um grande interesse em seguir a progressão da doença e avaliar possíveis alterações em estudos longitudinais. Desta forma, a microtomografia computadorizada tem sido amplamente sugerida como ferramenta para avaliação *in vivo* de diversas patologias bem como para a análise de distribuição de nanopartículas funcionantes como agente de contraste (50,51). A microtomografia computadorizada é um método de diagnóstico rápido, não invasivo e possibilita a visualização de estruturas internas do corpo, produzindo uma imagem bi-dimensional que revela a distribuição espacial destas estruturas, sem a necessidade de eutanásia dos animais (52). Consiste em um método que utiliza feixes finos de raio X captados por um sistema de scanner especial que, aliado a um computador, determina a extensão com que os tecidos absorvem os vários feixes de radiação. Desta forma, a tomografia computadorizada produz imagens em cortes transversais ou fatias das estruturas anatômicas sem superposição de tecidos, o que permite identificar diferentes características teciduais (53,54) de acordo com escala de cinza que relaciona a densidade do material, em Unidades de Housfield, com diferentes tonalidades entre branco, cinza e preto.

Mediante o grande potencial das nanopartículas magnéticas no ramo biomédico, para que as NPMs possam ser utilizadas de forma segura é preciso a realização preliminar de testes de toxicidade, biodistribuição e biocompatibilidade, objetivando o conhecimento de seus efeitos biológicos antes de serem empregados em seres humanos. Nos trabalhos em que a toxicidade é avaliada *in vivo*, os animais são submetidos a apenas uma aplicação de nanopartículas magnéticas. Entretanto, em estudos na fase pré-clínica da avaliação de segurança de novos fármacos é importante a análise do efeito da administração de múltiplas doses do medicamento, a fim de tentar estabelecer as margens de segurança necessárias. Desta forma, este trabalho tem importância na tentativa de determinar os possíveis efeitos de múltiplas aplicações, endovenosas, de nanopartículas magnéticas em camundongos.



## 2 OBJETIVO

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a biocompatibilidade e toxicidade de nanopartículas magnéticas a base de maguemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) recobertas com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), após múltiplas injeções endovenosas, em camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os parâmetros clínicos dos animais submetidos a múltiplas injeções endovenosas de NPMs-DMSA durante todo o período experimental;
- b) Verificar a presença de possíveis alterações pulmonares durante as múltiplas aplicações de NPMs-DMSA, no período de 30 a 90 dias, por meio de microtomografia computadorizada.
- c) Analisar possível comprometimento hepático e renal induzido pelas múltiplas administrações de NPMs-DMSA no organismo, mediante exames bioquímicos, hematológicos e histopatológicos;
- d) Verificar possíveis alterações na concentração de ferro sérico de camundongos após tratamento com múltiplas injeções de NPMs-DMSA;
- e) Avaliar a viabilidade dos macrófagos peritoneais e células da medula óssea após múltiplas aplicações, endovenosa, de NPMs-DMSA por meio de citômetro de fluxo usando o teste de Annexina V-FITC/ Iodeto de Propídeo;
- f) Avaliar, através de análises de microscopia de luz, as possíveis alterações histológicas no pulmão, e baço de camundongos Swiss após múltiplas injeções de NPMs-DMSA;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS POR DMSA (NPMs-DMSA)

Para os testes biológicos foi utilizado um único lote de amostra de fluido magnético contendo nanopartículas de maguemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) estabilizadas pela cobertura com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) em meio aquoso, denominado NPMs-DMSA. O material foi sintetizado e caracterizado no Instituto de Química de Universidade Federal de Goiás (IQ-UFG) e gentilmente cedido pela Dra. Emília Celma de Oliveira Lima.

As características físico-químicas das NPMs-DMSA utilizadas encontram-se detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características das NPMs-DMSA

<b>Características físico-químicas</b>	
Composição das Nanopartículas	Maguemita ( $\gamma\text{Fe}_3\text{O}_3$ )
Solvente	Água
Diâmetro hidrodinâmico	69,7 nm
Potencial Zeta	- 53,7 mV
Concentração de Ferro	1,95 mg/mL
Concentração de Partículas	$2,78 \times 10^{15}$ partículas/mL
Cobertura Estabilizante	Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA)
DMSA	12%
pH	7-7,5
Cor	Marrom Escuro

NPMs-DMSA = nanopartículas de maguemita estabilizadas com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico na forma de fluido magnético.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NPMs-DMSA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X E POTENCIAL ZETA

Para aferir o diâmetro médio das nanopartículas magnéticas e confirmar a natureza cristalina das mesmas foi realizado o método de difração de raios X (DRX), onde a amostra de NPMs-DMSA foi seca em estufa a 120 °C e o pó obtido pulverizado sobre o porta amostra de vidro para a obtenção do difratograma. O experimento foi realizado no Laboratório de Química da Universidade Federal de Goiás, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Emília Celma de Oliveira Lima e sua equipe, utilizando um difratômetro Shimadzu modelo XRD 6000, com radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=1,54056$ ), 40 kV e 30mA.

O potencial zeta foi determinado em aparelho analisador de partículas pelos métodos de difração a laser e mobilidade eletroforética por meio do equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). A amostra de NPMs-DMSA foi diluída 200 vezes em água destilada, visando uma melhor aferição do material, e submetida a sete medidas de carga de superfície sendo utilizadas como resultado final a média dos dados obtidos.

### 3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 15 camundongos *Swiss* machos, não-isogênicos, de aproximadamente três semanas de vida e peso corporal médio de 45 $\pm$ 4 g provenientes do Biotério Central da Unicamp (CEMIB/UNICAMP). Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (GEM-IB-UnB), com temperatura controlada ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro/escuro de 12 horas e fornecimento de água potável e ração *ad libitum*.

Nesta pesquisa as normas éticas definidas pela Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, foram atendidas e o referido trabalho avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (Anexo 1).

### 3.3.1 Grupos experimentais

Os animais foram separados em dois grupos:

- a) **Grupo controle** (GC) (n=5) – Cada animal recebeu uma dose de 100 µL de soro fisiológico, via endovenosa caudal, a cada 15 dias até completar um período total de 45 dias. Antes de cada dose, os animais eram submetidos à tomografia computadorizada, nos tempos de 30, 45, 60 e 90 dias após o início do tratamento quando então foram eutanasiados (Figura 1).
  
- b) **Grupo Experimental** (GE) (n=10) - Cada animal recebeu uma única dose de 100 µL de NPMs-DMSA puro ( $2,78 \times 10^{15}$  partículas/mL), via endovenosa caudal, a cada 15 dias até completar um período total de 45 dias. Antes de cada dose, os animais eram também submetidos à tomografia computadorizada, nos tempos de 30, 45, 60 e 90 dias após o início do tratamento quando então foram eutanasiados (Figura 1).

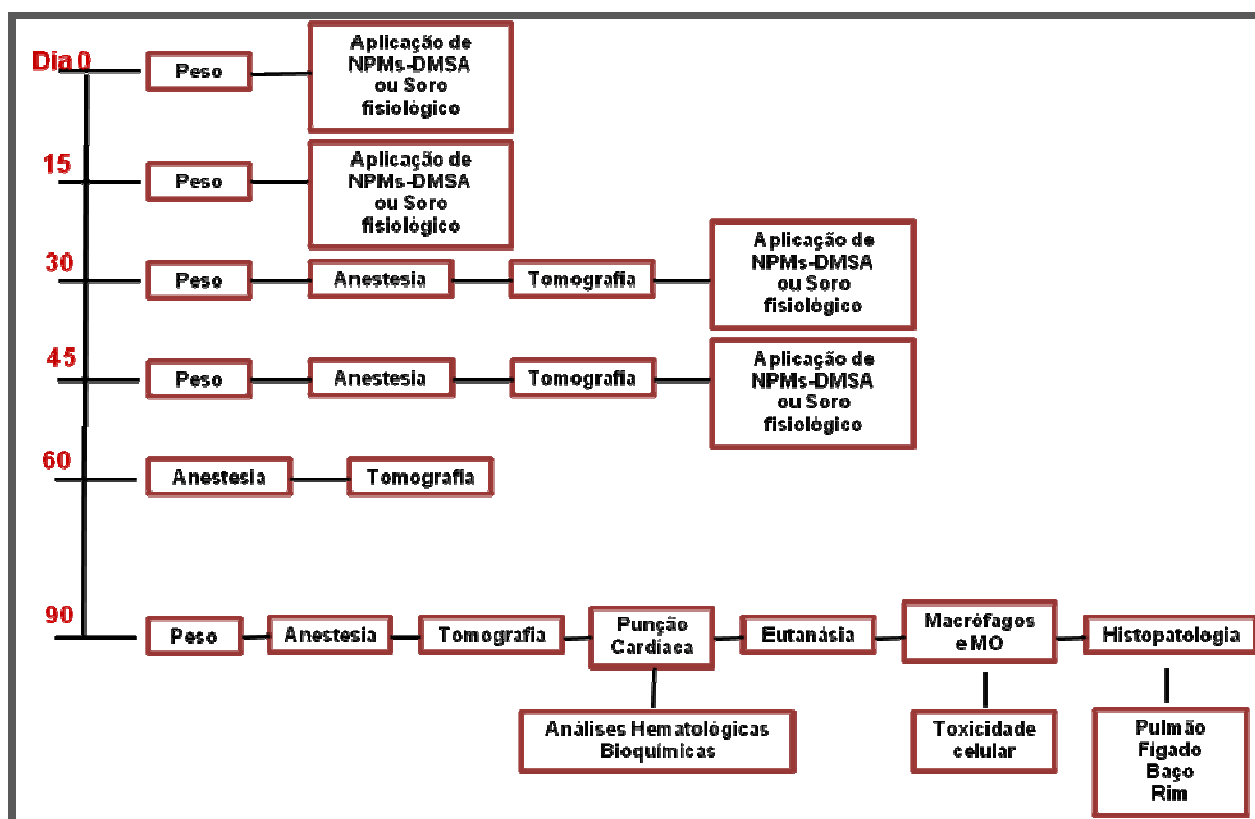


Figura 1 Delineamento experimental do tratamento dos animais

Visando uma melhor qualidade de aplicação e segurança de que os animais não morreriam pelas múltiplas injeções padronizou-se a administração de forma que, em cada injeção eram escolhidas veias diferentes da cauda do animal. Segundo a literatura (55), o tempo de restabelecimento da veia é de 15 dias, o que assegurava a integridade do local perfurado anteriormente caso fosse necessário repeti-lo.

Antes de cada análise tomográfica, assim como para a coleta de sangue antes da eutanásia, os animais foram anestesiados, via intraperitoneal, com quetamina e xilazina (80 mg / kg do animal e 10 mg / kg do animal respectivamente), com dose final de 0,1 mL/30 g. Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguindo os métodos estabelecidos pela Resolução Nº 18/2004 do Conselho do Instituto de Ciências Biológicas, e então os seguintes materiais biológicos coletados: medula óssea femoral e macrófagos peritoneais para análise de toxicidade; baço, fígado, pulmão e rim para análise histológica por Microscopia de Luz.

### 3.4 PARÂMETROS CLÍNICOS

O peso corporal médio dos grupos foi monitorado a cada quinze dias ao longo do período experimental e todos os animais foram observados diariamente com relação a aspectos como diarreia, hemorragia, vômito, atonia, surgimento de manchas ou queda de pêlo e mortalidade.

### 3.5 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Visando analisar danos pulmonares provenientes das múltiplas injeções de NPMs-DMSA nos camundongos bem como a presença ou acúmulo do material injetado na região pulmonar, os animais foram tomografados quinzenalmente, iniciando 30 dias após o começo das aplicações até completar 90 dias. Em cada tempo foram analisados todos os animais do grupo experimental e escolhidos de forma aleatória dois animais do grupo controle.

Para o procedimento os animais foram anestesiados, conforme descrito no item 3.3.1, e analisados no microtomógrafo Skyscan-1026 (Skyscan, Bélgica) (figura 2). As imagens foram inicialmente padronizadas com água e adquiridas utilizando voltagem de 50 kV, corrente de 180 mA e filtro de alumínio 0,5 mm. Para reconstrução das imagens, foi utilizado ganho máximo de 0,115731HU e os parâmetros mais adequados de *smoothing*, correção de artefatos de anel e correção de *beam-hardening*. Todos os parâmetros de aquisição e reconstrução foram iguais para todas as amostras.

A determinação da densidade pulmonar das diversas imagens obtidas na reconstrução foi feita no software CT-Analyser da SkyScan, versão 1.11.4.2, gerando um histograma em relação ao tempo experimental.





Figura 2 Microtomógrafo Skyscan-1026

### 3.6 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Com o objetivo de avaliar quaisquer danos hepáticos ou renais provenientes da administração contínua de NPMs-DMSA foram coletados, 90 dias após o início das múltiplas injeções, 1 mL de sangue total e divididos em dois tubos Vacutte®, um com anticoagulante EDTA, para realização do hemograma, e o outro com gel separador, para análise bioquímica. Os tubos foram colocados em uma caixa de isopor contendo gelo e no menor tempo possível levados ao laboratório de análises clínicas SABIN.

Para os parâmetros hematológicos foram medidos: número total de eritrócitos e leucócitos, hematócrito e hemoglobina. Já para as análises bioquímicas, foram dosados: alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina, desidrogenase láctica (DHL), creatinina, ferro sérico e níveis de bilirrubina total, bilirrubina direta e indireta. O tipo de método empregado em cada exame está representado na tabela 2.

Tabela 2 - Tipos de métodos utilizados na análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

<b>Parâmetros</b>	<b>Método Empregado</b>
Ferro Sérico	Ferrozine
Desidrogenase Láctica (DHL)	Cinético otimizado U.V
Creatinina	Colorimétrico (Jaffe)
Alanina Aminotransferase (ALT)	Cinético otimizado U.V
Aspartato Aminotransferase (AST)	Cinético otimizado U.V
Gama Glutamil Transferase (GGT)	Cinético colorimétrico
Bilirrubina Total e Frações	Colorimétrico

### 3.7 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDIO EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA E MACRÓFAGOS PERITONEAIS

O teste de viabilidade celular consiste em verificar os efeitos da aplicação de drogas sobre o número de células vivas e mortas. Desta forma, utilizamos Iodeto de Propídio e Anexina V para verificar a viabilidade de macrófagos peritoneais e de células da medula óssea de camundongos.

Após eutanásia por deslocamento cervical, o animal sofreu uma incisão abdominal, mantendo a membrana peritoneal intacta, e com auxílio de uma seringa foi gentilmente injetado no peritônio 10 mL de solução, estéril e gelada, de cloreto de sódio tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2. Após delicada massagem na cavidade peritoneal foram cuidadosamente aspirados, com pipeta Pasteur, aproximadamente 8 mL do lavado em tubos Falcon de 15 mL e este submetido a centrifugação por 3 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 1 mL de tampão de lise de hemácias e novamente

submetido à centrifugação (por três minutos a 2500 rpm). Por fim, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS.

Para coleta de medula óssea após a eutanásia os fêmures foram removidos e as epífises cortadas. Em seguida, a medula óssea foi coletada com a injeção de 1 mL de SFB estéril em uma das aberturas e transferida para um tubo Falcon de 15 mL. O material foi centrifugado por três minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de PBS, tal procedimento foi realizado por duas vezes.

Após a homogeneização de cada suspensão celular, foi determinado o número de células por mL utilizando câmara de Neubauer. Preparou-se, então, para cada tipo celular, dois microtubos de centrifugação contendo igual volume de células (100  $\mu$ L cada). Em um dos microtubos foram adicionados os marcadores, sendo que para macrófagos peritoneais ( $0,1 \times 10^6$  células/mL) foram adicionadas 0,25  $\mu$ L de Anexina-V/FITC e 0,5  $\mu$ L de Iodeto de Propídio (IP) e para as células da medula óssea ( $0,44 \times 10^6$  células/mL) foram adicionados 1,1  $\mu$ L de Anexina-V/FITC e 2,2  $\mu$ L de Iodeto de Propídio (IP). Os microtubos com marcadores foram incubados por 15 minutos no escuro, a 4 °C, enquanto os microtubos somente com a suspensão celular foram levados para análise em Citômetro de fluxo (Cyflow Space, Partec, Alemanha), equipado com laser de argônio que opera no comprimento de onda de 488 nm. A análise da suspensão celular pura foi utilizada como controle da distribuição das células antes da marcação com Anexina V e IP, definindo-se então a região característica em que estas células aparecem no gráfico FSC (*Forward Scatter* - que corresponde ao tamanho das células) x SSC (*Side Scatter* - referente a granulosidade/complexidade citoplasmática das células), em escala logarítima. Após os 15 minutos de incubação, adicionou-se 400  $\mu$ L de tampão Anexina-V 1X as células de ambos os microtubos com marcadores e imediatamente foram analisadas no citômetro de fluxo. Células marcadas por IP, que penetra apenas em células não viáveis, foram detectadas no canal FL1 e as células marcadas com Anexina-V FITC, que reconhece células em estágio apoptótico, detectadas no canal FL2, com emissão de fluorescência na faixa de 560-580 nm.

Por meio do software Partec FloMax, que possibilita análises dos dados obtidos através de imagens na forma de gráficos de histograma ou de dispersão de pontos (*dot plot*), foram definidas janelas de análise (*Gates*) e quadrantes para determinar as regiões em que aparecem as células viáveis e as não viáveis, possibilitando obter a porcentagem de células vivas e mortas por necrose ou apoptose.

### 3.8 MICROSCOPIA DE LUZ

A análise histológica consiste na avaliação das secções obtidas dos órgãos a fim de verificar possíveis alterações morfológicas provocadas pelas múltiplas injeções, como presença de infiltrado inflamatório, espessamento e necrose do tecido.

Após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, a cavidade abdominal foi exposta e os órgãos coletados. Imediatamente após a coleta, fragmentos dos órgãos foram rapidamente lavados em solução salina 0,9% para retirar o excesso de sangue e posteriormente fixados. Um estudo preliminar determinou que os rins e o pulmão são melhores fixados com paraformaldeído tamponado 4% por três horas a temperatura ambiente ou 24 horas a 4 °C, neste estudo optou-se pelo segundo protocolo. Os demais órgãos coletados (baço e fígado) são mais bem fixados com o fixador Davidson (nove partes de solução Davidson estoque – 400 mL de glicerina, 800 mL de formaldeído 37%, 1200 mL de etanol 95%, 1200 mL água destilada - e uma parte de ácido acético glacial (400 mL) durante 24 horas a 4 °C.

Após a fixação, as amostras foram desidratadas com etanol, em uma série de concentrações crescentes (70, 80 e 90%) e três vezes em etanol absoluto. Em seguida, as amostras foram diafanizadas ao serem colocadas em uma solução 1:1 de álcool e xilol por uma hora, seguido por dois banhos em xilol puro de 30 minutos cada. Para a inclusão, o material foi submetido a dois banhos de parafina (Vetec, Alemanha), mantida a 58 °C com duração de uma hora cada. As etapas de

desidratação e inclusão foram realizadas automaticamente no equipamento Histotécnico OMA (DM20, Brasil). Por último, os fragmentos dos órgãos foram emblocados individualmente em parafina com auxílio de formas de metal (3x3 cm<sup>2</sup>) nas quais permaneceram até que a parafina estivesse completamente endurecida.

Dada a solidificação dos blocos, foi utilizado um micrótomo Leica modelo RM2125RT para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Foram feitos cortes semi-seriados definido pela obtenção de uma série de três lâminas (com quatro cortes/lâmina), desprezando-se os 10 cortes seguintes e produzindo uma nova série de três lâminas até que um total de 30 lâminas fosse obtido (figura 3). O material foi montado em lâminas de vidro e mantidas em estufa a 37 °C, por no mínimo quatro horas, para melhor aderência dos cortes nas lâminas e então guardadas em caixas próprias para posterior coloração.

### **3.8.1 Coloração**

Das três lâminas obtidas de cada série de cortes, a primeira foi corada com Hematoxilina e Eosina (H&E), e as duas seguintes guardadas como reserva ou posterior coloração (figura 3). As lâminas selecionadas foram submetidas a um processo de desparafinização e hidratação, com três banhos em soluções de xileno, duas de soluções de etanol 100%, etanol 90%, 80% e 70% sendo todos os banhos com duração de 1 minuto cada. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água, colocadas no corante hematoxilina e posteriormente coradas em eosina (após breve banho em água corrente) sendo os tempos de 1 minuto cada.

Após coloração, o material foi desidratado em uma concentração crescente de etanol 70%, 80%, 90%, 100% (três vezes) e xileno puro (três vezes), geralmente menos de meio minuto nos banhos de etanol, e um minuto no último banho de etanol e nos de xileno. Após o último banho de xileno, as lâminas foram recobertas com lamínulas utilizando-se entellan<sup>®</sup>, e colocadas para secar na estufa, a 37 °C, por 24 horas.

A seguir as lâminas foram analisadas e fotografadas digitalmente em microscópio de luz da marca Leica modelo DM1000 e documentadas digitalmente mediante o uso de câmera Leica DFC280, acoplada ao microscópio, e o software Leica Application SuitZe Version 2.7.0 R1 Copyright 2003-2007, Leica Microsystems Switzerland Limited. De cada grupo de 10 lâminas de cada órgão tanto do grupo experimental quanto controle, foram escolhidas quatro lâminas, uma no início, duas intermediárias e a terceira da parte final da coleção. Dentre os quatro cortes disponíveis na lâmina, optou-se por aquele que apresentava o menor número de artefatos técnicos, como dobras ou falhas nos tecidos causadas, por exemplo, por dentes na navalha de corte. A análise dos agregados de NPMs-DMSA nas secções histológicas foi estabelecida pelo critério de comparação visual.

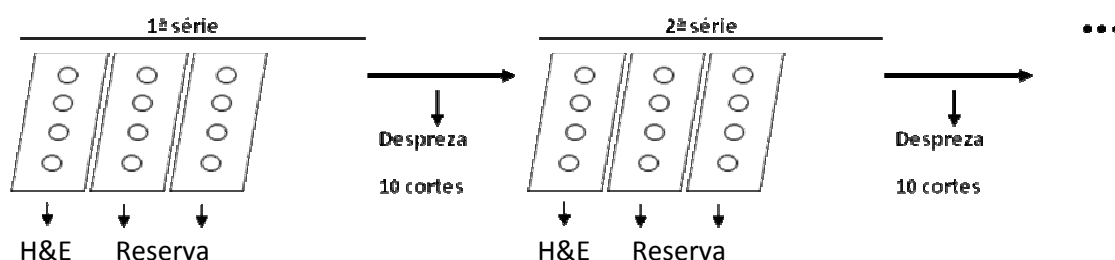


Figura 3 Esquema da coleção de lâminas histológicas de cada animal (Adaptado de Garcia, 2002).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student não-pareado, para comparar a média entre dois grupos independentes, com nível de significância fixado de  $p < 0,05$ , utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism version 3.0. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 4 RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NPMs-DMSA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X E POTENCIAL ZETA

A análise dos diâmetros obtidos por difração de raios X mostrou que as nanopartículas magnéticas da amostra utilizada possuem um diâmetro médio de 8 nm.

Foi determinado por meio do potencial zeta ( $- 53.7 \pm 12.9$  mV), que a carga de superfície das nanopartículas magnéticas é negativa.

A amostra apresentava concentração de ferro de 1,95 m/mL e pH compreendido entre 7-7,5; característico de um pH fisiológico.

### 4.2 PARÂMETROS CLÍNICOS

O peso dos camundongos foi registrado a partir do início do tratamento com a amostra NPMs-DMSA, quando os animais tinham aproximadamente três semanas de idade. O peso médio dos camundongos foi mensurado quinzenalmente ao longo de todo o período experimental e foi possível observar aumento de peso no decorrer do experimento dentro dos grupos, apesar de não haver diferença significativa dentre eles.

Ao compararmos o maior e o menor dos valores obtidos no decorrer do experimento, houve uma variação de 3 g no grupo controle e 6 g no grupo experimental, o que representa em relação ao peso inicial um aumento de 4% e 13%, respectivamente. Vale ressaltar que o grupo controle sofreu uma oscilação na



média de peso nos 30 primeiros dias voltando a aumentar gradativamente nos tempos seguintes, o que indica uma tendência de recuperação (Figura 4).

Alterações clínicas e comportamentais, tais como diarreia, hemorragia, vômito, atonia, surgimento de manchas ou queda de pêlo e óbito, não ocorreram nos animais após tratamento com múltiplas injeções de NPMs-DMSA, assim como no grupo controle.

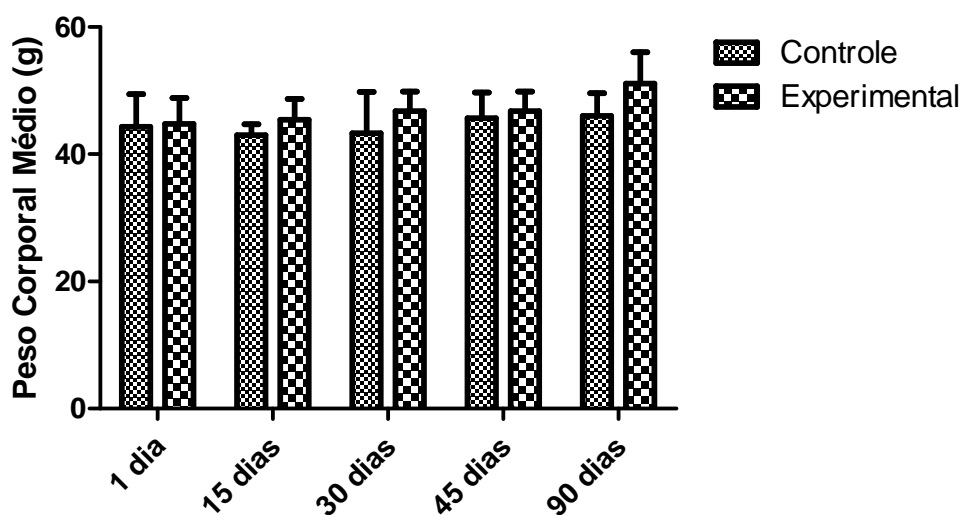


Figura 4 Peso corporal médio (g) dos camundongos ao longo do período experimental. O peso inicial foi determinado no primeiro dia do tratamento dos animais com NPMs-DMSA e solução salina, quando tinham três semanas de idade. Quinzenalmente, os grupos foram pesados até o período máximo de exposição à amostra, que foi de 90 dias.

#### 4.3 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

A análise dos animais no microtomógrafo mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as densidades do pulmão em diferentes tempos, 30, 45, 60 e 90 dias, após múltiplas administrações de NPMs-DMSA, ao confrontar os valores experimentais com o grupo controle (figura 5). A densidade, em unidades de Housfield (HU), apresenta-se em média a  $700 \pm 10$  HU no grupo controle e  $701 \pm 7$  no grupo experimental, durante todo o período analisado.

Não foi observada ao longo do estudo qualquer alteração patológica visível na região pulmonar proveniente das múltiplas injeções (figura 6) e as nanopartículas magnéticas utilizadas, cuja concentração de ferro era de 1,95 g/L, não produziram contraste visível nas imagens observadas, mesmo após múltiplas aplicações.

Vale ressaltar que durante o estudo para uma maior resolução espacial, a imagem foi sincronizada ao ciclo de respiração e nenhuma orientação das nanopartículas foi utilizada.

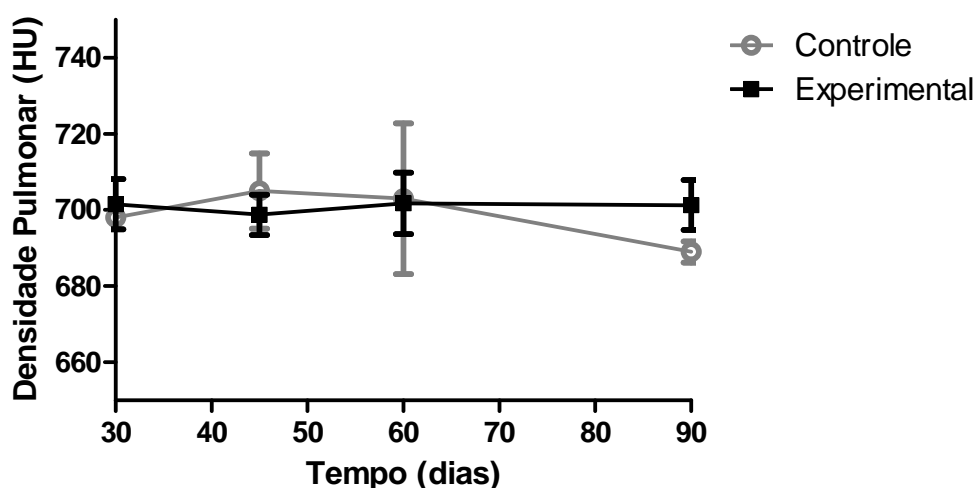


Figura 5 Densidade pulmonar, em Unidade de Housfield (HU), dos camundongos ao longo do período experimental. A densidade inicial foi calculada após 30 dias do início das aplicações de múltiplas injeções de NPMs-DMSA. Quinzenalmente, os grupos foram analisados até o período máximo de 90 dias. Não há mudança significativa nos dados a medida que o tempo aumenta e após as múltiplas injeções de NPMs-DMSA.



Figura 6 Imagem de tomografia do pulmão de camundongo Swiss após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA.

#### 4.4 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Visando determinar possíveis alterações hepáticas e/ou renais, bem como processo inflamatório e comprometimento do sistema imune no organismo dos camundongos após múltiplas injeções de NPMs-DMSA, foram realizados exames hematológicos e bioquímicos dos animais no tempo experimental de 90 dias.

Nos exames hematológicos ao analisar os resultados do eritrograma e leucograma (tabela 3) observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa, ao confrontar os valores experimentais com o grupo controle. Além disso, os valores obtidos em ambos os grupos estão dentro dos intervalos de referência.

Nos exames bioquímicos ao analisar os resultados das diferentes enzimas hepáticas, renais e ferro sérico observou-se que também não houve diferença estatisticamente significativa, ao confrontar os valores experimentais com o grupo controle (tabela 4). Da mesma forma, os valores obtidos em ambos os grupos estão dentro dos intervalos de referência.

Tabela 3 - Valores hematológicos para amostras controle e experimentais de camundongos Swiss após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA.

	<b>Controle*</b> (n=5)	<b>Experimental*</b> (n=9)	<b>Referência**</b> (n=20)
<b><u>Eritrograma</u></b>			
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	9 ± 1	7 ± 3	
Hemoglobina (g/dL)	13 ± 2	12 ± 3	12,6-16,2
Hematócrito (%)	43 ± 5	32 ± 15	36-48
<b><u>Leucograma</u></b>			
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	1,0 ± 0,4	1,4 ± 2,6	
Linfócitos (%)	54 ± 5	50 ± 24	52 a 86
Neutrófilos (%)	33 ± 12	49 ± 27	10 a 40
Eosinófilos (%)	4 ± 3	2 ± 2	0 a 2
Basófilos (%)	1 ± 1	2 ± 2	0 a 2
Monócitos (%)	9 ± 10	4 ± 5	0 a 8

Na tabela estão representados os valores de média ± desvio padrão.

Os dados foram avaliados utilizando-se o teste-t não paramétrico, considerando-se significativo  $p < 0,05$ .

\* Exames realizados no laboratório SABIN-DF.

\*\* Valores de referência obtidos do Laboratório Internacional Charles River (EUA).

Tabela 4- Valores das enzimas de origem hepática, renal e ferro sérico para amostras controle e experimentais de camundongos Swiss após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA.

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle*</b> (n=5)	<b>Experimental*</b> (n=5)	<b>Referência**</b> (n=20)
Desidrogenase Láctica (U/L)	1280 ± 559	1173 ± 686	
Creatinina (mg/dL)	0,2 ± 0,1	0,1	0,2-0,8
Aspartato Aminotransferase (AST) (U/L)	144 ± 39	245 ± 187	24-472
Alanina Aminotransferase (ALT) (U/L)	40 ± 11	37 ± 11	28-190
Gama Glutamiltransferase (GGT) (U/L)	1	1	
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,1	0,1	0,1-0,3
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,04 ± 0,05	0,09 ± 0,06	
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,06 ± 0,05	0,02 ± 0,04	
Ferro Sérico (µg/dL)	170 ± 9	158 ± 69	187-411

Na tabela estão representados os valores de média ± desvio padrão.

Os dados foram avaliados utilizando-se o teste-t não paramétrico, considerando-se significativo  $p < 0,05$ .

\* Exames realizados no laboratório SABIN-DF.

\*\* Valores de referência obtidos do Laboratório Internacional Charles River (EUA).

#### 4.5 VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA E MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Para avaliar os efeitos das múltiplas aplicações de NPMs-DMSA sobre a viabilidade das células da medula óssea e em macrófagos peritoneais, as amostras coletadas foram analisadas por citometria de fluxo, após marcação com anexina-V/FITC e Iodeto de Propídio, conforme protocolo já descrito na metodologia.

A análise por citometria de fluxo mostrou que não há citotoxicidade de NPMs-DMSA sobre as células da medula óssea colhidas dos animais do grupo experimental, tendo causado a morte de apenas cerca de 20% das células. A via de morte celular predominante em ambos os grupos foi a apoptose, sendo que em ambos os grupos esta via representou 99% das células mortas (figura 7).

A citotoxicidade das NPMs-DMSA sobre os macrófagos peritoneais foi ainda menor, tendo causado a morte de menos de 4% das células. Desta forma, a diferença da porcentagem de células vivas entre os grupos controle (96%) e experimental (96%) não foi significativa. A via de morte celular predominante foi a apoptose em ambos os grupos, sendo que no grupo experimental esta via correspondeu a 89% das células mortas e no grupo controle correspondeu a 96% (figura 8).

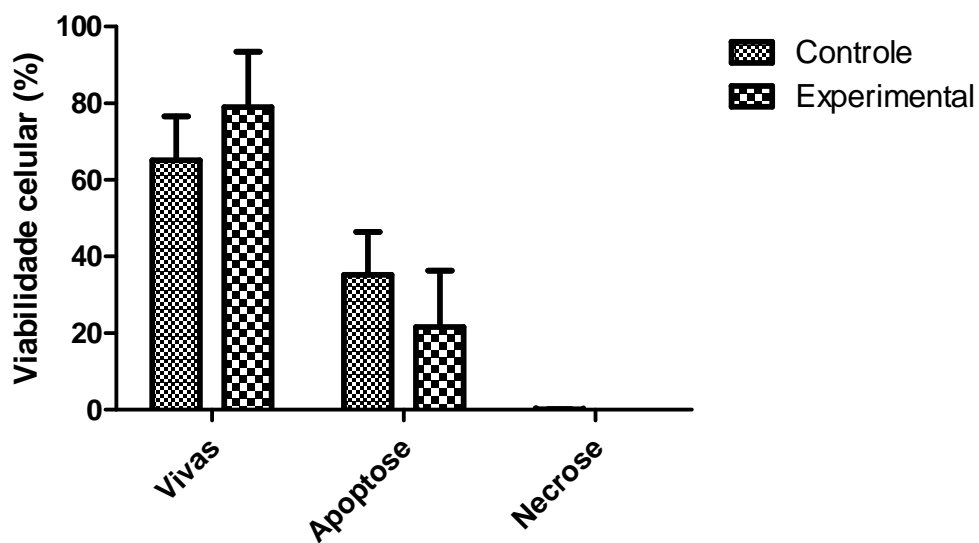


Figura 7 Efeito da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA, após 90 dias, sobre a viabilidade celular das células da medula óssea de camundongo.

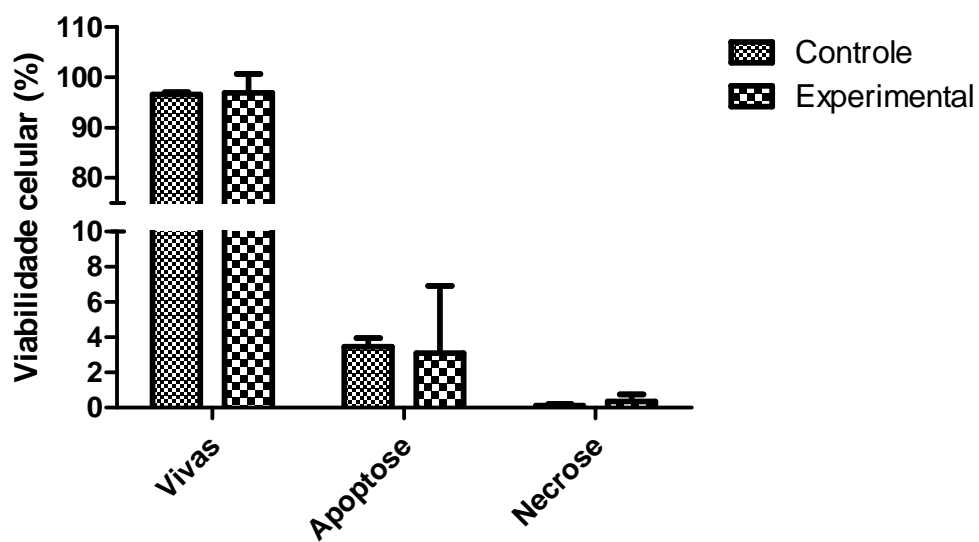


Figura 8 Efeito da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA, após 90 dias, sobre a viabilidade celular dos macrófagos peritoneais de camundongos.

## 4.6 ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE POR MICROSCOPIA DE LUZ

O estudo da biocompatibilidade por meio da microscopia de luz é uma ferramenta importante para a visualização da resposta do organismo frente à presença de nanopartículas, evidenciando infiltrados de células inflamatórias, alterações morfológicas no espessamento ou redução de parede do órgão ou tubulações, como vasos sanguíneos; hiperplasia, entre outras alterações. Desta forma, foram analisados a biocompatibilidade de nanopartículas de maguemita estabilizadas com DMSA, após múltiplas injeções, em órgãos vitais como rim, pulmão, fígado e baço.

### 4.6.1 Avaliação histológica do Rim

Os animais submetidos a múltiplas injeções de salina apresentaram a morfologia do rim visualmente inalterada, com zona cortical e medular de aspecto normal (figura 9A) e cápsula conjuntiva de espessura adequada. A figura 9B mostra detalhe da região cortical com corpúsculo renal contendo o glomérulo de tamanho adequado assim como o espaço sub-capsular inalterado. A cápsula de Bowman, de epitélio pavimentoso simples evidente (seta azul). De acordo com a normalidade, há predominância de túbulos contorcidos proximais de epitélio cúbico simples e abundância de microvilosidades dando aspecto de luz pouco evidente. Os túbulos contorcidos distais, em minoria, apresentam epitélio cúbico simples, facilmente caracterizados pela aproximação de seus núcleos celulares e a clareza de seus lúmens. Não há retração e nem a formação de vacúolos. Na região medular há presença de túbulos coletores de epitélio cúbico simples e núcleos esféricos centrais e limites celulares evidentes (dados não mostrados).



A análise histopatológica de rim mostrou que este foi o órgão que mais apresentou aglomerados de nanopartículas magnéticas em suas estruturas. Entretanto, seu aspecto geral mostrou padrão semelhante ao encontrado no grupo controle.

Dos nove animais analisados apenas sete apresentaram nanopartículas visíveis em todo parênquima, com frequência maior no córtex do que na medula (figura 10A). Visualmente, dos sete animais seis apresentaram igual quantidade de nanopartículas distribuídos no parênquima renal, raramente formando pequenos agregados, porém em um animal a quantidade era bem maior (figura 10B).

Em todos os animais em que foram encontrados aglomerados de nanopartículas magnéticas a sua ocorrência no córtex renal foi principalmente na parede dos túbulos contorcidos distal e proximal (figura 10B). Em menor quantidade foi observado NPMs-DMSA associado ao glomérulo (figura 10B) e no conjuntivo intersticial (figura 10C). No entanto, em nenhuma das localizações citadas houve alterações morfológicas como espessamento, fibrose, acúmulo linfocitário ou mudança na histologia dos túbulos.

A figura 10D mostra um grande acúmulo de NPMs-DMSA na musculatura lisa de pequenos vasos, principalmente arteríolas. Porém não foi observada a presença de NPMs-DMSA na luz do vaso ou associado às hemácias. Não foram encontradas nanopartículas magnéticas na cápsula do órgão tanto no conjuntivo (dados não mostrados) quanto no infiltrado de tecido adiposo (figura 10E).

Em todos os animais em que foram encontradas nanopartículas magnéticas observou-se pequenos nódulos linfocitários perivascular (figura 11B e 11C). Quase sempre os nódulos estavam adjacentes a musculatura lisa do vaso a qual apresentava nanopartículas magnéticas acumuladas, porém raramente foram observadas NPMs-DMSA associadas aos linfócitos como observado no destaque da figura 11B e 11C. Em nenhum animal controle foi observado a ocorrência destes focos inflamatórios perivasculares (figura 11A).

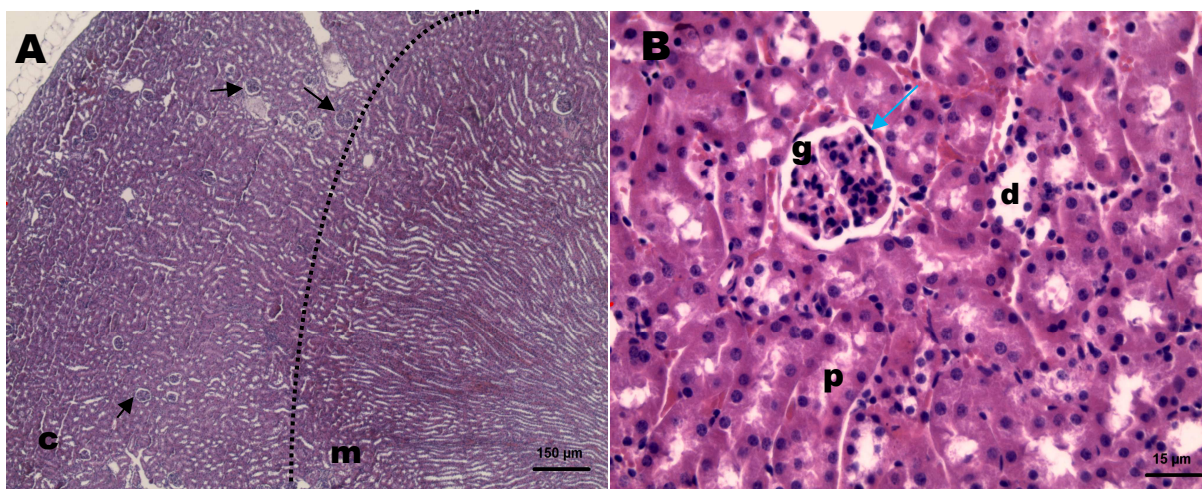


Figura 9 Fotomicrografias de rim de animais após 90 dias do início da aplicação de múltiplas injeções de salina. **A:** visão geral mostrando morfologia normal do parênquima renal. A linha tracejada delimita zona cortical (c) e medular (m). As setas indicam os corpúsculos renais. **B:** detalhe da região cortical com presença de um corpúsculo renal com seu glomérulo (g) e o folheto parietal da cápsula de Bowman (seta azul). Presença de túbulos contorcidos distais (d) e túbulos contorcidos proximais (p). Coloração: H&E

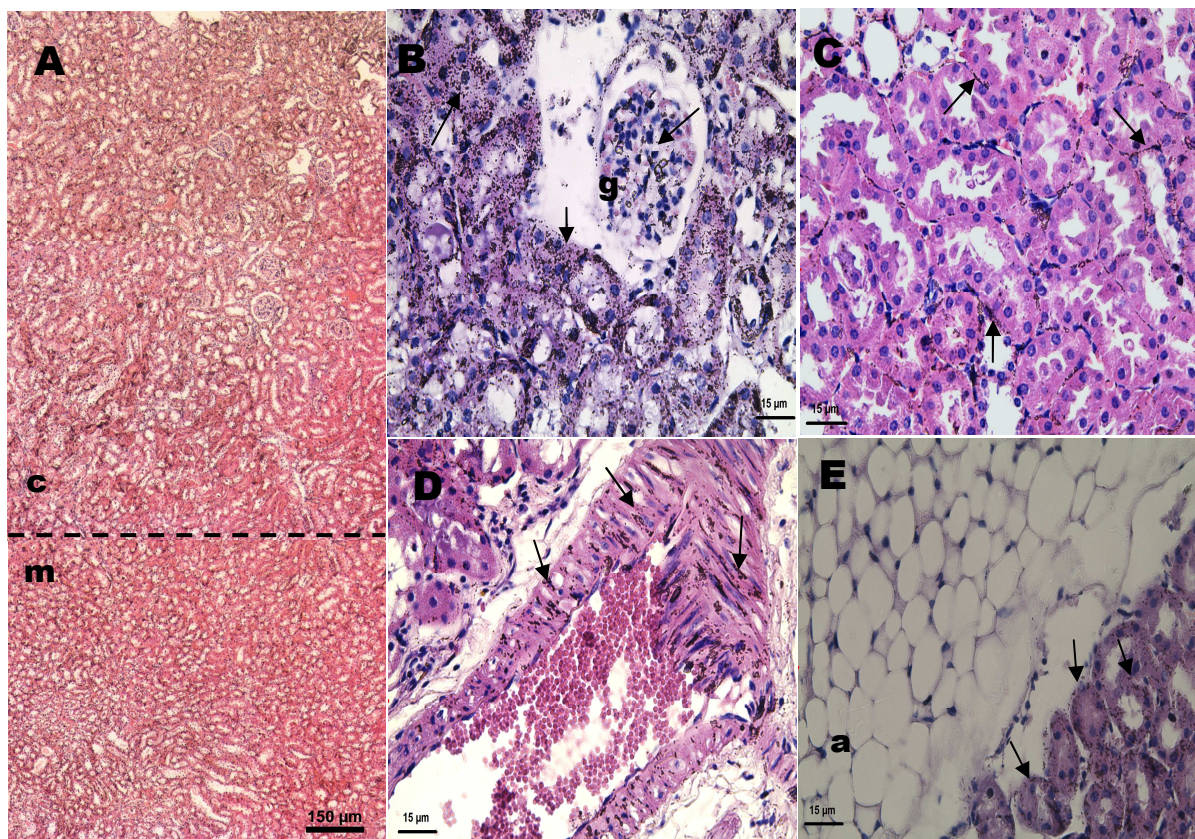


Figura 10 Fotomicrografias de rim de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA. **A:** visão geral mostrando que o parênquima manteve sua morfologia normal. A linha tracejada delimita zona cortical (c) e medular (m). **B:** nanopartículas magnéticas distribuídas no parênquima renal e nos túbulos contorcidos distais e proximais. Glomérulo com presença de nanopartículas (g). **C:** nanopartículas magnéticas presentes no tecido conjuntivo intersticial. **D:** nanopartículas magnéticas acumuladas na musculatura lisa do vaso. **E:** ausência de nanopartículas magnéticas no tecido adiposo (a). (as setas indicam as nanopartículas magnéticas). Coloração: H&E

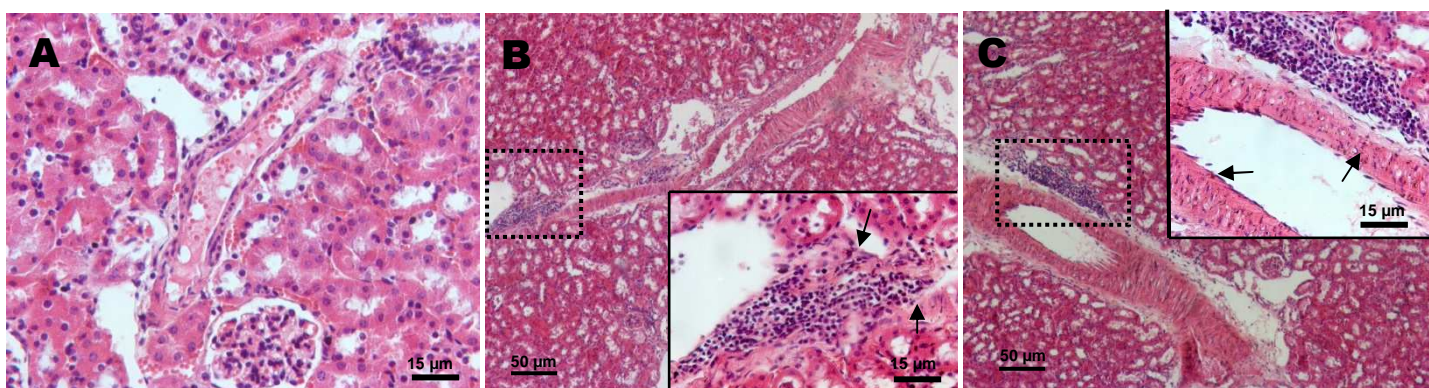


Figura 11 Fotomicrografias de rim de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de salina (A) e NPMs-DMSA (B e C). **A**: visão geral mostrando morfologia normal do parênquima e ausência de foco inflamatório perivascular no grupo controle. **B**: nanopartículas magnéticas na região perivascular, porém não associadas ao nódulo linfocitário. O quadrante delimita a área que foi ampliada em B. **C**: nódulos linfocitários perivascular com nanopartículas magnéticas distribuídas na musculatura lisa do vaso. O quadrante delimita a área que foi ampliada em C. (as setas indicam as nanopartículas). Coloração: H&E

#### 4.6.2 Avaliação histológica do Pulmão

Os animais submetidos a múltiplas injeções de salina apresentaram morfologia pulmonar visualmente inalterada, com capilares e vasos exibindo calibre normal contendo hemácias, bronquíolos de aspecto e tamanho normais com epitélio pseudo-estratificado ou cilíndrico simples ciliado, passando a cúbico simples. Espaços alveolares não colabados, com parede constituída por uma camada epitelial fina apoiada a um tecido conjuntivo, e sem qualquer espessamento de septos interalveolares ou processo inflamatório evidente (figura 12A e 12B). Há presença comum de focos linfocitários na bifurcação da árvore brônquica o que não deve ser confundido com processos inflamatórios (figura 12C e 12D).

Após 90 dias do início da aplicação de múltiplas injeções de NPMs-DMSA o pulmão foi o segundo órgão a apresentar maiores quantidades de nanopartículas. Entretanto, o seu aspecto morfológico geral mostrou padrão semelhante ao encontrado no grupo controle (figura 13A).

Todos os nove animais analisados apresentaram nanopartículas magnéticas visíveis na forma de pequenos agregados difusos no parênquima pulmonar, principalmente nos septos interalveolares, sendo que em dois animais a quantidade era visivelmente maior (figura 13F). Um segundo padrão de distribuição foi observado em alguns animais, que foi a ocorrência, com menor frequência, como agregados maiores e pontuais ainda nos septos interalveolares (figura 13C e 13E). Em todos os animais foram observados nanopartículas na parede de bronquíolos (figura 13B), especialmente associado a células epiteliais bronquiolares (figura 13D).

Outras localizações das nanopartículas pouco recorrentes foram na forma de intensos aglomerados adjacentes a bronquíolos (figura 14A), assim como na região perivascular (figura 14B); também de forma escassa próximas a nódulos linfocitários (figura 14C), comuns na bifurcação da árvore brônquica, como observados no grupo controle (figura 12C e 12D).

Ao longo da análise das lâminas histológicas em um animal foi observada uma alteração morfológica na parede de vasos sanguíneos associada a presença das nanopartículas. Ela se mostra como uma expansão da massa conjuntiva subendotelial (figura 14D), na região da túnica íntima dos vasos. Provavelmente trata-se de uma trombose, ou seja, componentes celulares do sangue formam uma massa, um trombo, dentro do sistema vascular, causando um retardo ou até mesmo cessando o fluxo sanguíneo, podendo causar mudanças na parede do vaso (56).

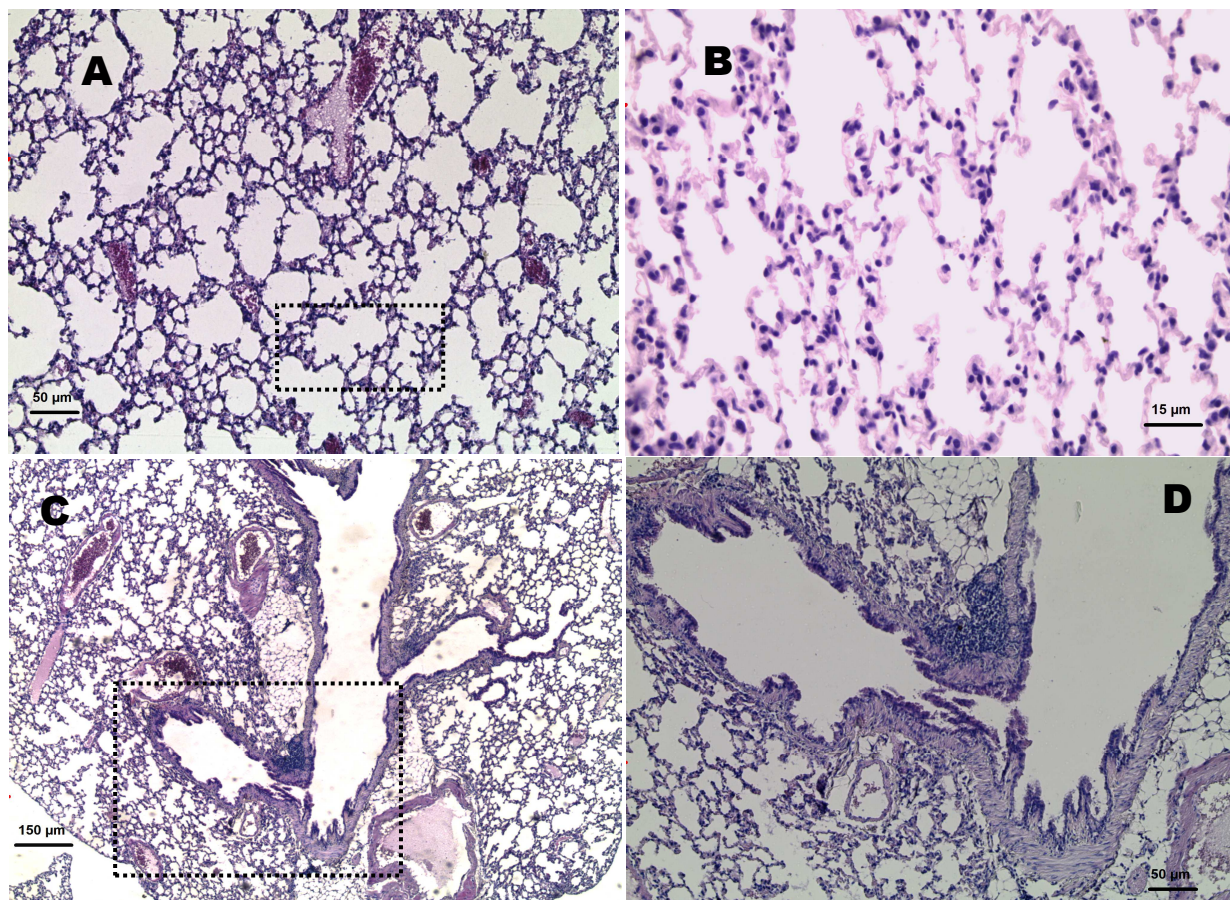


Figura 12 Fotomicrografias de pulmão de animais após 90 dias da administração de múltiplas injeções de salina. **A:** visão geral mostrando morfologia normal do parênquima. O quadrante delimita área que foi ampliada em B. **B:** parênquima pulmonar com espaços alveolares não colabados e sem espessamento de septos interalveolares. **C:** ramificação bronquiolar com focos linfocitários. O quadrante delimita a área que foi ampliada em D. **D:** focos linfocitários, de ocorrência comum, na bifurcação da árvore brônquica. Coloração: H&E

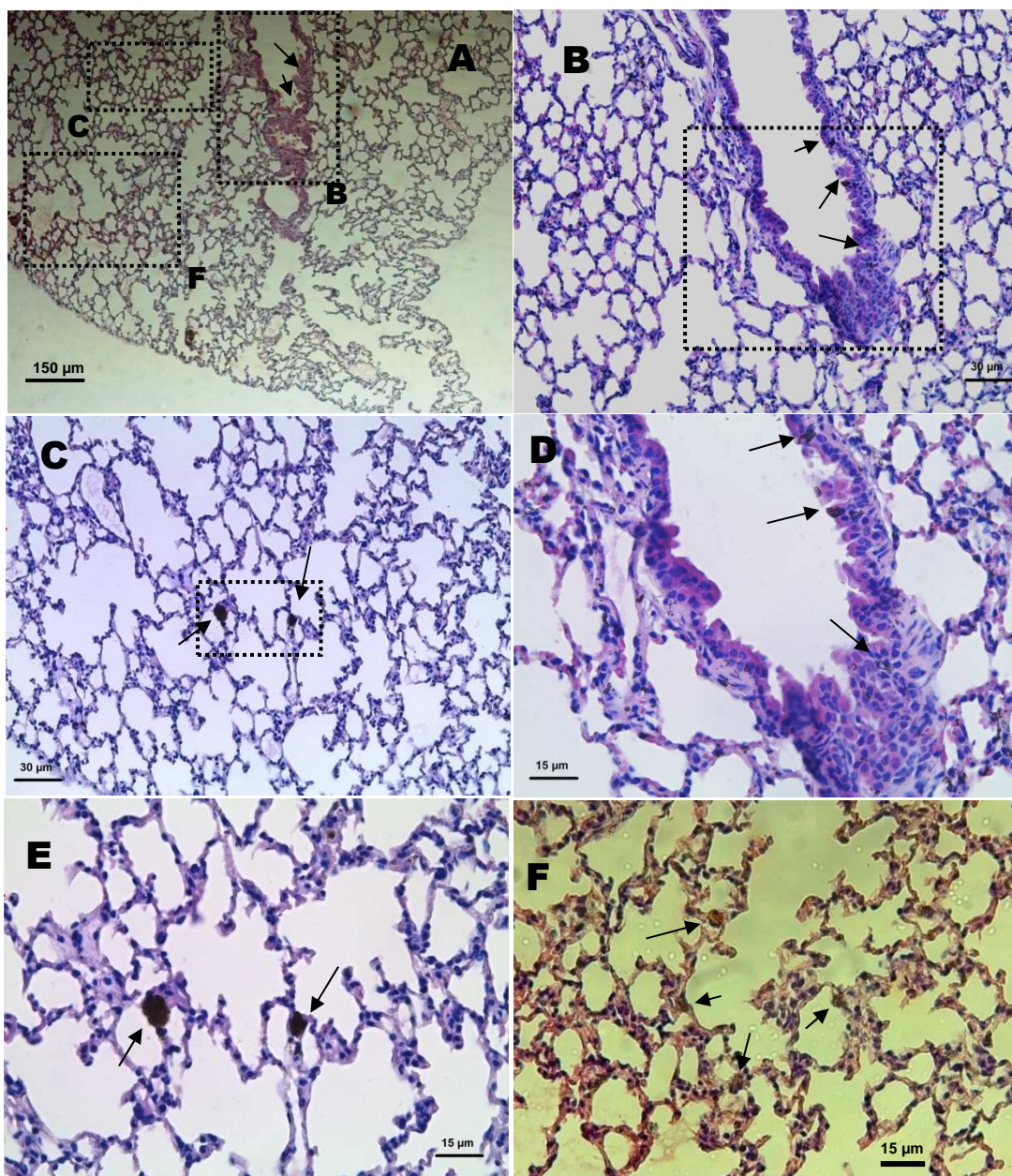


Figura 13 Fotomicrografias de pulmão de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA. **A:** visão geral mostrando morfologia do parênquima inalterada. Os quadrantes delimitam áreas que foram ampliadas em B, C e F. **B:** nanopartículas magnéticas na parede de bronquíolo. O quadrante delimita a área que foi ampliada em D. **C:** nanopartículas magnéticas distribuídas como grandes agregados no parênquima. O quadrante delimita a área que foi ampliada em E. **D:** nanopartículas magnéticas associadas a células epiteliais bronquiolares. **E:** nanopartículas magnéticas agregadas nos septos interalveolares. **F:** nanopartículas magnéticas difusamente distribuídas como pequenos agregados nos septos alveolares. (as setas indicam as nanopartículas magnéticas). Coloração: H&E



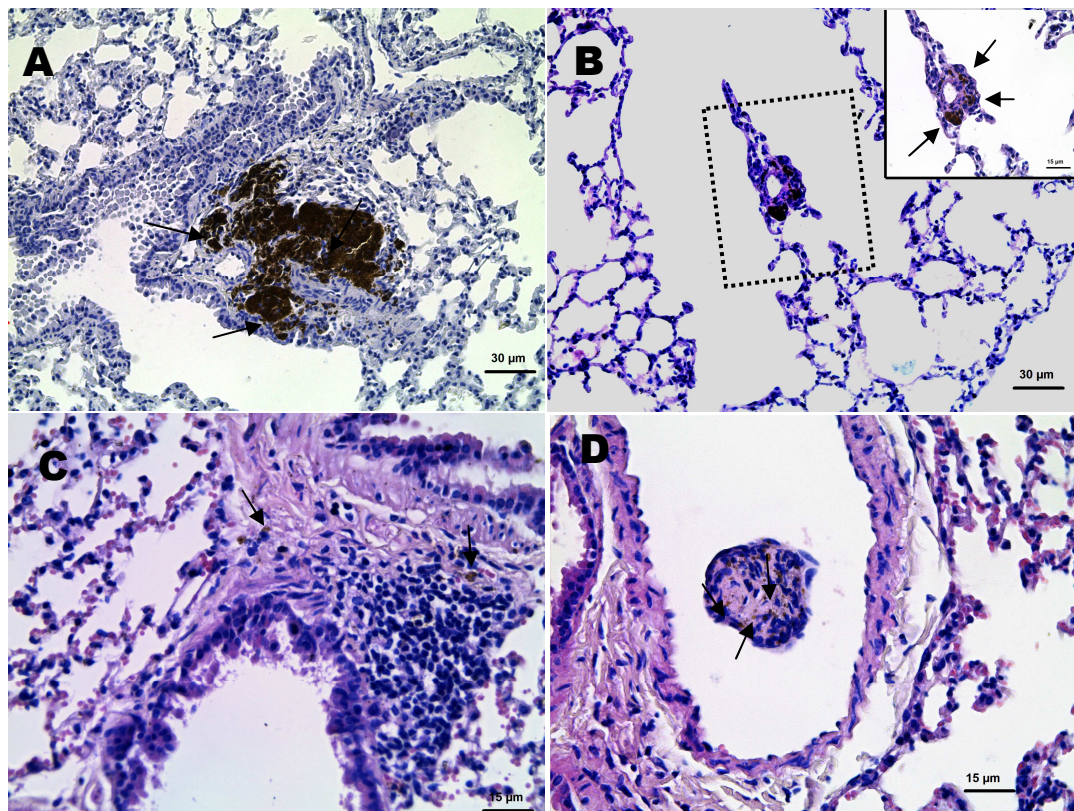


Figura 14 Fotomicrografias de pulmão de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA. **A:** nanopartículas magnéticas adjacentes a bronquíolos. **B:** nanopartículas magnéticas na região perivascular. O quadrante delimita área que foi ampliada em B. **C:** nanopartículas magnéticas próximas a nódulos linfocitários. **D:** expansão da massa conjuntiva subendotelial dos vasos (trombo), com nanopartículas magnéticas associadas. (as setas indicam as nanopartículas). Coloração: H&E

### 4.6.3 Avaliação histológica do Baço

Os animais submetidos a múltiplas injeções de salina não apresentaram quaisquer alterações histológicas no baço. A polpa branca, constituída por nódulos linfáticos (figura 15A - estrela), foi claramente diferenciada da polpa vermelha, rica em glóbulos brancos. Na polpa vermelha as estruturas estavam íntegras com os cordões esplênicos separados por sinusóide revestido por células endoteliais alongadas (figura 15A). É visível, principalmente na polpa vermelha, a presença do ferro endógeno como dispersas manchas amorfas de cor marrom clara (figura 15B - seta branca).

Após 90 dias do início da aplicação de múltiplas injeções de NPMs-DMSA o baço apresentou quantidade de nanopartículas magnéticas aparentemente bastante reduzido. A distinção entre o ferro endógeno e as nanopartículas, ambas de coloração marrom, se deu pela forma em pequenas esferas brilhantes das nanopartículas (figura 15D) em comparação ao aspecto amorfo do ferro endógeno (figura 15B). O aspecto morfológico geral do baço no grupo experimental (figura 15C) mostrou padrão semelhante ao encontrado no grupo controle com polpa branca e polpa vermelha bem preservadas.

Todos os nove animais analisados apresentaram de pouca a média quantidade de pequenos aglomerados marrons dispersos no parênquima esplênico. A ocorrência das NPMs-DMSA foi predominantemente na polpa vermelha (figura 15E) e com baixa freqüência foram observadas algumas poucas esferas brilhantes associadas a polpa branca (figura 15F).

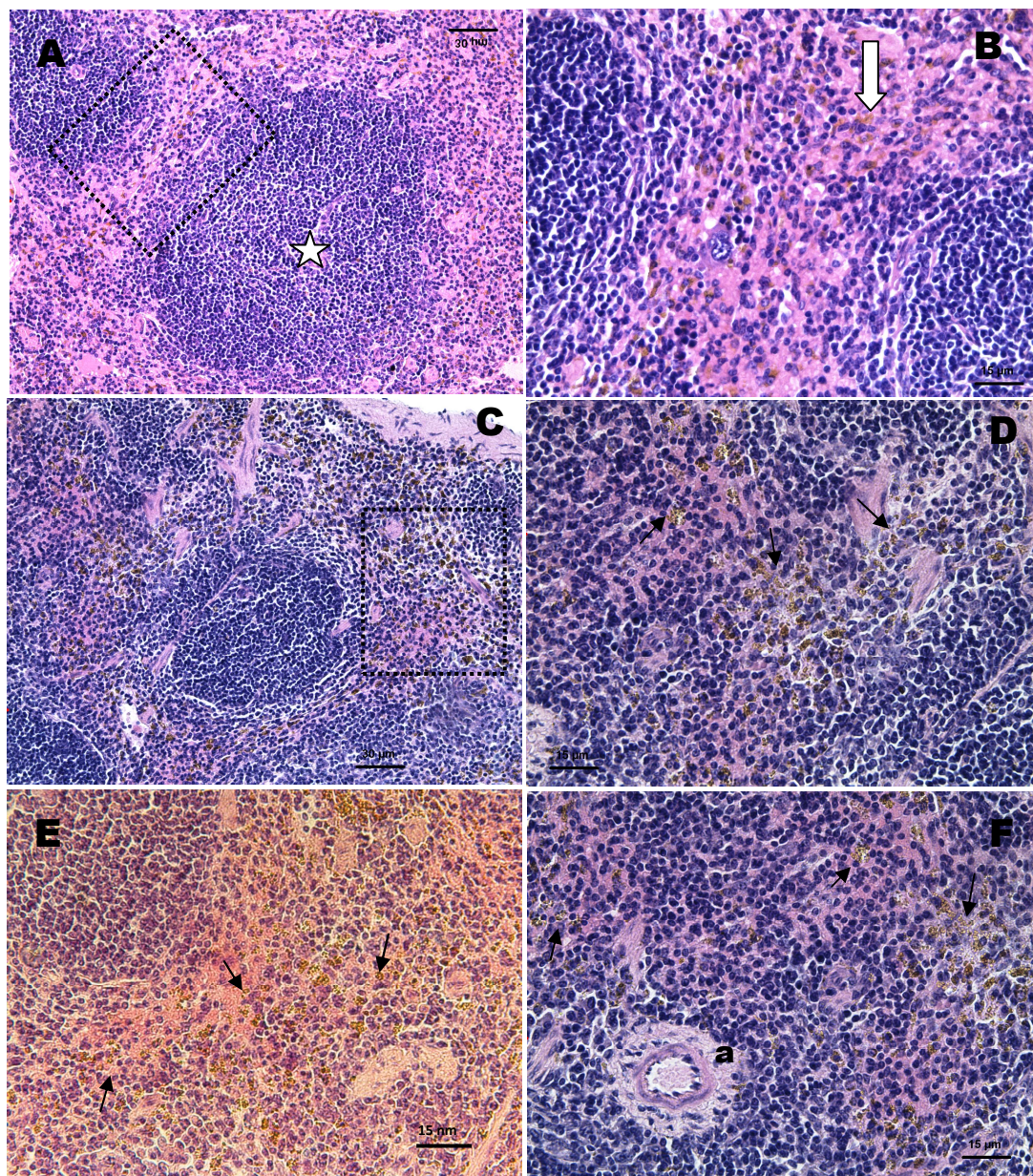


Figura 15 Fotomicrografias de baço de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de salina (**A** e **B**) e NPMs-DMSA (**C–F**). **A**: visão geral mostrando morfologia normal do parênquima. Estrela indica a polpa branca. O quadrante delimita área que foi ampliada em **B**. **B**: visão mostrando morfologia normal da polpa vermelha com ferro endógeno (seta branca). **C**: aspecto morfológico geral do baço no grupo experimental. O quadrante delimita a área que foi ampliada em **D**. **D**: nanopartículas magnéticas presentes na polpa vermelha. **E**: predomínio de nanopartículas magnéticas na polpa vermelha em comparação a polpa branca. **F**: nanopartículas magnéticas no nódulo linfático da polpa branca com uma arteríola (**a**) excêntrica. (as setas pretas indicam as nanopartículas magnéticas). Coloração: H&E

#### 4.6.4 Avaliação histológica do Fígado

Os animais do grupo controle apresentaram parênquima bem preservado com a cápsula de tecido conjuntivo íntegra, lóbulos de tamanho normal delimitados por tecido conjuntivo e contendo em algumas regiões ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos, formando o espaço porta. Os hepatócitos estavam com aspecto normal, células poliédricas bem definidas e citoplasma eosinofílico, sendo alguns binucleados. Os sinusóides, compostos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas, apresentavam-se não colabados e com células de Kupffer aderidas (figura 16A).

O fígado foi um dos órgãos que menos apresentou nanopartículas em sua estrutura. O aspecto morfológico geral do fígado no grupo experimental mostrou padrão semelhante ao encontrado no grupo controle (dados não mostrados).

Dos cinco animais analisados todos apresentaram nanopartículas em pouquíssima quantidade. As NPMs-DMSA foram encontradas nos hepatócitos (figura 16B – destaque em vermelho) e nos capilares sinusóides, provavelmente associadas à célula de Kupffer (figura 16B – destaque em amarelo). Também foram observadas próximas a ductos biliares (figura 16C).

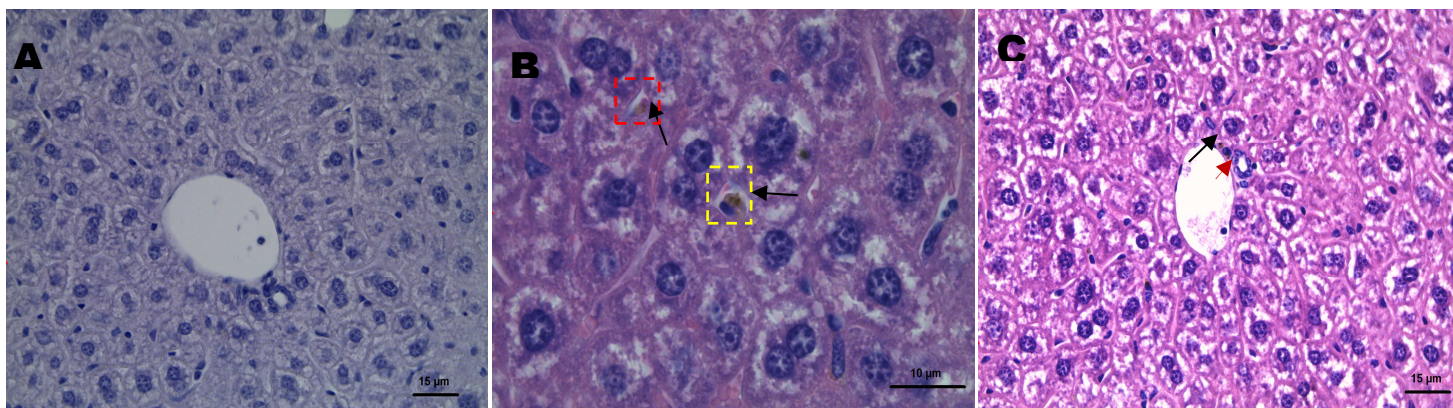


Figura 16 Fotomicrografias de fígado de animais após 90 dias do início da administração de múltiplas injeções de salina (**A**) e NPMs-DMSA (**B** e **C**). **A**: visão geral mostrando morfologia normal do lóbulo, com cordões de hepatócitos e um espaço porta, contendo uma veia porta e um pequeno ducto biliar. **B**: nanopartículas magnéticas nos hepatócitos (destaque em vermelho) e nos capilares sinusóides (destaque em amarelo). **C**: nanopartículas magnéticas próximas a ductos biliares (seta vermelha). (as setas pretas indicam as nanopartículas magnéticas). Coloração: H&E

## 5 DISCUSSÃO

## 5 DISCUSSÃO

Quando se trata do uso de nanopartículas em sistemas biológicos uma característica fundamental é o diâmetro médio, assim como a distribuição da frequência dos diâmetros das nanopartículas. O diâmetro das partículas apresenta influência direta sobre as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas como o tempo de permanência no organismo, na velocidade com que atravessam a barreira endotelial e no seu reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear (7). De forma geral, diâmetros reduzidos e a monodispersão podem facilitar uma rápida distribuição do material magnético no organismo.

Segundo análise por difração de raios x, o diâmetro médio das NPMs da amostra utilizada em nosso trabalho foi de 8 nm. Desta forma, é possível supor que se trata de um material com aspectos favoráveis a uma boa distribuição pelo organismo e ainda está dentro da faixa de tamanho que garante uma propriedade física de superparamagnetismo, podendo assim responder a um campo magnético externo (57,58).

A carga da superfície das partículas é outro parâmetro que influencia de maneira significativa o comportamento da amostra, interferindo principalmente na estabilidade da suspensão e no tempo de circulação em sistemas vivos. O potencial zeta é dado em função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Por ser um indicador útil da carga efetiva nas partículas, esse dado pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões coloidais. Quanto maior o valor absoluto do potencial zeta maior a possibilidade que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem e essa força supera a tendência natural a agregação (59). O potencial de carga de superfície (potencial zeta) da amostra NPMs-DMSA utilizada neste estudo revelou que a carga é negativa (-53,7 mV). De forma geral, partículas neutras ou de carga negativa permanecem mais tempo na circulação e sua composição e características de superfície tem influência no padrão de distribuição, sobretudo devido à ação do sistema fagocitário mononuclear (60). Segundo Dobrovolskaia & McNeil, 2007 (61) partículas com

superfície carregada positivamente (catiônicas) induzem mais reações inflamatórias do que as carregadas negativamente (aniônicos) ou as que possuem carga neutra. Esta é, portanto, outra característica interessante da amostra utilizada que aparentemente apresentou uma boa biodistribuição.

Considerando que diversos efeitos nocivos podem ser detectados devido ao uso de substâncias exógenas, observações foram feitas ao longo do trabalho, incluindo o monitoramento do peso corporal médio, alterações na pele e nos pêlos assim como das atividades motoras e a ocorrência de letalidade proveniente das múltiplas injeções de NPMs-DMSA. As observações feitas demonstraram que o ganho de peso corporal foi ascendente e não houve alterações clínicas tais como diarreia, hemorragia, vômito e atonia, durante todo o período avaliado. Tais achados sustentam a hipótese de que os animais apresentaram boa tolerância ao material administrado e que mesmo administradas sucessivas vezes, as NPMs-DMSA não foram tóxicas ao organismo e nem causaram morte a nenhum animal.

A não toxicidade das nanopartículas magnéticas após múltiplas injeções também foi observada por meio dos resultados hematológicos, onde o número de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle. De forma semelhante, em estudo utilizando uma única injeção de nanopartículas de maguemita recobertas com DMSA em primatas não humanos observou-se que o número de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito se encontravam normais 90 dias após administração do nanocomposto (62).

Com relação à população leucocitária foi verificado que múltiplas aplicações de NPMs-DMSA geraram resultados não significativos quando comparados ao grupo controle e aos valores de referência. A contagem diferencial de leucócitos do sangue (linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos) é um instrumento importante em análises patológicas, pois por meio desta é possível constatar processos inflamatórios e alérgicos decorrentes da ação de drogas, parasitas e traumas (63). Após a administração de substâncias nanoestruturadas, tem sido observado variações significativas nas populações leucocitárias, em geral representativas de processo inflamatório brando e temporário e que ocorre de maneira tempo e dose-dependentes (9,64). Resultados semelhantes a este estudo foram encontrados por



Coelho, 2008 (65) que não observou variações estatisticamente significativas na contagem de leucócitos, quando comparados ao controle, em diferentes tempos de tratamento com nanopartículas de maguemita recobertas com citrato encapsuladas em lipossomos (diâmetro de 10 nm). Diferentemente, Fuentes et al, 2011 (62), observaram uma diminuição estatisticamente significativa na contagem global de leucócitos, 15 e 90 dias após administração de nanopartículas de maguemita (diâmetro de 5,3 nm) recobertas com DMSA em primatas não humanos. A diferença entre os resultados pode estar relacionada ao tipo de cobertura das nanopartículas empregadas no estudo, bem como o modelo animal utilizado.

Outro parâmetro analisado foi a concentração de ferro sérico no organismo dos animais estudados. Como as nanopartículas utilizadas neste estudo apresentam ferro em sua composição, sua administração representa um suprimento férrico ao organismo tratado. Além disso, o ferro metabolizado a partir das nanopartículas também pode ser incorporado no estoque de ferro corporal e ser progressivamente alocado para os eritrócitos na forma de hemoglobina, o que diminuiria a sua taxa de remoção (66). Neste trabalho, os resultados obtidos nos ensaios biológicos mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa no nível de ferro sérico dos camundongos, do grupo experimental quando comparado ao grupo controle, indicando que as múltiplas injeções de NPMs-DMSA não são um fator causador de toxicidade férrica.

A avaliação da viabilidade celular após administração de substâncias baseadas em nanopartículas magnéticas é outra ferramenta muito útil para verificar a ocorrência de toxicidade *in vivo*. A análise após 90 dias do início das múltiplas injeções de NPMs-DMSA em camundongos mostrou que as nanopartículas não causaram diminuição da viabilidade nas células da medula óssea e nem nos macrófagos peritoneais. Resultados semelhantes foram observados por Estevanato, 2008 (67) em células da medula óssea quando utilizou nanopartículas magnéticas compostas por maguemita revestidas de albumina (PAMs), bem como por Brugin, 2007 (9) e Coelho, 2008 (65) em macrófagos peritoneais quando utilizaram NPMs de maguemita recobertas com citrato. Diferentemente, Guedes et al, 2005 (68) e Estevanato, 2008 (67) observaram diminuição da viabilidade dos macrófagos peritoneais de forma temporária e transitória após tratamento com nanopartículas de magnetita recobertas com carboximetil dextrana e PAMs, respectivamente.

Em ambos os tipos celulares analisados o principal mecanismo de morte celular observado foi a apoptose, corroborando com outros estudos de exposição celular a nanomateriais (69,70). A apoptose é um processo vital normal que ocorre a todo o momento no organismo, de forma ativa e fisiológica, e de fundamental importância na remoção de células danificadas, infectadas ou potencialmente neoplásicas (71,72). Desta forma, podemos inferir que mesmo com as múltiplas injeções de NPMs-DMSA não houve dano celular tanto na medula óssea quanto nos macrófagos. Assim, mesmo com a presença de ferro presente nas nanopartículas e DMSA as principais células do organismo (hemácias, leucócitos e plaquetas) continuam sendo produzidas na medula óssea e as importantes células de defesa do organismo se encontram aptas a realizar suas funções.

Uma vez injetadas endovenosamente, as nanopartículas entram na corrente sanguínea para depois serem distribuídas nos órgãos e tecidos periféricos. Em relação à biodistribuição de NPMs-DMSA nos órgãos aqui estudados, após 90 dias de sua aplicação em múltiplas injeções, o parênquima renal apresentou nanopartículas amplamente dispersas, e o fato de terem sido observadas nanopartículas associadas a glomérulos e nos túbulos contorcidos proximais e distais, indica que se manteve um constante processo de filtração das nanopartículas. De forma semelhante, em estudo utilizando nanopartículas de maguemita com diâmetro de 10 nm recobertas com citrato em camundongos observou-se aglomerados de NPMs dentro de glomérulos 12 e 24 horas após administração única do nanomaterial (9). Em primatas não humanos, Fuentes, 2009 (73), após administração única de nanopartículas de maguemita recobertas com DMSA (diâmetro de 5,3 nm), notou que quanto menor o tempo experimental maior o acúmulo de NPMs no parênquima renal, principalmente nos glomérulos e nos túbulos contorcidos proximais.

Resultados obtidos por Wareing *et al*, 2000 (74) em ratos, indicam que uma porção significativa de ferro no sangue é ultrafiltrada pelo glomérulo e somente 0,8-1,5% desse ferro filtrado é excretado pela urina, indicando que uma quantidade considerável é reabsorvida. Sugerem também que nada ou pouquíssimo ferro é reabsorvido pelos túbulos contorcidos distais. Interessantemente, os achados desta pesquisa mostram acúmulos de nanopartículas na parede de túbulos contorcidos proximais e distais. Apesar de não ter sido feitas medidas para verificar se houve

aumento de ferro excretado pela urina, o fato de as NPMs-DMSA estarem sendo reabsorvidas tanto pelos túbulos contorcidos proximais, como pelos túbulos contorcidos distais, mostra que o organismo dos animais estudados reaproveita o ferro disponível nas nanopartículas.

Outro achado relevante no parênquima renal foi a presença de pequenos focos linfocitários adjacentes a musculatura lisa do vaso, sugerindo uma leve inflamação. Tal situação pode ser explicada pelo fato de que a administração de compostos ricos em ferro pelo organismo pode induzir a formação de radicais livres dentro da célula, que culmina na geração de processos inflamatórios (75).

Associado aos resultados histológicos está a análise de creatinina sérica, que tem a função de avaliar o ritmo de filtração glomerular tornando-se um forte indicador de danos funcionais que possam levar à insuficiência renal (76). Os resultados obtidos demonstram que não houve alteração com significância estatística quando comparados ao controle, evidenciando que múltiplas injeções de nanopartículas magnéticas estabilizadas com DMSA não causaram danos aos rins. Em contra partida, Chen et al, 2006 (77) ao utilizar nanopartículas de cobre (diâmetro de 23,5 nm), observou uma alteração nos valores bioquímicos de creatinina o que foi confirmado por histologia com um quadro de glomerulonefrite.

Dos órgãos analisados no presente estudo, o fígado foi o que menos apresentou nanopartículas em suas estruturas no tempo estudado. A presença de NPMs-DMSA nos hepatócitos pode sugerir uma absorção direta das nanopartículas por essas células. Os hepatócitos são células importantes para o armazenamento e inativação metabólica do ferro endógeno, pois possuem muitos receptores para ferritinas e transferrinas. Células de outros órgãos são incapazes de inativar e armazenar grande quantidade de proteínas reguladoras do ferro; assim, a redistribuição das partículas para o fígado torna-se, essencial, pois evitam acúmulo desse metal em outros órgãos incapazes de inativarem seus efeitos tóxicos (40).

Os resultados da histologia hepática corroboram com os achados bioquímicos das enzimas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), desidrogenase láctica (LDH), e bilirrubina total (direta e indireta). A ALT é uma enzima relativamente específica nos hepatócitos de ratos já que há uma alta atividade desta enzima no citoplasma hepatocelular dessas

espécies (78). Outra enzima importante é a AST que em camundongos apresenta a isoforma mitocondrial em maior quantidade, quando comparada a isoforma citosólica. Esta enzima é observada em níveis elevados em uma variedade de tecidos como fígado, músculos e glóbulos vermelhos (79). Já a GGT, é uma enzima presente nos microssomos de hepatócitos e vias biliares e consiste em um importante indicador de doença hepática, principalmente colestase hepatobiliar. A LDH, no entanto, é liberada na ocorrência de dano celular. Seus níveis encontram-se elevados em caso de neoplasias, anemias, inflamações, hepatites, traumas e obstrução intestinal. Em contra partida, a bilirrubina avalia as funções hepáticas biliares e eritropoiéticas, auxiliando no diagnóstico de obstrução biliar, anemia hemolítica e lesão nas células hepáticas (80).

Ao considerarmos os resultados para as enzimas de origem hepática, foi visto que, de forma geral, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle, mostrando que as múltiplas aplicações de nanopartículas não causaram danos hepatobiliares. A normalidade dos parâmetros hepáticos também foi observada em outros estudos como os de Coelho, 2008 (65), para a enzima ALT, após administração de nanopartículas de maguemita recobertas com citrato na forma de lipossomas em camundongos; e por Fuentes *et al*, 2011 (62), para a enzima ALT, AST e para os níveis de bilirrubina total e frações, em primatas não humanos 90 dias após aplicação endovenosa de nanopartículas magnéticas de maguemita estabilizadas com DMSA.

O baço juntamente com o fígado, é um dos principais órgãos responsáveis pela retirada de nanopartículas da circulação sanguínea. Por se tratar de órgão com intenso acúmulo de tecido linfóide e devido a sua riqueza em células fagocitárias e ao contato íntimo entre o sangue e essas células, representa um importante órgão de defesa do organismo, além de participar de processos de hematopoiese e hemocaterese. Nas análises histológicas do baço foram identificados um acúmulo de partículas de ferro ou nanopartículas em diversas células da polpa vermelha e branca, esta em menor quantidade, quando comparado com o controle. Os achados podem ser explicados pelo fato do baço ser um órgão linfóide interposto na circulação sistêmica. Artérias que se originam da cápsula do órgão penetram no tecido esplênico e são envoltas por tecido linfóide frouxo, formando a polpa branca. Essas artérias saem então da polpa branca e confluem a uma circulação aberta na

polpa vermelha, nos chamados sinusóides. Desta forma, as nanopartículas injetadas ficam retidas nesses espaços da polpa vermelha, onde justamente foram encontradas em maior quantidade neste estudo.

Os pulmões são altamente vascularizados e com características muito peculiares em relação a sua circulação, exercendo papel importante na hemodinâmica do organismo, auxiliando, por exemplo, na adaptação a mudanças de volume e fluxo sanguíneo. Com relação a este órgão, os resultados do presente trabalho mostraram que 90 dias após múltiplas injeções de NPMs-DMSA, foi observado um baixo reconhecimento pelas células fagocitárias do tecido pulmonar, uma vez que não foram encontradas nanopartículas magnéticas associadas a processos inflamatórios, já que os pequenos infiltrados linfocitários observados foram também visualizados nos animais pertencentes ao grupo controle.

O parênquima pulmonar apresentou nanopartículas estabilizadas com DMSA no epitélio cúbico simples de bronquíolos, e nos septos alveolares. A observação de nanopartículas na parede bronquiolar, associada a células epiteliais, sugere que parte da amostra de NPMs-DMSA está sendo retirada deste órgão por esta via. A partir do momento que as NPMs encontram-se na luz dos bronquíolos estas são impulsionadas em direção a laringe pelo batimento dos cílios das células cilíndricas de revestimento, e assim então levadas ao meio externo. A microscopia de luz mostrou também a presença de nanopartículas na região perivascular, mesmo com baixa frequência entre os animais. Provavelmente, as nanopartículas se ligam à camada endotelial e vão primeiramente para a camada muscular das veias e depois para o parênquima pulmonar, como também observado devido à predominância de material nesta região.

Neste estudo, um animal apresentou alteração na parede de veias no interior do pulmão, sugerindo tratar-se de uma trombose. A porção central do trombo mostra-se mais clara, enquanto que a zona periférica forma com as plaquetas, leucócitos e fibrina um tecido fibro-celular. Alteração semelhante foi também observada por Garcia, 2005 (81) após 90 dias de administração única de nanopartículas de magnetita recobertas com DMSA. O aparecimento desta trombose tem duas hipóteses. A primeira é que com a migração de fagócitos mononucleares com NPMs englobadas, e conseqüentemente com a instalação de

um processo inflamatório, o mesmo pode ter evoluído para uma expansão da parede vascular seguida da organização do trombo. Na segunda hipótese, as nanopartículas, podendo algumas ter perdido sua cobertura estabilizante, aglomeram junto a parede do vaso, obstruindo-o parcial ou totalmente e em consequência levando ao desenvolvimento inflamatório na região. A gravidade dessa agressão a princípio é pequena, desde que neste órgão exista circulação colateral para o suprimento e troca de gases (81,82).

A fim de avaliar a região pulmonar e a biodistribuição de nanopartículas magnéticas no órgão, durante todo o experimento, foram realizadas análises de microtomografia computadorizada (micro-CT). Estudos utilizando micro-CT estão cada vez mais em ascensão, principalmente na detecção de nódulos pulmonares (83); quantificação de fibrose pulmonar por meio da densidade do órgão (84) e análise mais profunda da arquitetura óssea trabecular em modelo de osteoporose (85), ambos utilizando camundongos como modelo animal. Este equipamento é uma modalidade ideal para estudar a função pulmonar e morfometria, aproveitando o contraste inerente entre o ar e o tecido do pulmão e a aquisição de imagem em menor tempo e com resolução espacial maior. Associado a este benefício está o material utilizado neste estudo, nanopartículas magnéticas estabilizadas com DMSA, que possui uma preferência inicial de deposição no tecido pulmonar (82, 86, 87).

Imagens de animais vivos podem fornecer informações sobre a função pulmonar e mudanças nas características do tecido principalmente em estudos longitudinais, como é o caso deste trabalho. Análises da região de interesse (ROI) fornecem uma aferição da densidade média do tecido, representado em Unidades de Hounsfield (HU), gerando dados quantitativos sobre a concentração local de nanopartículas (88). Desta forma, no presente estudo foi analisada a densidade do pulmão em diferentes tempos após administração de nanopartículas magnéticas. Ao comparar os resultados com o grupo controle observou-se não haver diferença estatisticamente significativa entre eles, o que nos levaria a pensar que não houve acúmulo de nanopartículas no órgão ou que estas, quando presentes, não estavam em concentração suficiente para causar alteração nos valores de densidade.

A avaliação histológica, 90 dias após a administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA, confirmou a presença de pequenos aglomerados de nanopartículas no parênquima pulmonar, o que pode ser decorrente do tempo de administração da última dose de NPMs-DMSA e a fácil biodistribuição do material utilizado. Estudos tempo dependentes relatam que conforme o tempo experimental aumenta menos aglomerados de nanopartículas são observados (62,82). Uma possível explicação para esse achado é que ao administrar endovenosamente o NPMs-DMSA, inicialmente muitas nanopartículas se depositaram no tecido pulmonar e conforme o tempo experimental foi avançando, estas migraram para outros órgãos ou foram eliminadas pelas vias aéreas, havendo uma redistribuição.

A densidade da região analisada apresentou-se em média  $700 \pm 10$  HU no grupo controle e  $701 \pm 7$  no grupo experimental, durante todo o período analisado. Segundo parâmetros de referência (89), tecidos que são menos densos que a água são negativos na escala Hounsfield e materiais de maior densidade são positivos. Como o pulmão é uma mistura entre o ar (cerca de 1000 HU) e tecidos (aproximadamente 0 HU), a densidade pulmonar é menor que zero (cerca de - 700 HU). Entretanto, é importante destacar que o número de HU aumenta em função da concentração de nanopartículas presente no órgão e também varia de acordo com a voltagem empregada no experimento. Dias, 2010 (90) aponta que o valor de HU apresenta-se menor para 120 kV quando comparados aos resultados obtidos em 90 kV para o mesmo material analisado. Assim, como a voltagem empregada no presente estudo foi de 50 kV espera-se um valor de HU maior. Isto ocorre, porque quando a energia do feixe de raio X é diminuído, o número de raios X absorvido é maior, resultando em maior número de HU.

Durante todo o período de experimento não foram observadas nenhuma alteração estrutural visível nos pulmões dos animais tanto no grupo controle quanto no grupo experimental, quando analisados em micro-CT. A avaliação histológica, 90 dias após a administração de múltiplas injeções de NPMs-DMSA, confirmou a ausência de patologias como fibrose e nódulos. Embora a histologia forneça informações sobre os processos celulares (52), estas são representadas em apenas duas dimensões, além disso, a amostra é destruída. Já com a utilização de micro-CT é possível adquirir informações 3D sobre a estrutura do pulmão e a distribuição das

partículas dentro do tecido e desta forma, serem comparáveis à microscopia óptica como imagens de alta resolução possível.

As nanopartículas estão se tornando potenciais agentes de contraste possibilitando, por exemplo, a localização de tumores em estágios precoces de desenvolvimento. Atualmente as pesquisas se expandiram para diversos órgãos, como linfonodos (91), pâncreas (92,93) e próstata (94). Entretanto, neste trabalho as NPMs-DMSA não produziram contraste visível na imagem, mesmo sendo administrado a cada quinze dias. Há duas hipóteses para o ocorrido, uma é que segundo estudos de ressonância magnética as NPMs-DMSA têm uma maior concentração no pulmão nas primeiras 48 horas, diminuindo a partir de sete dias (82). Como as nanopartículas eram administradas quinzenalmente, era tempo suficiente para sair, em grande parte, do pulmão e tomar outros órgãos.

A segunda hipótese é devido a pouca concentração de ferro na amostra (1,95 g/L) e a potência empregada na aquisição das imagens (50 kV). De forma diferente, Dias *et al*, 2010 (21) em seu estudo relata que mesmo utilizando baixa voltagem, como 20 KV, a detecção de nanopartículas em tecidos biológicos pode ser possível para concentrações baixas de agente contrastante. Complementarmente, os autores, ao comparar os números de HU produzidos por nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com DMSA, utilizando voltagem de 90 e 120 kV, concluíram que as imagens tomográficas de nanopartículas magnéticas em tecidos como sangue, músculos e fígado normais, para as concentrações de nanopartículas inferiores a 14,76 mg/mL, não seriam possíveis de fornecer informações sobre distribuição das mesmas. Já em imagens tomográficas de órgãos como pulmão e gordura, a detecção de nanopartículas magnéticas em concentrações muito baixas seria possível.

Em estudos recentes do laboratório de Nanogen da Universidade de Brasília, foram também testadas nanoestruturas magnéticas contendo selol no tratamento de melanoma e sua capacidade de ser um agente de contraste para exames de tomografia computadorizada. Matos (comunicado pessoal), ao analisar camundongos com melanoma após 10 dias de inoculação do tumor, relatou que mesmo após trinta dias da injeção intratumoral de 30  $\mu$ L de FM com selol (550  $\mu$ g de Ferro total; 173,4  $\mu$ g de Selol) o material ainda apresentava contraste na região de



interesse. Embora os padrões utilizados por Matos tenham sido os mesmos empregados neste estudo, a diferença de resultados observados pode ser explicada pela concentração de ferro e via de administração das nanopartículas empregadas.

Vale ressaltar que durante o experimento todos os cuidados foram tomados para minimizar qualquer tipo de interferência na análise das imagens. Como o pulmão é um objeto em movimento, artefatos que são prejudiciais a qualquer técnica tomográfica, têm que ser compensados para obter uma reconstrução precisa (95,96). Assim, as imagens foram feitas baseadas na sincronização com a respiração do animal. Outro cuidado tomado foi quanto à posição correta do animal na mesa de exames, sempre em decúbito ventral e com as patas para cima a fim de evitar a interferência dos ossos nas imagens.

O detalhe em imagens *in vivo* da região torácica de modelos animais pode ser útil em muitas áreas de pesquisa, e particularmente em estudos dos efeitos do tratamento do câncer de pulmão. O presente estudo é um dos primeiros trabalhos do grupo utilizando micro-tomografia fazendo-se necessários estudos mais aprofundados para melhorar a técnica e a forma de representação e análise dos dados. Faz-se também necessário, análises que acompanhem a administração de nanopartículas magnéticas do tempo zero até períodos mais prolongados e com concentração de ferro mais elevada, porém não tóxicas.

Desta forma os resultados encontrados no presente trabalho, sugerem que múltiplas injeções de nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA são biocompatíveis e não tóxicas ao organismo de camundongos Swiss, o que abre a possibilidade de sua aplicação como uma ferramenta na área biomédica principalmente por meio de carregamento de fármacos a órgãos específicos como rim, pulmão e baço, visando o combate de diversas patologias.

## 6 CONCLUSÃO

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a administração de múltiplas injeções de NPMS-DMSA:

- 1) Não provocou quaisquer alterações clínicas e nem mesmo a morte dos animais.
- 2) Não induziu alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos e ferro sérico, indicando que não há processo inflamatório, danos hepáticos e renais e toxicidade férrica.
- 3) Não é citotóxica para as células da medula óssea e para os macrófagos peritoneais, como constatados pelo teste de viabilidade celular utilizando citometria de fluxo.
- 4) Há uma distribuição preferencial para os rins, secundariamente para o pulmão e em menor quantidade para o baço e fígado, não acarretando alterações histológicas significativas nos órgãos investigados.
- 5) Não causou danos visíveis no pulmão e não alterou o contraste das imagens tomográficas.
- 6) Podem ser consideradas biocompatíveis e não tóxicos, nas condições estudadas, estando dentro dos parâmetros adequados para garantir estabilidade, propriedades magnéticas e segurança na sua administração *in vivo*, adquirindo um potencial significativo para aplicações biomédicas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beduneau A, Ma Z, Grotepas CB, et al. Facilitated monocyte-macrophage uptake and tissue distribution of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles. PLoS ONE. 2009; 4(2):1-12.
2. Huh YM, Jun Y, Song HT, et al. *In vivo* magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. J. Am. Chem. Soc. 2005; 127(35):12387-12391.
3. Uskokovic V. Nanotechnologies: what we do not know. Technology in Society. 2007; 29:43-61.
4. Lacava Z, Morais P. Nanobiotecnologia e Saúde. 2002. Disponível em: <http://www.comciencia.br>
5. Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. Clinical Immunology. 2006.
6. Zhang Y, Calon F, Zhu C, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism. Hum Gene Ther. 2003; 14:1-12.
7. Berry C, Curtis ASG. Functionalisation of magnetic nanoparticles for application in biomedicine. Journal Physic D: Applied Physic. 2003; 36:198-206.
8. Liu W. Nanoparticles and their biological and environmental applications. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2006; 102(1):1-7.
9. Brugin A. Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2007.
10. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials. 2005; 26:3995-4021.
11. McBain SC, Yiu HHP, Dobson J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. International Journal of Nanomedicine, New Zealand, 2008; 3(2):169-180.

12. Teja AS, Koh PY. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 2009; 55:22-45.
13. Drogenik M, Kristl M, Makovec D, et al. Sonochemically assisted synthesis of zinc-doped maghemite. *Ultras. Sonochem.* 2008; 15:791-798.
14. Neuberger T, Schopfa B, Hofmann H, et al. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2005; 293:483-496.
15. Cui H, Ren W. Low temperature and size controlled synthesis of monodispersed  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles by an epoxide assisted sol-gel route. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2008; 47:81-84.
16. Da Silveira LB. Estudo de propriedades magnéticas de fluidos e nanocompósitos magnéticos biocompatíveis. [Tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2006.
17. Sonvico F, Mornet S, Vassaeur S, et al. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjugate Chemistry*, 2005; 16:1181-1188.
18. Kettering M, Winter J, Zeisberger M, et al. Magnetic nanoparticles as bimodal tools in magnetically induced labelling and magnetic heating of tumour cells. *Nanotechnology.* 2007; 18:1-9.
19. Kim BH, Lee N, Kim H, et al. Large-Scale Synthesis of Uniform and Extremely Small-Sized Iron Oxide Nanoparticles for High-Resolution T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2011; 133(32):12624–12631.
20. Cunningham CH, Arai T, Yang PC, et al. Positive contrast magnetic resonance imaging of cells labeled with magnetic nanoparticles. *Magnetic Resonance in Medicine, United States.* 2005; 53(5):999-1005.
21. Dias AG, Kunzel R, Levenhagen RS, Okuno E. Application of computed tomography images in the evaluation of magnetic nanoparticles biodistribution. *J. Magn. Magn. Mater.* 2010;322:2405–2407.
22. Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR in Biomedicine.* 2004; 17:484–499.

23. Mainardes RM, Silva LP. Drug delivery systems: past, present, and future. *Current Drug Targets*, Netherlands. 2004; 5(5):449-455.
24. Tedesco AC. Uso de dispositivos nano-estruturados no tratamento do cancer. In: Duran N, Mattoso LHC, Morais PC (Org.). *Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. 1 ed. São Paulo: Artliber, 2006. v.1, p.183-193.
25. Marcaroff PP, Primo FL, Azevedo RB, et al. Synthesis and Characterization of a Magnetic Nanoemulsion as a Promising Candidate for Cancer Treatment. *IEEE Trans. Magn.* 2006; 42(10).
26. Hillery A. Heat-sensitive liposomes for tumour targeting. *Drug Disc. Today*. 2001; 6(5):224-225.
27. Dobrovolskaia MA, Aggaewal P, Hall JB, Mcneil SE. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticles biodistribution. *Molecular Pharmaceutics*. 2008; 5(4):487-495.
28. Sánchez YM, Cruz NC, Fernández AMT, Machado OJD. Nanotechnology and its possibilities of application in the scientific-technological field. *Revista Cubana de Salud Pública*. 2009; 35(3).
29. Massart R. Magnetic fluids and process for obtaining them. US Patent 4 329 241, 1982.
30. Morais PC, Santos RL, Pimenta ACM, et al. Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles. *Thin Solid Films*, United States. 2006; 515(1):266-270.
31. Lacava ZGM. "Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas". In: *Nanotecnologia*. Art Liber Editora. 2006:175-181.
32. Tartaj P, Morales MDP, Verdaguer SV, et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003; 36: R182-R183.
33. Allouni ZE, Cimpan MR, Hol PJ, Skodvin T, Gjerdet NR. Agglomeration and sedimentation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009; 68(1):83-87.

34. Halbreich A, Roger J, Pons JN, et al. Biological applications of maghemite ferrofluid. *Biochimie*. 1998; 80:379-390.
35. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, England. 2003; 36(13):R167-R181.
36. Rademacher DJ, Steinpreis RE, Weber DN. Short-term exposure to dietary Pb and/or DMSA affects dopamine and dopamine metabolite levels in the medulla, optic tectum, and cerebellum of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pharmacol Biochem Behav*. 2001;70(2-3):199-207.
37. Aposhian HV, Maiorino RM, Gonzalez RD, et al. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. *Toxicology*. 1995; 97:23-38.
38. Fischer DR, Mays CW, Taylor GN. Ca-DTPA toxicity in the mouse fetus. *Health Physics*. 1975;29:780-782.
39. Flora SJS, Kumar P. Biochemical and immunotoxicological evaluation of metal chelating drugs in rats. *Drug Invest*. 1993;5:269-273.
40. Parca RM. Estudos morfológicos dos efeitos de nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com DMSA, em fígado de camundongos Swiss. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2006.
41. Jun YW, Huh YM, Choi JS, et al. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *J Am Chem. Soc*. 2005;127:5732–3.
42. Wilhelm C, Billotey C, Roger J, et al. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*. 2003; 24:1001-1011.
43. Auffan M, Decome L, Rose J et al. In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblast: a physiochemical and cytogenotoxic study. *Environ. Sci. Technol*. 2006; 40:4367-4373.
44. Clarke RG, Lund EK, Johnson IT, Pinder AC. Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT29 cells using annexin V binding, but not by TUNEL assay or sub-G0 DNA content. *Cytometry*, New York. 2000; 39(2):141-150.



45. Lee WD, Lynn AN, LeBlanc JM, et al. Tilimicosin-induced bovine neutrophil apoptosis is cell-specific and down regulates spontaneous LIB4 synthesis without increasing Fas expression. *Vet. Res., Paris*. 2004; 35(2):213-224.
46. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J. Histochem. Cytochem. Baltimore*. 1999; 47(9):1101-1109.
47. Heimpel H. When should the clinician suspect a drug-induced blood dyscrasia, and how should he proceed? *Eur. J. Haematol. Suppl*. 1996;60:11-15.
48. Heidel JD, Zhongping Y, Yi-Ching J et al. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc. Natl Acad. Sci*. 2007;104:5715-5721.
49. Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, et al. Toxicity and Tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological Sciences*. 2005; 89(1):338-347.
50. Mukundan SJr, Ketan BG, Cristian TB, et al. Liposomal Nanoscale Contrast Agent for Preclinical CT in Mice. *AJR*. 2006; 186:300–307.
51. Kim D, Park S, Lee JH, Jeong YY, Jon S. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *J Am Chem Soc*. 2007; 129:7661-5.
52. Ritman EL. Molecular imaging in small animals - Roles for Micro-CT. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*. 2002; 39:116–124.
53. Fischbach FT. *Manual de enfermagem: exames laboratoriais e diagnósticos*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998;
54. Nischimura LY, Potenza MM, Cesaretti IUR. *Enfermagem nas unidades de diagnóstico por imagem: aspectos fundamentais*. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.
55. Joslin JO. Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2009; 18(2):117–139.
56. Robbins, Contran. *Patologia*. Sétima edição, Ed. Elsevier, 2006.
57. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*. 2005; 19(3):311–30.

58. Heath JR, Davis ME. Nanotechnology and cancer. *Annual Review of Medicine*. 2008;59:405-419.
59. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*. 2003; 26(5):726-737.
60. Lemke AJ, Von Pilsach MIS, Lubbe A, et al. MRI after magnetic drug targeting in patients with advanced solid malignant tumors. *Eur. Radiol*. 2004; 14:1949-1955.
61. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*. 2007; 2(8):469-478.
62. Fuentes VM, Garcia MP, Tavares MCH et al. Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus spp.*). Future Medicine Ltd. 2011
63. Everds NE. Hematology of the Laboratory Mouse. In: *The mouse in biomedical research*. Elsevier Inc. 2007: 133-170.
64. Portilho-Corrêa FA. Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2007.
65. Coelho JP. Avaliação da biocompatibilidade de magnetolipossomas à base de nanopartículas de maghemita [Tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2008.
66. Jain TK, Reddy MK, Morales MA, et al. Biodistribution, Remoção, and Biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Molecular Pharmaceutics*. 2008; 5(2): 316-327.
67. Estevanato LLC. Investigação da biocompatibilidade de polímeros de albumina magnéticos em camundongos. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2008.
68. Guedes MHA, Sadeghiani N, Peixoto DLG, et al. Effects of AC magnetic field and carboxymethyl-dextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005; 293:283-286.


69. Hsin YH, Chen CF, Huang S, et al. The Apoptotic Effect of Nanosilver is Mediated by a ROS- and JNK-Dependent Mechanism Involving the Mitochondrial Pathway in NIH3T3 Cells. *Toxicol. Lett.* 2008; 179:130–139.
70. Khan JA, Pillai B, Das TK, Singh Y, Maiti S. Molecular Effects of Uptake of Gold Nanoparticles in HeLa Cells. *Chembiochem.* 2007;8:1237–1240.
71. Nagata S. Fas-mediated apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996; 406:119-124.
72. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, et al. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *American Journal of Medicine.* 1999; 107(5):489-506.
73. Fuentes VM. Estudo da biodistribuição e biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas a base de maguemita recobertas com DMSA em macacos-prego (*Cebus spp.*) juvenis mediante análise morfológica. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2009.
74. Wareing M, Ferguson CJ, Riccardi D, Smith CP. In vivo characterization of renal iron transport in the anaesthetized rat. *Journal of Physiology.* 2000; 524(2):581-586.
75. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. Quarta edição, Ed. Revinter, 2002.
76. Berne RM, Levy MN, Koepf BM, Stanton BA. *Fisiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2003.
77. Chen Z, Meng H, Xing G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters.* 2006; 16(2):109-120.
78. Amacher DE. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Human Exp. Toxicol.* 2002; 21:253–262.
79. Shashi K. Ramaiah. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chemical Toxicology.* 2007; 45:1551–1557.
80. Sharon A, Center DVM. Interpretation of Liver Enzymes. *Vet Clin Small Anim.* 2007; 37:297–333.
81. Garcia MP. Estudo in vivo dos efeitos sub-crônicos e crônicos de nanopartículas magnéticas a base de magnetita recobertas com DMSA. [Tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2005.

82. Garcia MP, Parca RM, Chaves SB, et al. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005; 293:277–282.
83. Kennel JK, Davis IA, Branning J, et al. High resolution computed tomography and MRI for monitoring lung tumor growth in mice undergoing radioimmunotherapy: Correlation with histology. *Med Phys*. 2000; 27:1101–1107.
84. Johnson KA. Imaging Techniques for Small Animal Imaging Models of Pulmonary Disease: Micro-CT. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(1):59–64.
85. Argenta MA, Buriol TM, Hecke MB. Metodologia para a obtenção de parâmetros físicos e geométricos do osso trabecular função de imagens de micro tomografia. *Mecânica Computacional*. 2010; 29:6363-6381.
86. Chaves SB, Lacava LM, Lacava ZGM, et al. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. *IEEE Trans. Magn*. 2002; 38(5):3231-3233.
87. Valois CRA, Nunes ES, Jaeger RG, et al. Expression Patterns of cell adhesion molecules in mice's lung after administration of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid-coated maghemite nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology, United States*. 2009; 9(5):2846-2855.
88. Hu J, Haworth ST, Molthen RC, Dawson CA. Dynamic small animal lung imaging via a postacquisition respiratory gating technique using Micro-Cone Beam Computed Tomography. *Academic Radiology*. 2004; 11(9).
89. Bushberg JT, Seibert JA, Leidholdt EM, Boone JM. *Essential Physics of Medical Imaging*. 1994.
90. Dias AL. Aplicação de nanopartículas magnéticas como meio de contraste em medicina nuclear e tomografia computadorizada. [Dissertação]. Santa Maria: Centro Universitário Franciscano de Santa Maria; 2009.
91. Russell M, Anzai Y. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide enhanced MR imaging for lymph node metastases. *Radiography*. 2007; 13:e73-e84.
92. Kelly K, Bardeesy N, Anbazhagan R, et al. Targeted nanoparticles for imaging incipient pancreatic ductal adenocarcinoma. 2007; 35:408.

93. Montet X, Weissleder R, Josephson L. Imaging Pancreatic Cancer with a Peptide-Nanoparticle Conjugate Targeted to Normal Pancreas. *Bioconjugate Chemistry*. 2006; 17(4):905-911.
94. Johannsen M, Gneveckow U, Taymoo K, et al. Thermal therapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles. *Actas Urológicas Españolas*. 2007; 31:660-667.
95. Godwin J, Breiman R, Speckman J. Problems and pitfalls in the evaluation of thoracic dissection by computed tomography. *J Comput Assist Tomogr* 1982; 6:750–756.
96. Tsui BMW, Segars WP, Lalush DS. Effects of upward creep and respiratory motion in myocardial SPECT. *IEEE Trans Nucl Sci* 2000; 47:1192–1195.

**ANEXOS**


## Anexo 1 – Certificado de Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética.





**Universidade de Brasília**  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 05 de setembro de 2011.

**DECLARAÇÃO**



Declaramos que o projeto intitulado “**CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE MÚLTIPLAS INJEÇÕES DE FLUIDO MAGNÉTICO DE MAGHEMITA RECOBERTAS COM DMSA EM CAMUNDONGOS SWISS**”, UnBDOC n.º 78214/2011, sob responsabilidade do Prof. Ricardo Bentes de Azevedo, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

  
  
 Prof. Aline Pic-Taylor  
 Coordenadora do CEUA