

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA  
CITOTOXICIDADE E  
GENOTOXICIDADE DOS POLÍMEROS  
DE ALBUMINA MAGNÉTICOS**

**CAMILA DE ARRUDA SALDANHA**

BRASÍLIA – DF  
2007

**CAMILA DE ARRUDA SALDANHA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA  
CITOTOXICIDADE E  
GENOTOXICIDADE DOS POLÍMEROS  
DE ALBUMINA MAGNÉTICOS**

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

Orientadoras: Profa. Dra. Zulmira Guerrero  
Marques Lacava  
Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida  
Santos

**Brasília – DF  
Dezembro- 2007**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família (Amariles, Délcio, Caroline e Felipe) pelo carinho, incentivo e dedicação prestados a mim hoje e sempre.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade diária de vida e graças recebidas diariamente;

Às professoras Zulmira Guerrero Marques Lacava e Maria de Fátima M. A. Santos pela oportunidade, paciência, incentivo e orientação;

Aos meus pais pela confiança e apoio nos momentos necessários;

Aos colegas Bruno Lacava, Andreza Simioni e A. C. Tedesco por gentilmente ter cedido a amostra de polímeros de albumina magnético;

À Luciana Pereira pela grande ajuda na elaboração do trabalho;

À professora Isabel pela grande ajuda para análise da estatística dos meus dados;

Aos professores César Grisólia e Ricardo Bentes por me ajudarem nos momentos que precisei;

Aos meus colegas queridos (Luciana, Dani, Júlia, Neda, Mirian, Débora, Elisa, Grazi e Carol) por tudo de bom que vocês me proporcionaram durante estes dois anos. Obrigada pelos ensinamentos, carinho, amizade, gargalhadas (que foram muitas), companhia e respeito que vocês sempre tiveram por mim. Adoro vocês;

Aos técnicos Djalma, Felipe e Ornil por toda ajuda e dicas no laboratório;

E todos aqueles que de alguma forma convivem comigo e me auxiliam.

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>07</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>09</b>
3.1 Polímeros de Albumina Magnéticos.....	10
3.2 Caracterização das partículas de maghemita dispersa em solução aquosa de albumina bovina por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	11
3.3. Manutenção e propagação das células submandibulares humana – HSG - e das células mesangiais humanas – CM.....	11
3.4 Determinação das concentrações de PAM a ser administradas às células HSG e CM...11	
3.5 Tratamento das células HSG e CM com PAM para os ensaios de toxicidade e genotoxicidade.....	12
3.6 Distinção entre apoptose e necrose das células HSG e CM por meio de ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo.....	13
3.6.1 Critérios para classificação das células em apoptóticas, necróticas ou viáveis.....	14
3.6.2 Análise estatística.....	14
3.7 Avaliação dos danos no DNA por meio de eletroforese de células isoladas em microgel – “Ensaio Cometa”.....	15

3.7.1 Critérios para análise dos danos no DNA.....	16
3.7.2 Análise Estatística.....	18
3.8 Análise da morfologia das células HSG e CM tratadas com PAM.....	18
3.8.1 Processamento das células HSG e CM para análise da morfologia celular em microscopia de luz .....	18
3.8.2 Processamento das células HSG e CM para análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de transmissão.....	19
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas.....	22
4.1.1 Determinação do diâmetro das amostras do FMF.....	22
4.2 Efeitos da amostra de polímeros de albumina magnéticos sobre a viabilidade das células HSG e CM .....	23
4.2.1 Células HSG.....	24
4.2.2 Células CM.....	24
4.3 Distinção entre apoptose e necrose das células HSG e CM por meio de ensaio de coloração de alaranjado de acridina e brometo de etídeo.....	25
4.3.1 Células HSG.....	25
4.3.2 Células CM.....	27
4.4 Avaliação dos danos no DNA em células HSG e CM tratadas com polímeros de albumina magnéticos (PAM).....	28
4.4.1 Células HSG.....	28
4.4.2 Células CM.....	30
4.5 Análise da morfologia e da ultra-estrutura das células HSG e CM tratadas com polímeros de albumina magnéticos.....	32

4.5.1 Análise da morfologia das células HSG - microscopia de luz.....	32
4.5.2 Análise da morfologia das células CM - microscopia de luz.....	34
4.5.3 Análise da morfologia das células HSG – Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	35
4.5.4 Análise da morfologia das células CM por Microscopia Eletrônica de Transmissão..	35
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

## **ABREVIATURAS**

AA – Alaranjado de acridina

BE – Brometo de etídio

CM – Célula mesangial

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DMSA - Ácido dimercapto succínico

HCL – Ácido clorídrico

HSG – Células ductais de glândula salivar humana irradiada

ID – Índice de danos no DNA

MET – Microscópio eletrônico de Transmissão

NPM – Nanopartículas magnéticas

PAM – Polímeros de albumina magnéticos

RNA – Ácido ribonucléico

UA – unidade arbitraria

## **I. RESUMO**

A nanotecnologia tem despertado crescente interesse na área biomédica. Materiais nanoestruturados e, em particular fluidos magnéticos, magnetolipossomas e polímeros magnéticos, constituídos a partir de nanopartículas magnéticas (NPM) têm sido propostos como entregadores de drogas, para separação de células, diagnóstico *in vitro* ou *in vivo*, e para o tratamento de diversas patologias. Uma nova amostra magnética que possa efetuar estes procedimentos foi desenvolvida: polímeros de albumina magnéticos (PAM) contendo nanopartículas de maghemita (diâmetro 9,2nm;  $2,46 \times 10^{14}$  partículas/mg). Para atender aos requisitos de que os efeitos biológicos de um novo material sejam conhecidos antes que sejam testados clinicamente, este trabalho teve como objetivo a avaliação, *in vitro*, de possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos dos polímeros de albumina magnéticos (PAM). Células de glândula submandibular humana (HSG) e células mesangiais (CM) foram cultivadas na presença da amostra PAM em três diferentes concentrações (250µg/mL, 150µg/mL e 75µg/mL) por 24 horas. A citotoxicidade foi avaliada por meio de ensaio de coloração de alaranjado de acridina/brometo de etídio e a genotoxicidade por meio de ensaio de cometa. Além disso, foram realizadas análises morfológicas em microscopia de luz e da ultra-estrutura em microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram que a amostra PAM: (1) apresenta citotoxicidade relacionada à concentração da amostra e tipo celular; (2) induz, como principal via de degeneração, a apoptose, que é sempre menor do que 20%; (3) tem atividade genotóxica, mas, em sua maioria, os danos são de intensidade leve (classe 1 e 2); (4) em concentrações menores, pode apresentar atividade genotóxica e não ter correspondente atividade citotóxica; (5) não apresentou alterações na morfologia ou ultra-estrutura de ambas as células; (6) teve suas NPM interiorizadas por algumas células. A citotoxicidade e genotoxicidade observadas podem ter relação com radicais livres induzidos pela presença de ferro nas NPM. Esses resultados sugerem uma possível biocompatibilidade da amostra PAM, sugerindo que testes *in vivo* sejam realizados para aprofundar o entendimento das interações entre os polímeros de albumina – nanopartículas de maghemita e as células-tecidos animais.

## **II. ABSTRACT**

Nanotechnology is marked by an increasing interest in the biomedical field. Nanostructured materials, such as magnetic fluids, magnetoliposomes, and magnetic polymers, composed of magnetic nanoparticles (NPM's) have been proposed for several applications: drug delivery systems, cell sorter, *in vitro* and *in vivo* diagnosis, and also for the treatment of several pathologies. A new sample, the magnetic albumin polymers (PAM) composed of maghemite nanoparticles (diameter 9.2nm;  $2.46 \times 10^{14}$  particle/mg) has been developed for biomedical applications purposes. New materials have to be biologically investigated before their clinical tests. In accordance with this requirement, the aim of this work was to evaluate, *in vitro*, the cytotoxicity and genotoxicity degrees of PAM sample. Human submandibular duct cells (HSG) and mesangial cells (CM) were cultivated during 24 hours in the presence of the PAM sample at three different concentrations (250 $\mu$ g/mL, 150 $\mu$ g/mL e 75 $\mu$ g/mL). The cytotoxicity was evaluated through acridine orange/ethidium bromide staining assay. The genotoxicity was investigated through the comet assay. Further, cells morphology and ultra structure were investigated by both light and transmission electronic microscopes analyses. The data show that the sample PAM (1) presents cytotoxicity related to the sample concentration and cellular type; (2) conducts less than 20% of cell to death; death are mainly by apoptosis; (3) presents genotoxic activity but the induced damage s are not intense (classes 1 and 2); (4) at the minor concentrations may present genotoxic activity without parallel cytotoxicity; (5) does not induce morphological or ultra structural alterations on both cellular types; (6) NPM's may be internalized by HSG and CM cells. The PAM cytotoxicity and genotoxicity activities may be related to the free radical production induced by the NPM's iron content. The results suggest that PAM is possibly biocompatible and also that this sample deserves to be investigated through *in vivo* tests that can elucidate the albumin polymers-maghemite particles and animal cell-tissues interactions.

# **1. INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas, a área da ciência denominada nanotecnologia tem despertado interesse crescente, pois utiliza materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem propriedades físicas, químicas e/ou biológicas significativamente novas. Muitas dessas novas propriedades surgem em função do tamanho extremamente pequeno das nanopartículas que, de forma ideal, varia entre 1 e 100 nm (Reith, 2003; Chan, 2006; Naschie, 2006). Dentre os materiais nanoestruturados, as nanopartículas magnéticas (NPM) têm se destacado nas áreas biomédicas por apresentarem características como alta proporção na relação superfície/volume e capacidade de responder a um gradiente de campo magnético. Além disso, quando em escala nanométrica, esses materiais se comportam como partículas superparamagnéticas, ou seja, não retém magnetismo após a remoção do campo magnético (Berry & Curtis, 2003a; Gupta & Gupta, 2005b).

Dentre as várias aplicações biomédicas das NPM destacam-se a separação, a purificação e a concentração de biomoléculas e de células, diagnóstico por imagem de ressonância magnética, sistema de entrega de drogas em sítios específicos, indução de hipertermia para tratamento de diversas patologias, em particular o câncer.

Para separar, purificar e concentrar biomoléculas e células, as NPM são, usualmente, associadas a moléculas que possam identificá-las. Quando adicionadas a uma solução, ou suspensão, contendo essas biomoléculas e/ou células, as NPM formam um complexo que pode ser recolhido por meio de um separador magnético. Um caso particular de separação de células pode ser obtido ao ligar-se as NPM a um anticorpo específico. Quando as células alvo são reconhecidas pelo anticorpo ficam marcadas magneticamente e, dessa forma, são separadas por meio de colunas magnéticas e removidas com o auxílio de um magneto externo (Safarik & Safarikova, 1999). Utilizando essa tecnologia de separação imunomagnética, em 2006, Matsunaga e colaboradores, conseguiram isolar células CD14<sup>+</sup> para serem posteriormente diferenciadas em células dendríticas. Também em 2006, Chen e colaboradores isolaram células CD34<sup>+</sup> umbilicais de um pool de células hematopoiéticas com o objetivo de utilizá-las em terapias de transplante celular.

As NPM são capazes de funcionar como agente de contraste nas imagens por ressonância magnética (MRI), aumentando a sensibilidade do diagnóstico (Berry &

Curtis, 2003a; Ito et al., 2005; Neuberger et al., 2005). Para tanto, basta que as nanopartículas, mesmo em baixas concentrações, sejam capturadas pelas células e nelas permaneçam pelo tempo necessário para o diagnóstico. A eficácia das NPM como agentes de contraste depende de suas propriedades físico-químicas como tamanho e da ligação que estabelecem com outras moléculas, como por exemplo, aquelas utilizadas para recobri-las, o que afetará sua farmacocinética e biodistribuição (Berry & Curtis, 2003a; Neuberger et al., 2005). NPM específicas para o fígado foram utilizadas como agente de contraste pela primeira vez na Europa, em 1995. Desde então, vários trabalhos têm mostrado que NPM, principalmente as de óxido de ferro, são veiculadas espontânea e preferencialmente para nódulos linfáticos. Assim, por meio de MRI, podem ser detectadas, em fase precoce, metástases para nódulos linfáticos dos tumores de testículo (Harisinghani et al., 2005), bexiga, próstata, uretra, mama, cólon (Harisinghani et al., 2004) e gástricos (Tatsumi et al., 2006). Esse método é mais específico e mais sensível do que o método convencional, que considera somente o tamanho do nódulo linfático. Em 2005, Harisinghani e colaboradores observaram que na detecção de nódulos linfáticos malignos em pacientes com câncer de testículo, a MRI com nanopartículas mostrava sensibilidade e especificidade de 88,2% e 92%, enquanto no critério convencional esses parâmetros são de 70,5% e 78%, respectivamente.

As NPM também podem ser utilizadas como sistemas entregadores de drogas em sítios específicos, para tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer. Assim, as nanopartículas associadas a quimioterápicos podem ser levadas a um local específico por meio de um campo magnético externo, aumentando a eficácia do tratamento e reduzindo os efeitos colaterais em tecidos normais (Arruebo et al., 2007). A primeira tentativa clínica que utilizou NPM como entregadores de drogas foi realizada por Lübbe e colaboradores (1996). Esses autores utilizaram nanopartículas de óxido de ferro associadas ao quimioterápico Epirrubicina em pacientes com tumores sólidos e demonstraram que o complexo nanopartículas-quimioterápico não era tóxico e acumulava-se no tecido tumoral. Mais recentemente, Alexiou e colaboradores (2005) administraram nanopartículas conjugadas ao quimioterápico Mitoxantrona em coelhos e observaram que este complexo aparecia mais concentrado no tecido tumoral, mesmo quando apenas 50% da dose do quimioterápico livre era aplicada.

Além das aplicações já citadas, as NPM podem ser utilizadas para destruir células tumorais (magnetotermocitólise), pois quando submetidas a um campo magnético de frequência alternada, absorvem energia que é convertida em calor, induzindo hipertermia (Hilger et al., 2005; Wang, Gu et al., 2005). Na hipertermia gerada magneticamente, processo denominado magnetohipertermia (Guedes et al., 2005), a temperatura nas células tumorais pode chegar até 41° - 45°C (Lee et al., 2007), calor suficiente para destruí-las. O calor é normalmente dissipado pela circulação sanguínea, mas os tecidos tumorais possuem uma rede de vasos sanguíneos desordenada, o que torna a circulação do sangue lenta e irregular, tornando as células mais susceptíveis ao calor (BSD Medical Corporation, 2002; Hildebrandt et al., 2002). Vários trabalhos mostram que a hipertermia induz danos no citoesqueleto, na membrana citoplasmática e nas membranas de organelas, como as das mitocôndrias, lisossomas e retículo endoplasmático. Além disso, aumenta a imunogenicidade do tumor, potencializa os efeitos da radioterapia e aumenta a ação de drogas antineoplásicas (BSD Medical Corporation, 2002; Hildebrandt et al., 2002; Wust et al., 2002; Tanaka et al., 2005). Seu papel sobre os efeitos da radioterapia e das drogas antineoplásicas é provavelmente devido ao aumento da perfusão tecidual, indução da dispersão de radicais de oxigênio na radioterapia e distribuição mais adequada da droga antineoplásica (Hildebrandt et al., 2002; Wust et al., 2002; Sreenivasa et al., 2006).

Consideradas não tóxicas, as NPM mais testadas nas aplicações biomédicas são as de óxido de ferro, quer na forma de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou em sua forma oxidada, a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Quando dispersas em soluções coloidais, constituem os fluidos magnéticos, que podem ser iônicos, quando a estabilidade coloidal é controlada por uma maior ou menor repulsão eletrostática entre as nanopartículas, surfactantes, quando as NPM são recobertas por uma camada molecular (que pode ser de cadeias carbônicas relativamente longas), ou ainda iônico-surfactantes.

Com o propósito de realizar aplicações biomédicas das NPM, pesquisadores do Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia da UnB (CNANO) desenvolveram um fluido magnético iônico constituído por nanopartículas de maghemita que, subsequentemente, foram encapsuladas em polímeros de albumina (PAM) que apresentaram alta susceptibilidade magnética. Devido a essa característica, esse novo

material deve possibilitar a magnetohipertermia, como também favorecer a entrega de drogas sítio-específica. Antes de sua utilização em aplicações biomédicas, entretanto, os efeitos da administração de novos materiais devem ser testados em sistemas biológicos.

A genotoxicidade e a citotoxicidade de uma substância podem ser avaliadas por meio de estudos que envolvam a análise de danos no DNA. Um deles é o ensaio de eletroforese de células isoladas em microgel – Ensaio Cometa – o qual envolve lise e eletroforese de células embebidas em agarose, tornando possível a detecção de quebras no DNA de núcleos interfásicos. Neste método, células com maior quantidade de danos no DNA apresentam migração mais rápida do material genético durante a eletroforese, sendo a extensão do dano avaliada pelo deslocamento do material genético (cauda do cometa formada) em relação ao núcleo (Oliver et al., 1990; Lee, Kwon & Chung, 2003). A realização dessa técnica em condições alcalinas permite mensurar não somente quebras nas duas fitas do DNA, mas também em uma única fita do DNA de núcleos interfásicos, além de permitir detectar sítios susceptíveis a ataques alcalinos. Apresenta várias vantagens em relação a outros testes de genotoxicidade, como requerimento de pequena quantidade de células que não precisam estar em proliferação, baixo custo, facilidade e rapidez, e alta sensibilidade na detecção de baixos níveis de danos no DNA (Tice et al., 2000). Essas características validam o ensaio cometa como uma ferramenta eficiente em estudos de toxicologia genética, como monitoramento de lesões e reparos de DNA de vários tipos celulares (Fracasso et al., 2004; Choy, Benzie & Cho, 2005). O presente momento parece ser pioneiro na utilização deste ensaio na investigação de materiais nanoestruturados.

Quebras no DNA podem ser originadas no processo apoptótico e, dessa forma, a interpretação dos resultados obtidos por meio de ensaio cometa pode ser mais precisa quando essa técnica é associada a testes de detecção de células em apoptose (Lee et al., 2003). Um procedimento simples para isso consiste na coloração das células com alaranjado de acridina associado ao brometo de etídio, o que permite a distinção de células viáveis, apoptóticas e necróticas (Kosmider et al., 2004). Outro estudo de grande importância na avaliação da biocompatibilidade e citotoxicidade de células expostas a novos materiais é a análise da morfologia e ultra-estrutura das células.

A avaliação de danos ao material genético utiliza uma variedade de sistemas biológicos que incluem células da medula óssea de roedores, linfócitos e várias outras linhagens celulares cultivadas *in vitro* (Carrano & Natarajan, 1988). Dentre os modelos experimentais *in vitro*, diferentes linhagens celulares podem ser utilizadas, incluindo células ductais de glândula submandibular humana (HSG) e células mesangiais humanas (CM).

Estabelecida em 1981, a partir de uma glândula salivar humana irradiada (Shirasuna, Sato & Miyazaky, 1981), a linhagem de células HSG tem sido utilizada em testes de citotoxicidade e genotoxicidade de substâncias terapêuticas (Atsumi et al., 2001; Kaneko et al., 2001) e em estudos de diferenciação celular (Daniels et al., 2000).

Por sua vez, a linhagem de células CM foi imortalizada a partir de uma cultura de células primárias, conforme descrito por Banas e colaboradores (1999). É um dos tipos celulares encontrados nos glomérulos dos rins, nos espaços intercapilares imersos em uma matriz mesangial. Elas participam, por contração, da hemodinâmica intraglomerular e do ritmo da filtração glomerular, além de apresentar funções fagocitárias e de depuração de substâncias como imunocomplexos (Menezes, 2005). Células mesangiais têm sido utilizadas em testes de citotoxicidade de citocinas (Lang et al., 2002; Wörnle et al., 2004).

A incidência crescente do câncer tem estimulado a busca de processos de diagnóstico e terapia alternativos mais efetivos que possam minimizar os efeitos colaterais severos dos procedimentos convencionais, cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Neste contexto, materiais em escala nanométrica, como os polímeros de albumina magnéticos, têm sido desenvolvidos com estes propósitos. A necessidade de se entender os mecanismos de interações entre as nanopartículas e as células, bem como conhecer os efeitos biológicos resultantes dessa interação, justificam esta pesquisa.

## **2. OBJETIVOS**

Considerando que os polímeros de albumina magnéticos, amostra recentemente desenvolvida, apresentam alta susceptibilidade magnética e, por conseguinte, grande potencial para aplicações biomédicas, seja como sistema entregador de fármacos ou no processo de magnetohipertermia, procedimentos promissores na terapia do câncer, e considerando ainda que os efeitos biológicos de novos materiais precisam ser conhecidos antes que possam ser testados clinicamente, este trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos *in vitro* dos polímeros de albumina magnéticos (PAM) e como objetivos específicos:

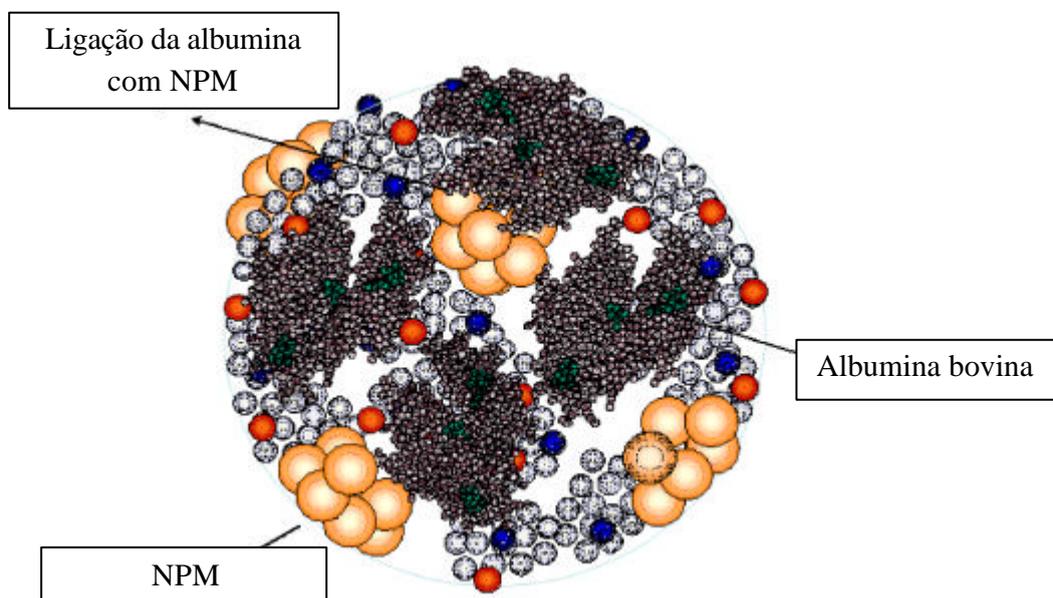
- 1- Determinar o diâmetro modal das NPM constituintes de PAM;
- 2- Avaliar possível efeito citotóxico de diferentes concentrações de PAM em células HSG e CM, por meio de ensaio de coloração de alaranjado de acridina/brometo de etídio;
- 3- Determinar a principal via de degeneração celular após tratamento com PAM;
- 4- Avaliar possível efeito genotóxico do PAM em células HSG e CM, por meio do ensaio cometa;
- 5- Verificar uma possível relação entre citotoxicidade e genotoxicidade de PAM;
- 6- Investigar ocorrência de alterações morfológicas e ultra-estruturais e interiorização de NPM nas células HSG e CM tratadas com PAM.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 Polímeros de Albumina Magnéticos

Nanopartículas de maghemita ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) de uma amostra de fluido magnético iônico ( $2,28 \times 10^{17}$  partículas/mL) foram dispersas em solução aquosa de albumina bovina e posteriormente liofilizadas, tendo concentração final de  $2,46 \times 10^{14}$  partículas/mg. O fluido magnético iônico foi sintetizado no laboratório de Química do Instituto de Física da UnB e suas nanopartículas foram encapsuladas em polímeros de albumina (Figura 1) pelo Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

Para o tratamento das células, os polímeros de albumina magnéticos (PAM) foram diluídos em meio de cultura DMEM (GIBCO-BRL,USA), de forma a se obter diferentes concentrações, conforme descrito nos itens a seguir.



**Figura 1.** Desenho ilustrativo dos polímeros de albumina magnéticos (Simioni et al., 2006)

### **3.2 Caracterização das nanopartículas da amostra PAM por microscopia eletrônica de transmissão**

Para determinar o diâmetro das NPM, a amostra PAM foi solubilizada em tampão fosfato pH 2,6 para aumentar a dispersão e facilitar a contagem. As nanopartículas foram analisadas e fotografadas em MET *JEOL 1001*, no laboratório de microscopia eletrônica da Universidade de Brasília. Das fotos, foram mensurados os diâmetros das nanopartículas (n=500) por meio do programa ImagePro Plus 5.1. A distribuição das partículas foi conseguida utilizando-se o melhor ajuste lognormal.

### **3.3 Manutenção e propagação das células submandibulares humana – HSG - e das células mesangiais humanas – CM**

As células HSG e CM foram mantidas em meio de cultura DMEM (GIBCO-BRL) suplementado com 10% de soro bovino fetal (GIBCO-BRL), 1% de penicilina-estreptomicina, tamponado com bicarbonato de sódio, sendo o pH 7,4 ajustado pela adição de ácido clorídrico (HCl).

As culturas foram estabelecidas a partir de uma passagem inicial de  $2 \times 10^5$  células em frascos de cultura de  $75 \text{ cm}^2$  e mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e umidade saturada. Uma vez atingido 80-90% de confluência, as células eram liberadas do fundo do frasco de cultura por tratamento com solução de tripsina 0,125%/EDTA 0,02% por dois minutos, centrifugadas a 175g por cinco minutos, contadas em câmara de Neubauer e passadas para novo frasco de cultura.

### **3.4 Determinação das concentrações de PAM a serem administradas às células HSG e CM**

De modo a determinar as concentrações dos polímeros de albumina magnéticos (PAM) a serem administradas às células para a realização dos ensaios biológicos foram

realizados, em triplicata, testes de viabilidade celular. Para isso, as culturas foram mantidas conforme item 3.3 em placas de 9 poços contendo, inicialmente,  $2 \times 10^5$  células.

As concentrações iniciais de PAM foram definidas a partir das concentrações testadas, previamente, por Simioni e colaboradores (2006), em cultura de melanócitos. A amostra PAM foi diluída em meio de cultura, de forma que se obtivessem as duas concentrações de partículas magnéticas a serem testadas, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Tratamentos administrados às células HSG e CM para o teste de viabilidade celular na presença de PAM

Tratamento	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Sem tratamento</b>	-
<b>PAM</b>	<b>250</b>
<b>PAM</b>	<b>125</b>

PAM = polímeros de albumina magnéticos ( $2,46 \times 10^{14}$  partículas/mg)

Após 24 horas de cultivo na presença da amostra PAM, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em dois mL de meio de cultura. A seguir, a uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  dessa suspensão celular foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  do corante azul de tripan a 0,4%, de modo a efetuar-se, em câmara de Neubauer, a contagem das células viáveis. O corante azul de tripan penetra apenas nas células não viáveis, ou seja, as que perderam a integridade da membrana citoplasmática, de modo que, enquanto essas se coram, as células viáveis que mantêm a membrana citoplasmática íntegra, permanecem transparentes (Strober et al., 1997).

### 3.5 Tratamento das células HSG e CM com PAM

Com base nas concentrações de PAM utilizadas nos testes de viabilidade e seus resultados, foram estabelecidas as concentrações a serem adicionadas às culturas, mantidas por 24 horas nas condições descritas no item 3.4, conforme mostra a Tabela 2.

Os ensaios biológicos foram realizados 24 horas após o cultivo das células. De modo a seguir os padrões estabelecidos nos estudos de genotoxicidade e citotoxicidade, foi incluído o controle positivo, constituído por grupo de células tratadas por uma hora com peróxido de hidrogênio na concentração final de 1mM (20 µg/mL).

**Tabela 2** Grupos experimentais para avaliação dos efeitos do PAM sobre as células HSG e CM

Grupo	Tratamento (µg/mL)	
	PAM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Controle negativo	-	-
Controle positivo	-	20
PAM – I (6 x 10 <sup>13</sup> p/mL)	250	-
PAM – II (3,7 x 10 <sup>13</sup> p/mL)	150	-
PAM – III (1,9 x 10 <sup>13</sup> p/mL)	75	-

PAM = polímeros de albumina magnéticos (2,46 × 10<sup>14</sup> partículas/mg)

### 3.6 Distinção entre as vias de degeneração apoptose e necrose por meio de ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio

Para o ensaio de coloração com alaranjado de acridina (AA) e brometo de etídio (BE), realizado em triplicata, células HSG e CM foram cultivadas e mantidas segundo os procedimentos descritos no item 3.5. Após 24 horas da passagem das células, cada grupo experimental recebeu o respectivo tratamento, conforme descrito na Tabela 2 e, depois de 24 horas de tratamento, as células em suspensão e as aderidas aos frascos foram coletadas, submetidas à centrifugação a 750g por 5 minutos e ressuspensas em 100 µL de meio de cultura. De cada amostra foram retirados 20 µL aos quais foram subsequentemente adicionados 2 µL de uma mistura recém preparada dos corantes de alaranjado de acridina (100 µL/mL água) e brometo de etídio (100 µL/mL água), na proporção 1:1.

As células coradas foram então imediatamente colocadas sobre lâminas de microscopia (26 × 76 mm), previamente lavadas e identificadas e, após montagem com lamínulas (24 × 24 mm), foram analisadas por meio de teste cego, em microscópio de

fluorescência (Olympus, filtro de barragem de 530nm) do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília. De cada tratamento foram analisadas cerca de 300 células, 100 células em cada uma das triplicatas, no mínimo.

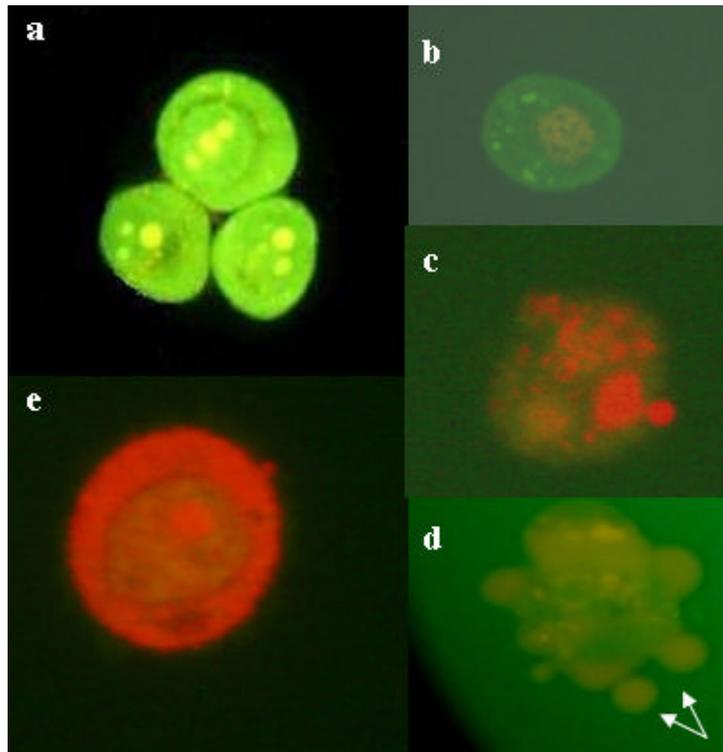
### 3.6.1 Critérios para classificação das células em apoptóticas, necróticas ou viáveis

As análises para detecção e quantificação de células em apoptose e necrose foram realizadas por meio dos parâmetros cor e aspecto morfológico do núcleo, além da condensação e fragmentação da cromatina. Esta distinção é possível porque, enquanto o alaranjado de acridina (AA) penetra nas células vivas e mortas, resultando na emissão da fluorescência verde por intercalar no DNA e laranja, no RNA, o brometo de etídio (BE) só penetra nas células que já possuem alteração na membrana (apoptose tardia ou necrose), emitindo uma fluorescência laranja ao intercalar no DNA. Dessa forma, segundo Takahashi e colaboradores (2004) e Kosmider e colaboradores (2004), diferentes padrões celulares (representados na Figura 2) podem ser observados e classificados:

- i) Células vivas possuem núcleo verde uniforme (Figura 2a);
- ii) Células em fases iniciais de apoptose ainda possuem suas membranas intactas e, portanto, apresentam núcleo verde, porém não uniformemente corado. Nelas ocorrem condensações da cromatina, clivagem do DNA e/ou fragmentação nuclear (Figura 2b);
- iii) Células em fases tardias de apoptose apresentam condensação da cromatina e áreas alaranjadas no núcleo (Figura 2c), pois nas etapas finais do processo já perderam a integridade da membrana e o BE predomina sobre o AA. Células apoptóticas podem ainda apresentar corpos apoptóticos (Liu *et al.*, 2004), como pode ser observado na Figura 2d;
- iv) Células necróticas perderam a integridade da membrana e por isso apresentam núcleo alaranjado uniforme (Figura 2e).

### 3.6.2 Análise estatística

Para análise dos dados foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (ANOVA).



**Figura 2.** Análise em microscopia de fluorescência de células HSG classificadas em padrões pré-estabelecidos: (a) célula viável; (b), (c) e (d) células em apoptose; (e) célula em necrose. Aumento total de 400 $\times$  (Campos da Paz, 2005).

### **3.7 Avaliação dos danos no DNA por meio de eletroforese de células isoladas em microgel – “Ensaio Cometa”**

O ensaio cometa foi realizado em triplicata, segundo técnica descrita por Singh e colaboradores (1988), modificada por Oliver e colaboradores (1990). Para esse ensaio, as células HSG e CM foram cultivadas e mantidas segundo os procedimentos descritos no item 3.3. Após 24 horas de cultivo, cada grupo experimental recebeu o respectivo tratamento, conforme apresentado na Tabela 2.

Depois de 24 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado e colocado em frascos de centrífuga aos quais foram adicionadas as células depois de liberadas do fundo da placa. As amostras foram, então, centrifugadas a 750g, por 5 minutos e as células ressuspensas em 1 (um) mL de PBS. Esse procedimento foi repetido por duas

vezes. As células foram ressuspensas em 20 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*Low melting point* - LPM-Sigma, USA) a 0,5% em PBS e aquecidas a 37 °C em banho-maria. Imediatamente após esse procedimento, 130 µL dessa mistura foram gotejados em uma lâmina de vidro 26 × 76 mm, previamente preparada. A preparação das lâminas foi feita imergindo-as em agarose tipo II diluída em PBS a 1,5% e depois mantendo-as à temperatura ambiente, por um período de 12 horas. Após o gotejamento das células em agarose LPM sobre as lâminas, uma lamínula foi acoplada a cada lâmina e o conjunto foi levado à geladeira. Para evitar novas quebras no DNA, a partir desta etapa as lâminas estiveram sempre protegidas da luz.

Após cinco minutos na geladeira a 4°C, as lamínulas foram removidas e as lâminas mergulhadas em um Koplín contendo solução de lise final gelada ((2,2 M de NaCl, 89,0 mM de EDTA, 8,9 mM de Tris (pH 10), 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO) e coberto com papel alumínio.

Depois de 1 (uma) hora no tampão de lise, a 4° C, as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão de eletroforese (300 mM NaOH, 1mM EDTA) fresco, pH 13. Após 25 minutos em repouso, procedeu-se a eletroforese a 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA por um período de 25 minutos. Uma vez concluída a eletroforese, as lâminas foram lavadas com solução tampão neutralizadora (0,4M Tris, pH 7,5). Esse processo foi repetido três vezes, em intervalos de 5 minutos.

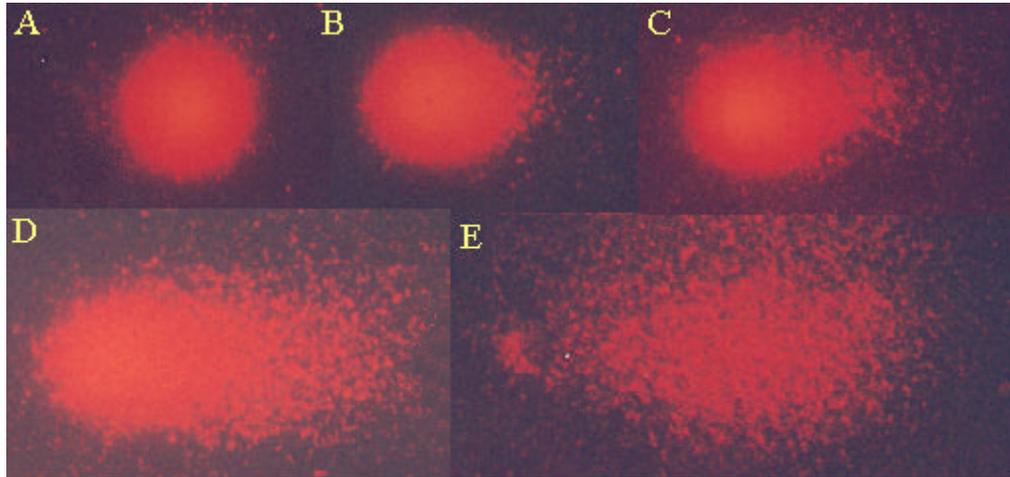
As lâminas foram guardadas a 4° C e os nucleóides foram corados no momento da análise. A coloração dos nucleóides foi realizada gotejando-se sobre as lâminas 50 µL de solução aquosa de brometo de etídio 2%.

### 3.7.1 Critérios para análise dos danos no DNA

A avaliação dos danos no DNA foi feita utilizando-se um microscópio de fluorescência, Axioplan-Carl Zeiss, filtro de 510-560 nm, barreira do filtro de 590 nm e aumento total de 400×, no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília.

De cada tratamento, cerca de 300 nucleóides, 100 em cada uma das triplicatas, no mínimo, foram analisados em teste cego e classificados de acordo com o comprimento da cauda do nucleóide, segundo critério descrito por Jalonszynski e colaboradores (1997),

em que os nucleóides analisados são classificados de 0 a 4, segundo seu grau de lesão, conforme ilustra a Figura 3.



**Figura 3.** Análise em microscopia de fluorescência de núcleos de células HSG classificados em padrões preestabelecidos: (A) Classe 0; (B) Classe 1; (C) Classe 2; (D) Classe 3; (E) Classe 4. Aumento total de 400× (Campos da Paz, 2005).

Para a quantificação dos danos no DNA, o escore total para os 300 nucleóides analisados varia de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 400 (dano máximo = todos os nucleóides com dano de classe 4), sendo estimado a partir da fórmula:

$$\text{ID (ua)} = \frac{N_1 + 2N_2 + 3N_3 + 4N_4}{?/100}$$

onde,

ID = índice de danos no DNA;

ua= unidade arbitrária;

$N_1, \dots, N_4$  = nucleóides classificados como de classe 1, 2, 3 ou 4;

? = número de nucleóides analisados, incluindo os da classe zero.

### 3.7.2 Análise Estatística

Para a análise estatística dos índices de danos no DNA verificados nas células HSG, foi aplicada a análise de variância (ANOVA). Aos casos em que foram detectadas diferenças entre os tratamentos, foi aplicado o teste Fisher em nível de significância 5% ( $p < 0,05$ ). Nas células CM foi utilizada a transformação “box cox”, adequada para números absolutos e, em seguida, foi aplicada a análise de variância (ANOVA). Do mesmo modo do que o empregado para as células HSG, quando foram detectadas diferenças entre os tratamentos nas células CM, foi aplicado o teste Fisher em nível de significância 5% ( $p < 0,05$ ).

Para a análise estatística da frequência de células com danos no DNA verificadas nas células HSG, foi também aplicada a análise de variância (ANOVA) e, quando detectadas diferenças entre os tratamentos, aplicado o teste Fisher em nível de significância 5% ( $p < 0,05$ ). No caso das células CM, as diferenças nas frequências de células com danos no DNA foram analisadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis (ANOVA).

## **3.8 Análise da morfologia e da ultra-estrutura das células HSG e CM tratadas com PAM**

### 3.8.1 Processamento das células HSG e CM para análise da morfologia celular em microscopia de luz

As células foram preparadas para análise morfológica em uma placa de cultura de seis poços, contendo uma lamínula de microscopia (18 × 18mm) em cada poço. Foram cultivadas inicialmente  $2 \times 10^5$  células que cresceram aderidas às lamínulas. Após 24 horas, cada grupo experimental recebeu tratamento com a amostra PAM, conforme descrito na Tabela 2. Os testes foram realizados em duplicata. Após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas três vezes com PBS (NaCl 0,154 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M; pH 7,4).

As células aderidas a uma das lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 2% em tampão fosfato por 10 minutos. Depois de lavadas com PBS, as células foram coradas

com solução de violeta de cresilo 0,2% em etanol 20%, por cinco minutos. As células aderidas à outra lamínula, em cada um dos grupos experimentais, foram coradas com solução de Giemsa 4% em metanol, por 5 minutos, sem que passassem por processo de fixação. Após serem lavadas com PBS, as lamínulas foram retiradas dos poços e montadas sobre lâminas de vidro para microscopia (26 × 76 mm), com a face contendo as células coradas em contato com a lâmina. As células foram imediatamente analisadas e fotografadas em microscópio Zeiss Axiophot, com ocular de 10× e objetiva de 100×, no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília.

### 3.8.2 Processamento das células HSG e CM para análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise da ultra-estrutura em microscopia eletrônica de transmissão, as culturas de células foram mantidas segundo os procedimentos descritos no item 3.3. Após a adesão das células ao fundo do frasco, foi adicionada a amostra PAM ao meio de cultura, conforme descrito na Tabela 02. Após 48 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado e colocado em frascos de centrifuga aos quais foram adicionadas as células previamente tripsinizadas. As amostras foram, então, centrifugadas a 750g por 5 minutos e as células ressuspensas em 1(un) mL de PBS. Esse procedimento foi repetido duas vezes.

As células, depois de tripsinizadas e centrifugadas, foram processadas de acordo com o protocolo utilizado por Silveira e colaboradores (2003), com algumas modificações. As células foram ressuspensas em 1 mL de fixador constituído de glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, e de sacarose 3%. Após uma hora, as amostras foram centrifugadas a 750g e lavadas, por 10 minutos, com tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,4) acrescido de sacarose 3%. Esse procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas por uma hora, protegidas da luz, na mistura composta por tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM diluído em tampão de sódio (0,1 M, pH 7,4). Após serem lavadas duas vezes com tampão cacodilato de sódio por 10 minutos, as células foram contrastadas *in bloc* com acetato de uranila aquoso 0,5% por

uma hora, protegidas da luz. Em seguida, foram lavadas com tampão cacodilato de sódio, por dez minutos e, posteriormente, com água destilada. As células foram então desidratadas em concentrações crescentes de acetona: 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (esta última repetida três vezes). O tempo de desidratação foi de dez minutos para cada uma das concentrações de acetona.

Após a desidratação, as amostras foram infiltradas na mistura resina: acetona em concentrações crescentes de resina Spurr e decrescentes de acetona, em movimento giratório. Cada infiltração teve duração de, aproximadamente, 12 horas. Uma última infiltração foi feita somente com resina Spurr, por 7 a 8 horas, com o tubo aberto de modo a facilitar a evaporação da acetona remanescente. Em seguida, as amostras foram incluídas em formas de emblocamento contendo nova resina. O material foi mantido em estufa a 57 °C, por aproximadamente 72 horas.

Os blocos contendo as células foram levados a um ultramicrótomo *Reichert Supernova* com navalha de diamante para obtenção de cortes ultrafinos, que foram colhidos em telas de cobre de 400 *Mesh*. A contrastação das amostras foi feita protegida da luz, colocando-se primeiramente as telinhas em contato com solução de acetato de uranila 3% durante 25 minutos. Depois de lavadas em água destilada, as mesmas foram colocadas em contato com citrato de chumbo por 5 minutos. Após as telinhas serem lavadas em água destilada e deixadas secar por pelo menos 12 horas, as células foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão *JEOL 1001* do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

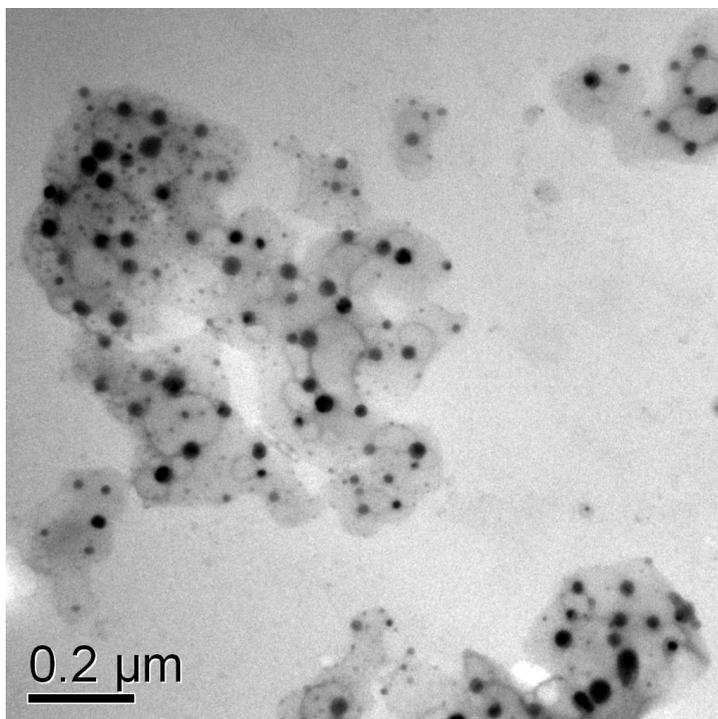
## **4. RESULTADOS**

No presente estudo, com o intuito de avaliar os efeitos biológicos de nanopartículas magnéticas contidas em polímeros de albumina bovinos, foram realizados diferentes ensaios biológicos, cujos resultados estão descritos abaixo e ilustrados nas Figuras 4 a 17.

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

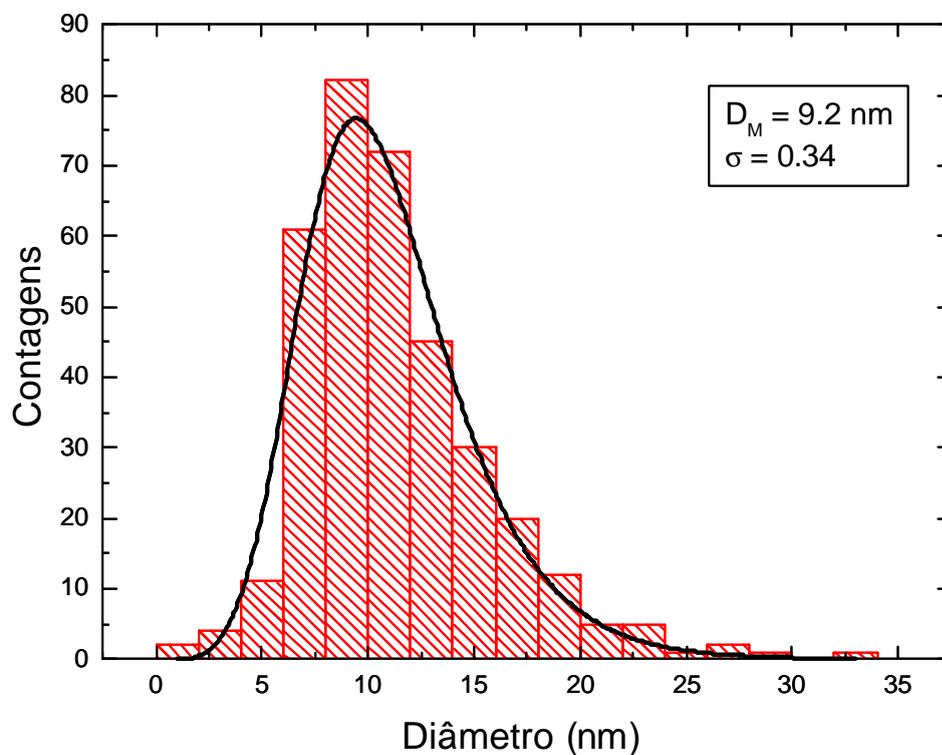
##### 4.1.1 Determinação do diâmetro das amostras do PAM

Uma das abordagens experimentais inicialmente realizadas foi a determinação do diâmetro das partículas de maghemita presentes na amostra PAM, o que foi realizada por meio de análise ao microscópio eletrônico de transmissão (MET). Ao MET, as nanopartículas mostraram-se ligeiramente esféricas (Figura 4). A análise de 500 partículas nas fotomicrografias mostrou diâmetros que variavam entre 4 e 154nm, o que demonstra que essas partículas são polidispersas (Figura 5).



**Figura 4** Fotomicrografia eletrônica mostrando nanopartículas magnéticas da amostra PAM.

A Figura 5 ilustra que diâmetro modal ( $D_M$ ) das partículas é 9,2 nm e o desvio padrão ( $\sigma$ ) 0,34.



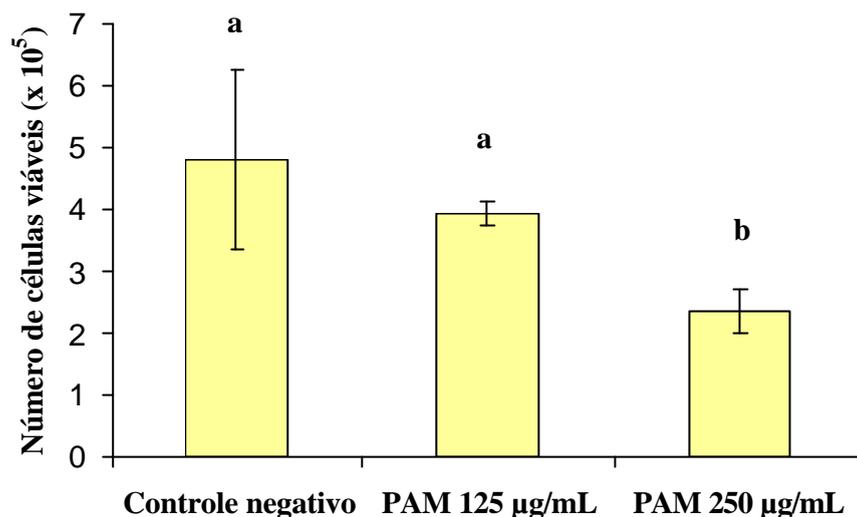
**Figura 5** Histograma de distribuição dos diâmetros do PAM. A linha cheia representa o melhor ajuste para a polidispersão segundo uma lognormal.

#### 4.2 Efeitos da amostra de polímeros de albumina magnéticos sobre a viabilidade das células HSG e CM

Para determinar a concentração dos polímeros de albumina magnéticos (PAM) a ser administrada às células nos testes de genotoxicidade, foram realizados, em triplicata, testes de viabilidade com as linhagens celulares HSG e CM.

#### 4.2.1 Células HSG

Como mostra a Figura 6, os polímeros de albumina magnéticos na concentração 125  $\mu\text{g/mL}$  permitiram sobrevivência de aproximadamente 70% das células HSG, enquanto que na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ , sua taxa de sobrevivência foi de 50%.



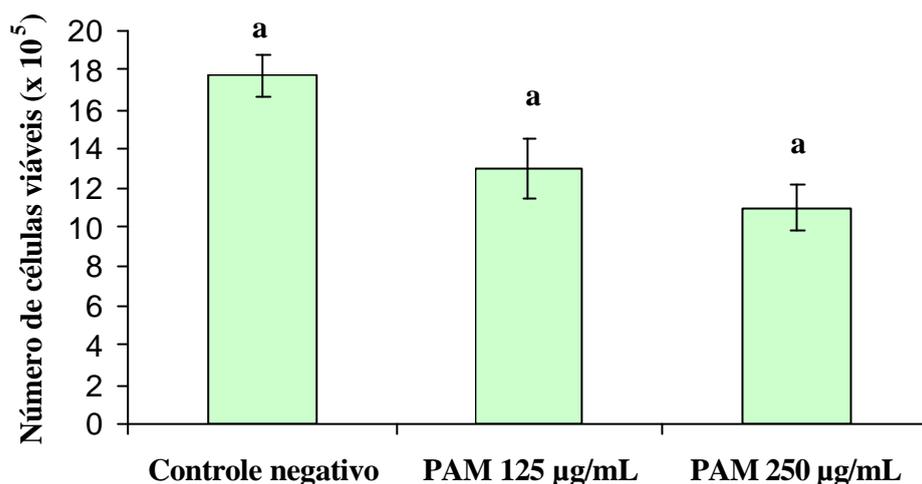
**Figura 6** Número de células HSG viáveis após cultivo com diferentes concentrações do PAM. Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Com base nesses dados, decidiu-se utilizar o PAM na concentração 250  $\mu\text{g/mL}$ , pois o número de células viáveis ou em degeneração seria suficiente para análise de genotoxicidade e citotoxicidade induzidas pelos polímeros de albumina magnéticos. Além dessa, foram utilizadas também outras duas concentrações, 150 e 75  $\mu\text{g/mL}$ , que correspondem, respectivamente, a 60% e 30% daquela concentração que permitiu aproximadamente a viabilidade de 50% das células (250  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 4.2.2 Células CM

Para as células CM, como mostra a Figura 7, nos grupos tratados com 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ , a taxa de sobrevivência das células foi de aproximadamente 70 e 60% respectivamente. Pelo fato de não ter sido encontrada diferença significativa na

freqüência de células viáveis com estas duas concentrações diferentes, optou-se por utilizar nos experimentos com as células CM, as mesmas concentrações utilizadas nos testes com as células HSG (250, 150 e 75  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 7** Número de células CM viáveis após cultivo com diferentes concentrações do PAM. Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

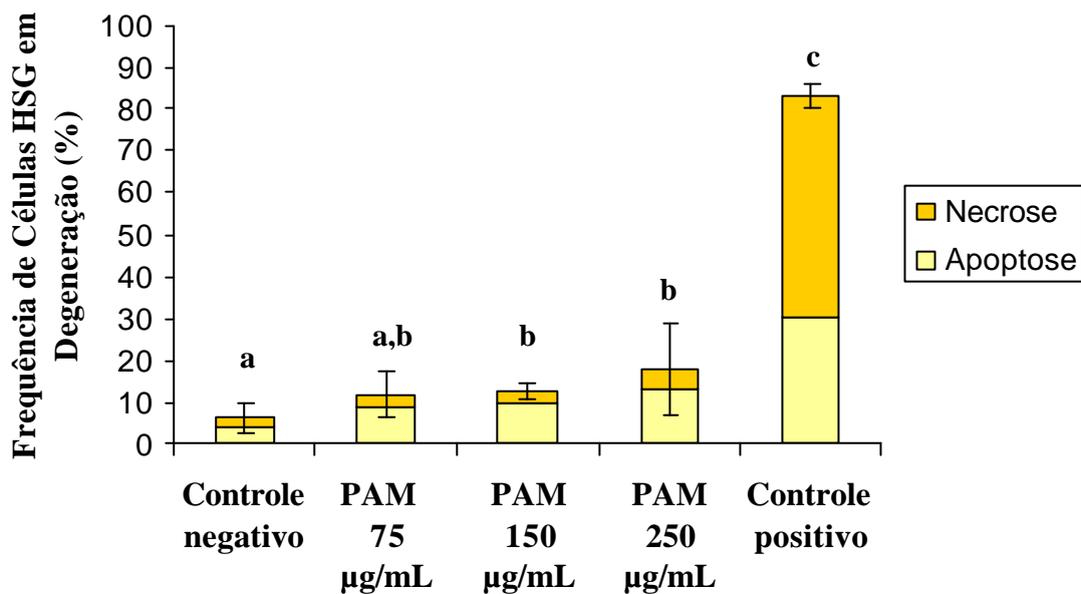
#### 4.3 Distinção entre apoptose e necrose por meio de ensaio de coloração de alaranjado de acridina e brometo de etídio

O ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio, permitiu a distinção entre células viáveis, necróticas e apoptóticas, em cada um dos grupos experimentais.

##### 4.3.1 Células HSG

A Figura 8 ilustra a freqüência de células HSG em processo de degeneração, bem como sua via de degeneração. Pode-se observar que a freqüência de células em degeneração foi significativamente maior nos grupos tratados com PAM na

concentração 250µg/mL e 150µg/mL (17,66% e 12,66%, respectivamente) quando comparado à frequência de células em degeneração no grupo controle negativo (6,33%). Embora a frequência de células em degeneração no grupo tratado com PAM na concentração 75µg/mL (11%) não tenha se mostrado significativamente diferente daquela do controle negativo, ela também não foi significativamente diferente da frequência induzida pelas concentrações maiores (250µg/mL e 150µg/mL de PAM). Em relação às vias de degeneração pode-se observar que, a exemplo do controle negativo, em todos os grupos tratados com PAM (250µg/mL, 150µg/mL e 75µg/mL), a via de degeneração mais freqüente foi a apoptose. Esta só é menor do que a necrose no controle positivo.

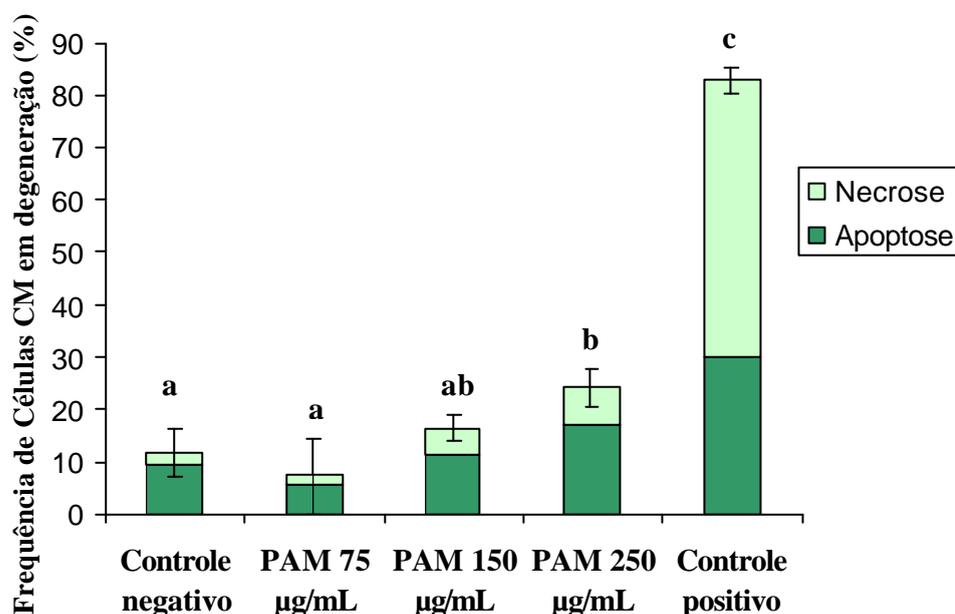


**Figura 8** Efeitos do tratamento com PAM (24h) sobre a frequência de células HSG nas vias de degeneração necrose e apoptose. Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2 Células CM

As células CM também foram avaliadas quanto à degeneração celular e os resultados estão ilustrados na Figura 9. Diferentemente do ocorrido nas células HSG, nas células CM apenas na concentração 250µg/mL o PAM induziu frequência de células em degeneração (24,3%) significativamente maior que o controle negativo (11,6%). Vale ressaltar que, a frequência de células em degeneração no grupo tratado com 150µg/mL de PAM (16,3%) não foi significativamente diferente daquela observada no grupo tratado com a concentração de 250µg/mL de PAM.

Assim como nas células HSG, nas células CM a via de degeneração mais frequente, tanto nos grupos tratados com PAM, como no sem tratamento foi a apoptose, excetuando-se o controle positivo (Figura 9).



**Figura 9** Efeitos do tratamento com PAM (24h) sobre a frequência de células CM nas vias de degeneração necrose e apoptose. Letras diferentes nas colunas denotam diferença ( $p < 0,02$ ).

#### **4.4 Efeitos dos polímeros de albumina magnéticos - PAM sobre os danos no DNA**

No ensaio cometa, para cada linhagem celular, foram analisados cerca de 300 nucléoides por tratamento. As diferentes classes de cometa, descritas no item 3.7.1 do capítulo Material e Métodos, foram detectadas em quase todos os grupos experimentais. É importante salientar que os danos observados estavam, em sua maioria, concentrados nas classes 1 e 2.

Os resultados obtidos para cada linhagem celular estão apresentados de duas formas: i) frequência de células com danos no DNA, o que indica a frequência de células em cada grupo experimental, classificadas como cometas de classe 1, 2, 3 e 4; ii) índice de danos no DNA, o que reflete a intensidade do dano no DNA das células.

##### **4.4.1 Células HSG**

A frequência de células HSG com danos no DNA está representada na Figura 10. Pode-se observar que nos grupos tratados com PAM, nas diferentes concentrações, foi significativamente maior que no grupo sem tratamento, o controle negativo (7%).

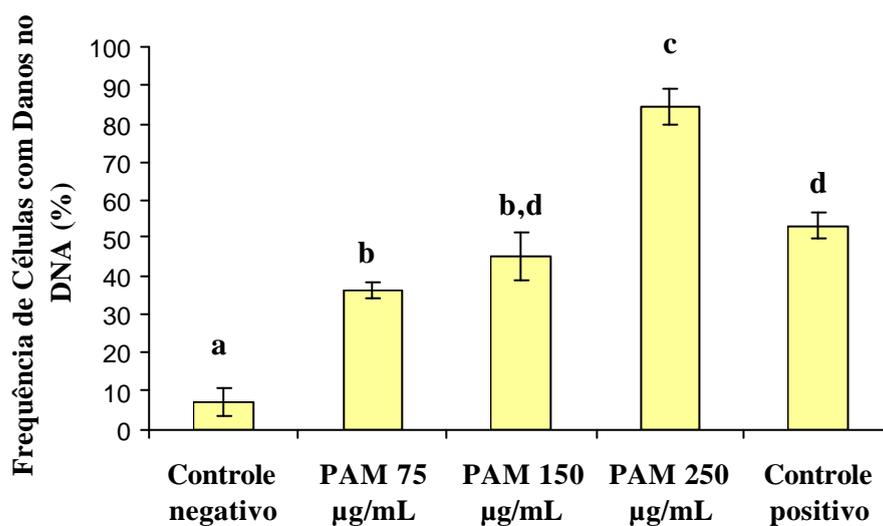
O PAM na maior concentração (250µg/mL), induziu frequência de células com danos no DNA (84,33%) significativamente maior do que nas concentrações 150µg/mL e 75µg/mL (45,33% e 36,33%, respectivamente), que não se mostraram significativamente diferentes entre si.

A Figura 11 ilustra a intensidade de danos no DNA apresentados pelas células HSG. Todos os grupos de células tratadas com PAM nas diferentes concentrações 250, 150 e 75µg/mL apresentaram índice de danos (120, 57 e 41 ua, respectivamente) significativamente maior do que o apresentado pelo controle negativo (7 ua). Vale ressaltar que o índice de danos no DNA das células tratadas com o PAM nas concentrações 150 e 75µg/mL não diferiram significativamente entre si.

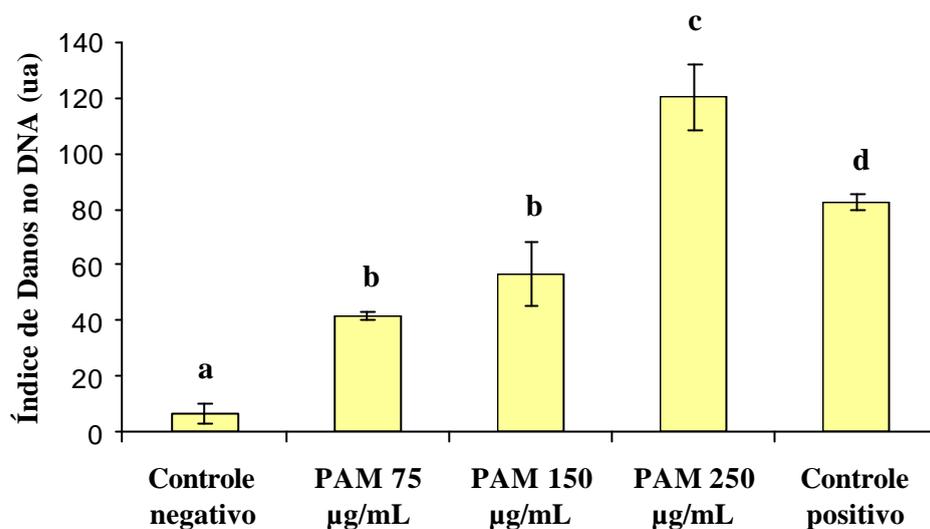
A tabela 3 mostra a percentagem de danos no DNA leves e intensos encontrados em cada tratamento.

Tabela 3. Percentagem de danos no DNA leves e intensos nos tratamentos utilizados

Tratamento	Danos leves (classe 1 e 2)	Danos intensos (classe 3 e 4)
Controle negativo	7%	0%
PAM 75µg/mL	35%	1,3%
PAM 150µg/mL	43,3%	2,3%
PAM 250µg/mL	80,6%	7%
Controle positivo	45,3%	8%



**Figura 10** Efeito do tratamento com PAM sobre a frequência de células HSG com danos no DNA. Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11** Efeito do tratamento com PAM nas células HSG sobre o índice de danos no DNA. Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2 Células CM

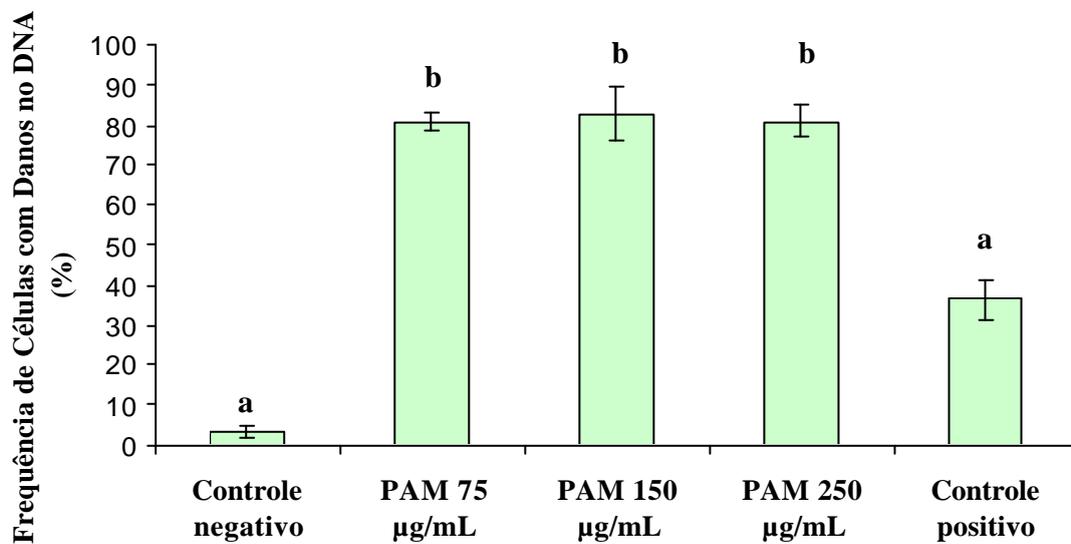
Em relação à frequência de células CM com danos no DNA (Figura 12), a análise dos dados mostrou que o PAM, em todas as concentrações utilizadas (250µg/mL, 150µg/mL e 75µg/mL) induziu frequência de células com danos no DNA (81%, 82,66% e 80,66%, respectivamente) significativamente maior que o grupo controle negativo (3,33%).

Em relação ao índice de danos no DNA apresentados pelas células CM (Figura 13), a análise dos dados mostrou que o índice dos grupos tratados com PAM (250µg/mL, 150µg/mL e 75µg/mL – 85, 89 e 81, respectivamente) é significativamente maior que o do grupo controle (3,33ua).

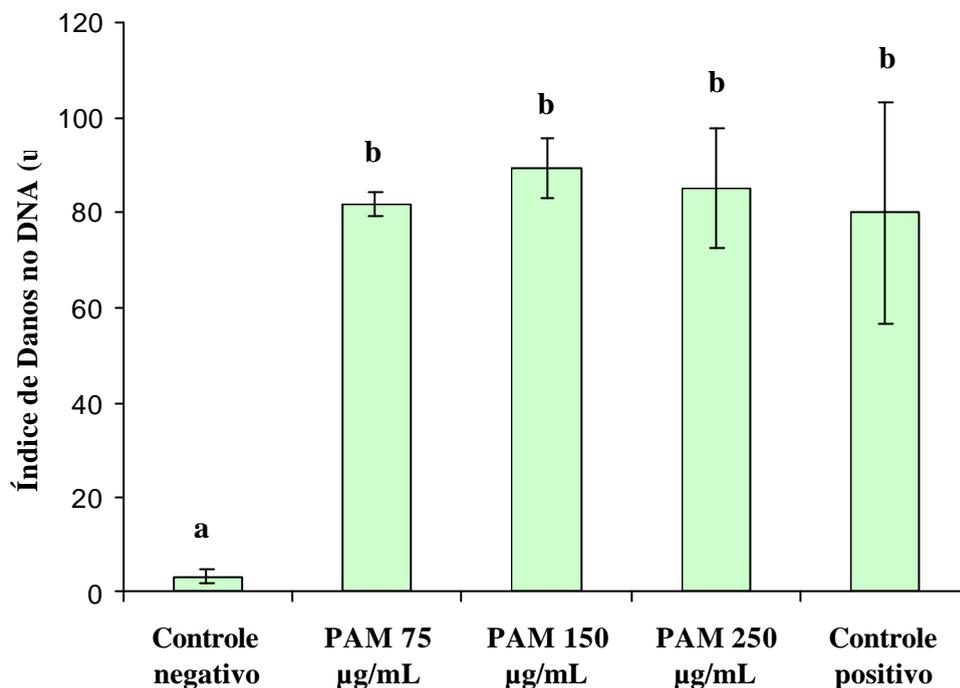
A tabela 4 mostra a percentagem de danos no DNA leve e intensos encontrados em cada tratamento.

Tabela 4. Percentagem de danos no DNA leves e intensos nos tratamentos utilizados

Tratamento	Danos leves (classe 1 e 2)	Danos intensos (classe 3 e 4)
Controle negativo	3,3%	0%
PAM 75µg/mL	80,6%	0%
PAM 150µg/mL	82,3%	0,7%
PAM 250µg/mL	79,3%	1%
Controle positivo	21,3%	11%



**Figura 12** Efeito do tratamento com PAM sobre a frequência de células CM com danos no DNA. Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa ( $p < 0,025$ ).



**Figura 13** Efeito do tratamento com PAM nas células CM sobre o índice de danos no DNA. Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

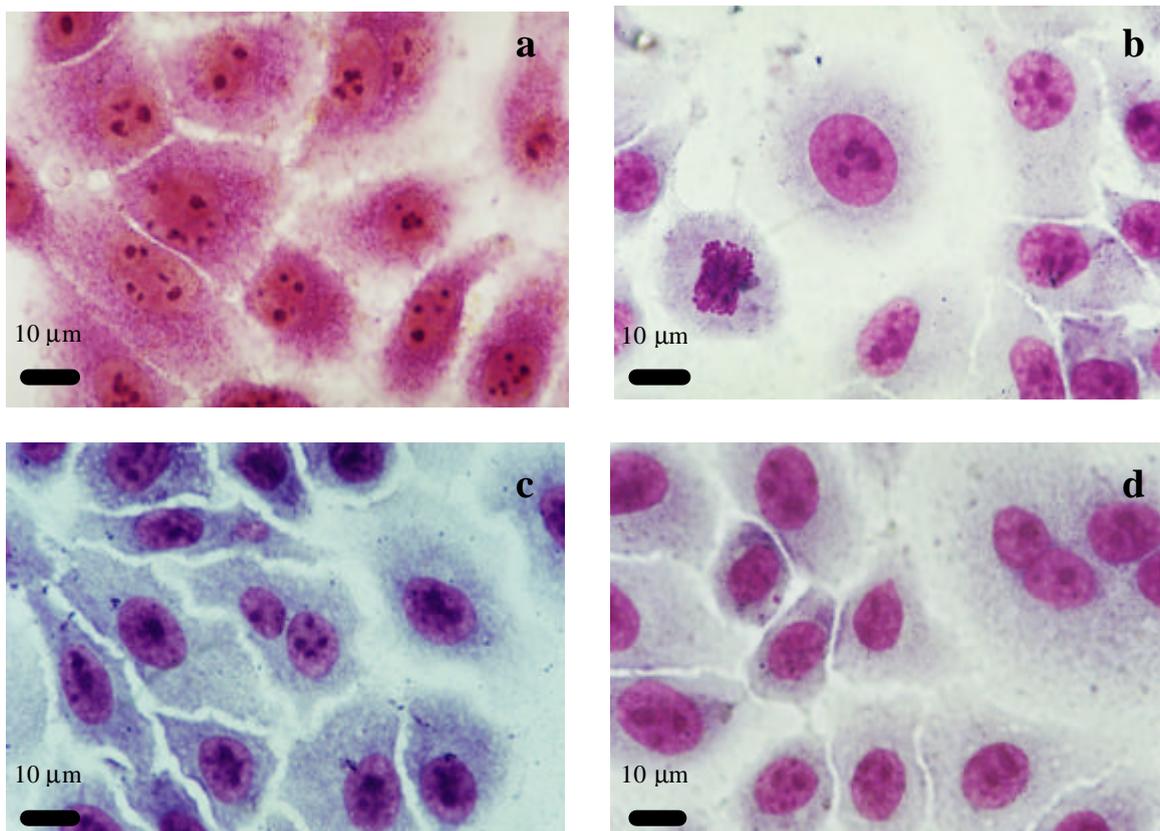
#### 4.5 Efeitos do tratamento com polímeros de albumina magnéticos sobre a morfologia e a ultra-estrutura das células HSG e CM

De modo a verificar se o PAM induzia alterações na morfologia e na ultra-estrutura das células, as mesmas foram analisadas ao microscópio de luz e ao microscópio eletrônico de transmissão.

##### 4.5.1 Análise da morfologia das células HSG - microscopia de luz

Ao microscópio de luz, as células HSG sem tratamento apresentam forma poligonal que pode variar de um pouco alongada a mais arredondada de acordo com a confluência da cultura e projeções citoplasmáticas que ligam uma célula à outra. O núcleo dessas células é esférico ou ovóide, sendo evidente um ou outro nucléolo (Figura

14a e 14b). O tratamento com o PAM, nas diferentes concentrações, não induziu alterações na morfologia dessas células, como ilustra a Figura 14 (c, d).

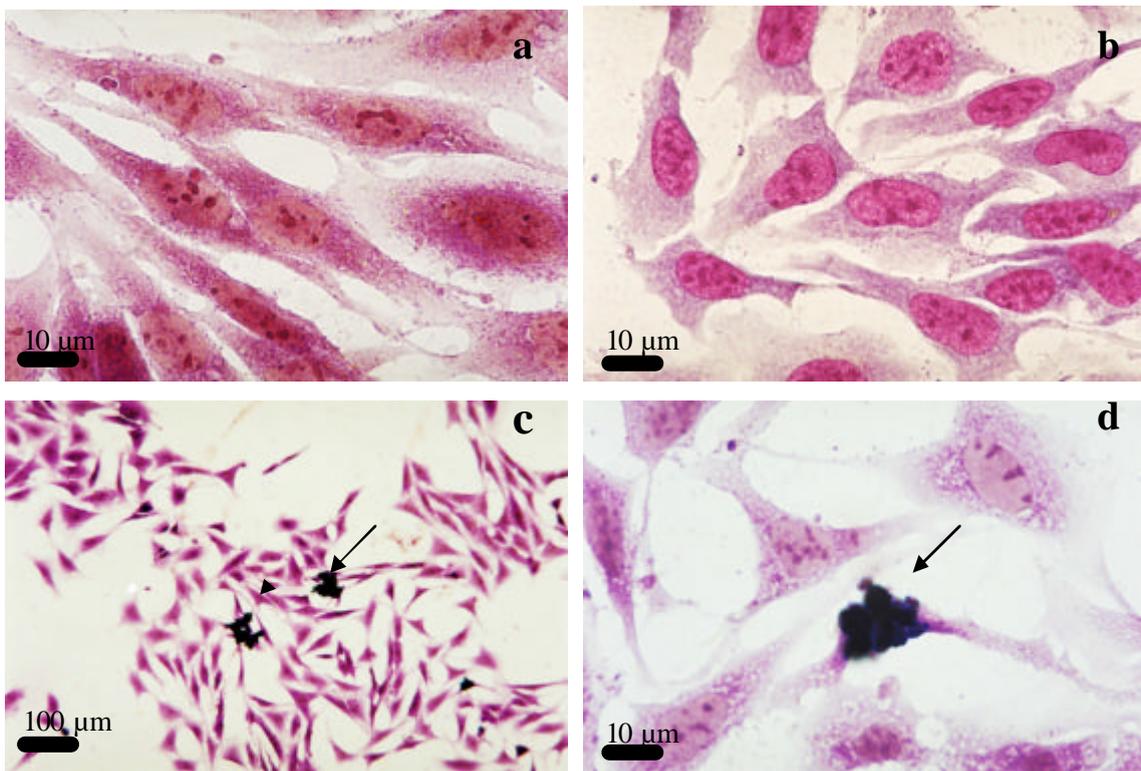


**Figura 14.** Fotomicrografias de células HSG submetidas a diferentes tratamentos: (a) controle negativo, lâmina fixada e corada com Violeta de Cresil; (b) controle negativo, corada com Giemsa; (c) e (d) 250 µg/mL de PAM, corada com Giemsa. Aumento 1000 x.

#### 4.5.2 Análise da morfologia das células CM - microscopia de luz

As células CM apresentam-se de forma irregular, possuem prolongamentos citoplasmáticos, denominados de processos citoplasmáticos primários, o que lhes confere um aspecto estrelado. Apresentam o núcleo oval, central com nucléolos evidentes (Figura 15a e 15b).

Quando tratadas com a amostra PAM, as células CM não apresentaram alterações morfológicas (Figura 15c). Entretanto, foram encontrados aglomerados de polímeros de albumina magnéticos, aparentemente não interiorizados pelas células (Figura 15d).



**Figura 11.** Fotomicrografias de células CM submetidas a diversos tratamentos: (a) controle negativo, fixado e corado com Violeta de Cresil; (b) controle negativo lâmina corada com Giemsa; (c) 250 µg/mL de PAM, corada com Giemsa (aumento total de 100x); (d) 250 µg/mL de PAM, corada com Giemsa (aumento total de 1000x); (c) e (d) setas indicam presença de aglomerados de nanopartículas magnéticas.

#### 4.5.3 Análise da ultra-estrutura das células HSG – microscopia eletrônica de transmissão

Para elucidar os efeitos de PAM sobre a ultra-estrutura das células e investigar uma possível interiorização de nanopartículas magnéticas foi feito um estudo por MET.

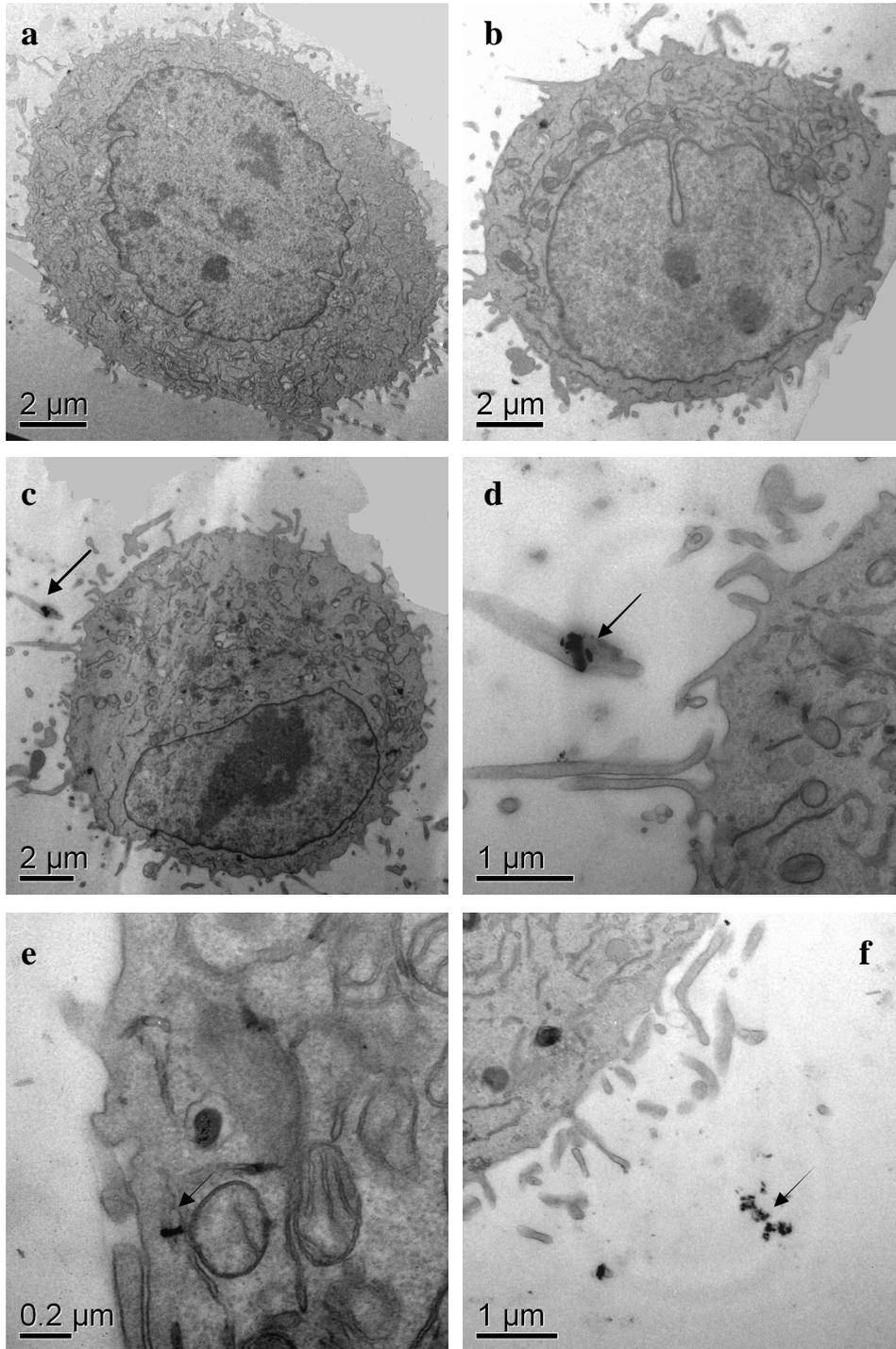
Ao MET, as células HSG apresentam forma irregular, núcleo volumoso e numerosas projeções citoplasmáticas. Seus citoplasmas são ricos em organelas membranosas, mantendo o padrão ultra-estrutural característico de células secretoras.

Quando tratadas com PAM, essas células não mostravam alterações na ultra-estrutura. Entretanto, apesar de ao microscópio de luz, não serem visualizadas nanopartículas de PAM associadas às células, ao microscópio eletrônico essas células apresentavam alguns aglomerados de nanopartículas no seu interior, alguns localizados nas projeções citoplasmáticas, como pode ser visualizado na Figura 16c e 16d. Aglomerados de NPM foram observados em maior quantidade quando dispersos no exterior das células (Figura 16f).

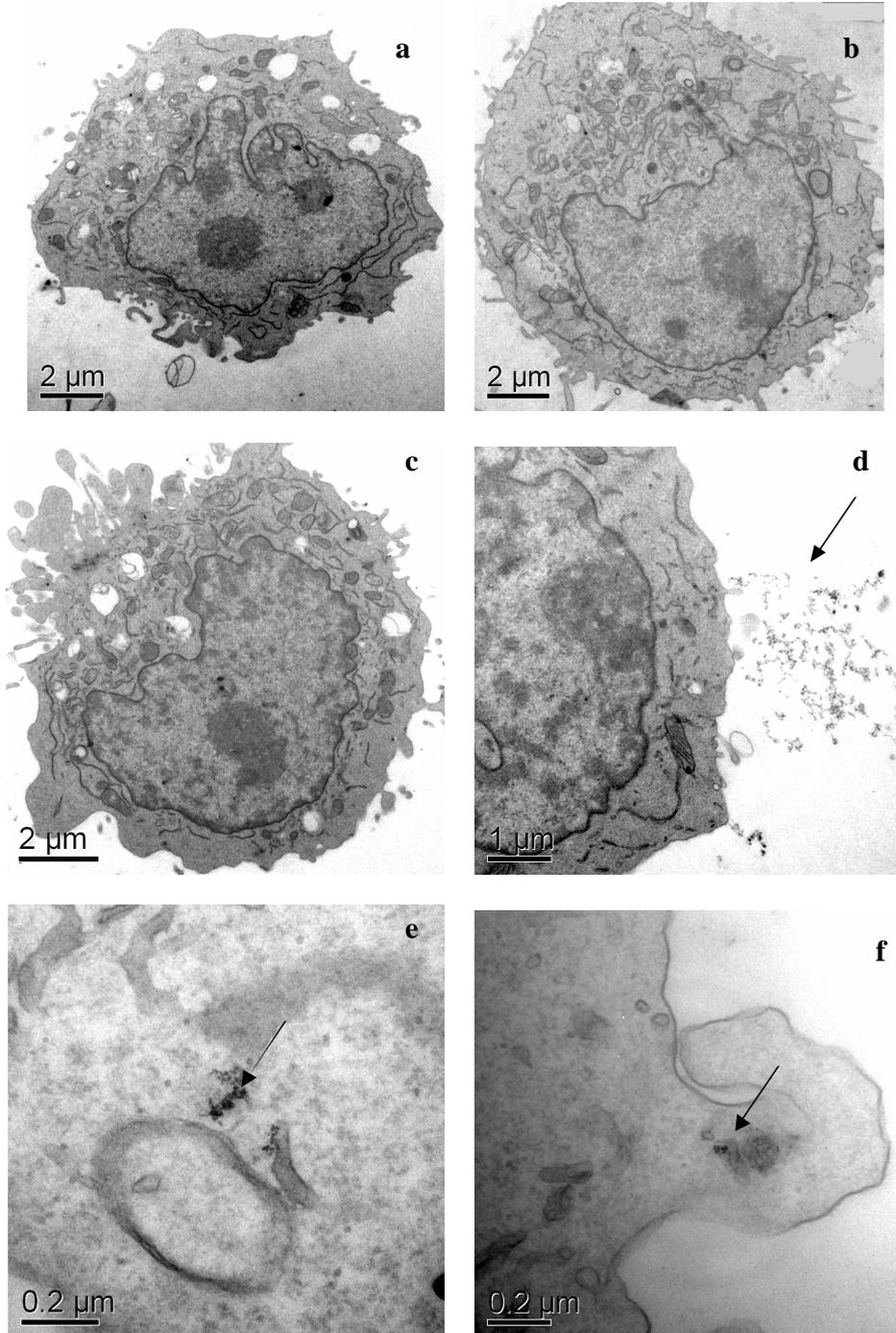
#### 4.5.4 Análise da ultra-estrutura das células CM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

Ao MET, as células CM se caracterizam por apresentarem superfície irregular com protrusões, núcleo volumoso e irregular com nucléolos evidentes. O citoplasma é rico em organelas membranosas como retículo endoplasmático, mitocôndrias ovais e complexo de Golgi desenvolvido.

Quando tratadas com PAM, as células CM também não mostravam alterações na ultra-estrutura, mas apresentavam aglomerados de nanopartículas no seu interior (Figura 17e e 17f). As micrografias mostravam maior quantidade de aglomerados de NPM no exterior das células (Figura 17d).



**Figura 16.** Fotomicrografias da ultraestrutura das células HSG submetidas a diferentes tratamentos: (a) controle negativo (aumento total 10000x); (b) 75 µg/mL de PAM (aumento total 10000x); (c) 75 µg/mL de PAM (aumento total 8000x); (d) 250 µg/mL de PAM (aumento total 30000x); (e) 175 µg/mL de PAM (aumento total 80000x); (f) 250 µg/mL de PAM (aumento total 80000x); (c), (d), (e) e (f) setas indicam presença de aglomerados de nanopartículas magnéticas.



**Figura 17.** Fotomicrografias da ultraestrutura das células CM submetidas a diferentes tratamentos: (a) controle negativo (aumento total 10000x); (b) 250  $\mu\text{g/mL}$  de PAM (aumento total 10000x); (c) 75  $\mu\text{g/mL}$  de PAM – célula em apoptose (aumento total 12000x); (d) 75  $\mu\text{g/mL}$  de PAM (aumento total 20000x); (e) 250  $\mu\text{g/mL}$  de PAM (aumento total 120000x); (f) 250  $\mu\text{g/mL}$  de PAM (aumento total 100000x); (c), (d), (e) e (f) setas indicam presença de aglomerados de nanopartículas magnéticas.

## **5. DISCUSSÃO**

Nas últimas décadas, a nanotecnologia intensificou o desenvolvimento de materiais e sistemas nanoestruturados que possam ser utilizados no tratamento de diversas patologias. Uma classe particularmente interessante de material nanoestruturado é constituída pelas nanopartículas magnéticas. No Brasil, pesquisadores do Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia da UnB (CNANO) desenvolveram uma amostra de fluido magnético iônico constituído por nanopartículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), que, subseqüentemente, foram encapsuladas em polímeros de albumina (PAM). A albumina é a proteína plasmática cuja seqüência é conservada entre as albuminas de mamíferos. A albumina humana, por exemplo, apresenta aproximadamente 75% de homologia com as seqüências das albuminas bovina e eqüina (Carter & Ho, 1994). Sua função fisiológica inclui o controle da pressão osmótica do sangue e o transporte, metabolismo e distribuição de várias substâncias endógenas ou exógenas, como hormônios, aminoácidos, ácidos graxos e íons metálicos e drogas (He & Carter, 1992). Sendo a proteína mais abundante do plasma sanguíneo, o encapsulamento das NPM em polímeros constituídos por essa proteína poderia conferir alto grau de biocompatibilidade à amostra.

Sintetizados a partir de uma amostra de fluido magnético iônico caracterizado por ter alta susceptibilidade magnética, os polímeros de albumina magnéticos também apresentam essa característica e, por conseguinte, grande potencial para aplicações biomédicas, seja como sistema entregador de fármacos ou no processo de magnetohipertermia, procedimentos promissores na terapia do câncer.

Os polímeros de albumina magnéticos utilizados neste estudo são constituídos de maghemita, óxido de ferro que se encontra na forma oxidada. O fato de estar na forma oxidada torna a maghemita menos reativa, ou seja, com menor potencial de toxicidade às células. Como demonstrado por Brugin (2007), nanopartículas de maghemita apresentam menor toxicidade do que as de magnetita, óxido de ferro que se encontra na forma reduzida.

Para serem utilizadas na área biomédica, é interessante que, no organismo, as nanopartículas magnéticas atravessem a barreira endotelial e se acumulem especificamente nas células-alvo, sem induzir dano às células normais. As nanopartículas devem, portanto, apresentar características que levam à sua biocompatibilidade (Chouly et al., 1996; Gupta & Gupta, 2005a). Dentre essas características destacam-se a natureza química das nanopartículas e sua cobertura. Em 2007, Giri e colaboradores demonstraram que

nanopartículas de natureza química diferente, mas complexadas com a mesma cobertura, o ácido láurico, induziam, em células HeLa, índices de toxicidade diferentes. Quando as nanopartículas de óxido de ferro estavam livres ou associadas a um átomo de manganês, induziam toxicidade dose-dependente e, quando associadas a um átomo de cobalto, a toxicidade era maior. Da mesma forma, Berry e colaboradores (2003b) demonstraram que nanopartículas de mesma natureza química (magnetita), mas recobertas com diferentes coberturas induziam resultados também diferentes. Esses autores mostraram que nanopartículas de magnetita recobertas com dextran induziam toxicidade em fibroblastos da linhagem HTERT-BJ1. Contudo, quando eram recobertas com albumina, induziam aumento no índice de proliferação celular.

Outro fator importante é o tamanho das nanopartículas; é necessário que as nanopartículas sejam pequenas o suficiente para que não haja precipitação, permitindo que o movimento browniano atue como agente dispersor (Silveira, 2006). Vale ressaltar que o tamanho das partículas pode também influenciar na velocidade e no tempo que essas nanopartículas levam para ultrapassar a barreira endotelial (Moghimi et al., 2001). De modo geral, nanopartículas de tamanhos reduzidos podem ser rapidamente interiorizadas pelas células. Além disso, o tamanho reduzido das partículas pode também dificultar o seu reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear.

Usando a microscopia eletrônica de transmissão (Giri et al., 2003; Hergt et al., 2004), determinou-se que o diâmetro modal das nanopartículas de magnetita encapsuladas em PAM é de 9,2 nm. Este tamanho é similar ao de amostras de nanopartículas já testadas *in vitro* (Giri et al., 2003; Gupta & Gupta, 2005b; Simioni et al., 2006; Phadran, 2007), com variados graus de compatibilidade. Alguns estudos *in vivo* (Lacava, informação pessoal) mostram que NPM com diâmetro na faixa 8-10nm apresentam características mais favoráveis às suas aplicações.

A biocompatibilidade de uma nanopartícula é também determinada pela sua incapacidade de induzir danos nas células normais. Assim, faz-se necessário a realização de testes biológicos capazes de determinar a toxicidade e a genotoxicidade das nanopartículas.

Nesse contexto, visando determinar a biocompatibilidade dos polímeros de albumina magnéticos (PAM) foram realizados no presente estudo, ensaios de toxicidade e genotoxicidade; além da avaliação da morfologia e da ultra-estrutura de células CM e HSG

cultivadas na presença de PAM. Para isso, foi necessário determinar a concentração dos polímeros a ser administrado às células; o que foi feito por meio de testes de viabilidade celular realizados por exclusão, utilizando o corante vital azul de tripan.

A partir do teste de viabilidade com azul de tripan, definiu-se que as células seriam cultivadas na presença de PAM na concentração de 250 µg/mL, por ter sido nessa concentração que a amostra de PAM induziu uma redução significativa de aproximadamente 50% e 60%, na viabilidade das células HSG e CM, respectivamente. Quando se visa analisar *in vitro* os efeitos genotóxicos de um composto, a concentração a ser utilizada deve ser definida em testes de citotoxicidade. Dessa forma, é possível estabelecer as respostas de um único composto em diferentes sistemas ou de vários compostos em um único sistema (Eisenbrand et al, 2002). Contudo, em estudos de genotoxicidade, é necessário avaliar os possíveis efeitos de concentrações mais baixas do que a citotóxica, uma vez que podem ocorrer danos ao material genético, sem necessariamente afetar a viabilidade celular. Assim sendo, neste estudo, com o objetivo de determinar se os possíveis efeitos da amostra de PAM eram dose-dependentes, também se utilizou a amostra de PAM em outras duas concentrações que correspondiam a 30% e 60% daquela que permitiu aproximadamente a viabilidade de 50% das células (250 µg/mL).

A toxicidade celular pode ser avaliada por vários testes como o de exclusão com azul de tripan (Sestier et al, 2002) e o ensaio MTT, que utiliza o sal de tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico) como marcador (Häfeli & Pauer, 1999). Este último ensaio, no entanto, não tem sido indicado para avaliar a toxicidade das nanopartículas, pois a cor delas, tanto das que se encontram no meio de cultura, como das que estão no interior das células, interfere na leitura no espectrofotômetro. Empregado neste trabalho, outro teste muito utilizado para análise de citotoxicidade é o ensaio de coloração de alaranjado de acridina e brometo de etídio, vantajoso porque além de permitir a análise da citotoxicidade, permite distinguir simultaneamente células viáveis, apoptóticas e necróticas.

Usando esse ensaio, foi possível constatar que os polímeros de albumina magnéticos apresentaram efeitos citotóxicos nas células HSG e CM. Nas células CM, a amostra PAM induziu toxicidade somente na maior concentração (250µg/mL), enquanto nas células HSG, esse efeito foi também observado com a concentração intermediária. Em um estudo similar,

Simioni e colaboradores (2006) demonstraram que a citotoxicidade de amostra de partículas de maghemita encapsuladas com albumina para fibroblastos da linhagem J774-A1 era dose-dependente. Sovinco e colaboradores (2005) mostraram ligeira citotoxicidade (sobrevivência celular superior a 75%) em três linhagens de células (HeLa, Kb e MCF7) tratadas com nanopartículas de maghemita recobertas com folato. É bom lembrar que uma substância pode ser ou não tóxica, a depender das condições, tipo celular ou dose utilizadas (Sestier et al., 2002).

O fato de a amostra PAM ter sido citotóxica para as células HSG, também na concentração intermediária, muito provavelmente reflete a maior instabilidade genética apresentada por essas células, detectável pela variabilidade no número de cromossomos (Daniels et al, 1999; Campos da Paz, 2005). É plausível supor que a instabilidade genética das células HSG é decorrente do fato de serem derivadas de tumor (Michor et al, 2005). Por outro lado, a linhagem de células CM, imortalizada a partir de uma cultura de células primárias (Banas et al, 1999), apresenta o número modal de cromossomos igual a 46, característico das células humanas não tumorais.

A citotoxicidade induzida pela amostra PAM nas duas linhagens celulares (HSG e CM) resulta de apoptose. Este tipo de morte celular ocorre individualmente, ou seja, a morte de uma célula não leva à morte de outras. A apoptose caracteriza-se por apresentar uma seqüência de alterações morfológicas bem definidas e repetitivas, tais como a redução de volume celular, formação de vacúolos e de corpos apoptóticos, além de fragmentação do DNA. Estes eventos são dependentes de energia e, ao contrário da morte celular acidental, necrose, ocorrem de forma programada. A morte celular por necrose ocorre geralmente em resposta a injúrias severas às células e caracteriza-se morfológicamente por intumescimento citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo citoplasmático. Estes eventos podem causar injúria e até a morte de células vizinhas, o que significa que na necrose uma grande quantidade de células é afetada e lesada ao mesmo tempo (Curtin et al., 2002).

Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou por estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças ambientais (Anazetti & Melo, 2007). As nanopartículas utilizadas neste estudo apresentam

ferro em sua constituição. Sabe-se que o ferro, embora seja um elemento essencial para o organismo, quando em excesso pode causar estresse oxidativo nas células, levando a formação de radicais hidroxilas e superóxido, provocando danos à membrana celular, proteínas e DNA (Halliwell & Gutteridge, 1984; Puntarulo, 2005). Desse modo, a citotoxicidade e a apoptose detectadas neste estudo podem ter sido desencadeadas por radicais livres induzidos pela presença de ferro no PAM. Em acordo, o uso de um quelante de ferro diminuiu drasticamente a toxicidade celular em estudos do efeito de NPM à base de magnetita recobertas com ácido dimercapto succínico (DMSA) (Sestier et al., 2002).

A associação entre citotoxicidade e genotoxicidade está bem estabelecida, pois danos no DNA são considerados como um importante mecanismo indutor de apoptose e necrose. Por outro lado, determinadas concentrações de diversos compostos podem induzir danos no material genético das células sem necessariamente induzi-las à morte celular, razão pela qual, neste trabalho, foram realizados testes de genotoxicidade, a fim de verificar se as concentrações da amostra PAM que não causaram citotoxicidade induziriam danos ao DNA.

O ensaio cometa tem sido considerado um dos melhores métodos para quantificar danos ao DNA, pois como Pereira (2006) discute possui uma grande sensibilidade, permitindo mensurar não somente quebras de fita dupla, mas também de fita simples, além de sítios suscetíveis a ataques alcalinos, danos oxidativos ao DNA e ligações cruzadas. Além disso, testes de genotoxicidade como o de micronúcleo e análise citogenética não seriam apropriados em linhagens celulares com instabilidade cromossômica, como as células HSG, uma vez que essa instabilidade dificultaria a distinção entre danos intrínsecos ou provocados por um tratamento experimental (Campos da Paz, 2005).

Os dados do cometa podem ser coletados por sistemas computacionais de análise de imagem, nos quais podem ser considerados diferentes parâmetros, como o comprimento da cauda formada, a porcentagem do DNA na cauda ou o momento cauda, que é produto dos dois parâmetros anteriores. Devido à indisponibilidade deste programa computacional, neste estudo foi realizada análise visual, conforme descrito por Jalonszynski e colaboradores (1997). Nessa análise é considerada apenas a extensão da cauda formada, sendo os nucleóides classificados de 0 a 4 de acordo com o comprimento da cauda. Os nucleóides classificados como de classe 1 e 2 representam nucleóides com fragmentação

moderada e os classificados como de classes 3 e 4 representam nucleóides com fragmentação intensa.

No ensaio de cometa realizado, os grupos controle negativo das células HSG e CM mostraram frequências basais de células com danos de 7% e 3,33%, respectivamente. O fato de esses parâmetros serem duas vezes maiores nas células HSG do que nas células CM confirma a maior instabilidade intrínseca das primeiras. Células geneticamente instáveis apresentam maior frequência de quebras no DNA, visto que esse tipo de alteração é o primeiro passo para os rearranjos cromossômicos e conseqüentemente, da instabilidade (Morgan et al., 1998).

Nas células HSG e CM, o tratamento com a amostra PAM induziu aumento nas frequências de células com danos no DNA e também no índice desses danos. Nas células HSG, este aumento foi significativo para todas as concentrações testadas, sendo os resultados com a amostra PAM na maior concentração, significativamente maiores do que os obtidos com as outras duas concentrações. Se somados com os dados de citotoxicidade obtidos pelo ensaio de coloração, pode-se concluir que nas células HSG pode haver genotoxicidade sem que haja citotoxicidade significativa. Esta conclusão pode também ser obtida nas células CM em que a amostra PAM induziu aumento similar nas frequências de células com danos no DNA e também no índice desses danos, enquanto a citotoxicidade significativa só é verificada na maior concentração de PAM. Até o momento não existem relatos na literatura sobre a genotoxicidade *in vitro* de nanopartículas magnéticas. Entretanto, é possível que a fragmentação do DNA induzida pela amostra PAM possa estar relacionada com a formação de radicais livres. Almeida e colaboradores (2006) mostraram intensa fragmentação do DNA quando incubaram mitocôndrias na presença do complexo  $Fe^{2+}$ -citrato e atribuíram esses danos no DNA ao ataque direto de espécies reativas de oxigênio geradas pela peroxidação lipídica mediada pelo ferro.

Para lidar com danos no DNA, as células eucarióticas tem como estratégias três componentes: o reconhecimento do DNA lesionado, um período para avaliação dos danos e a implementação de uma resposta adequada. Uma vez constatados os danos no DNA, a célula tem dois possíveis destinos: (1) interromper temporariamente o ciclo celular para tentar reparar os danos; (2) interromper o ciclo celular e entrar em apoptose. A escolha do destino celular em função do dano no DNA depende de uma rede complexa, que integra

sinais de monitoramento da integridade genômica e da disponibilidade de energia na célula. Segundo Bernstein e colaboradores (2002), se o processo de reparo de DNA, pela sua magnitude, consumir muito ATP, o que poderia ser energeticamente desfavorável, a apoptose é priorizada por meio de clivagem de proteínas pertencentes ao sistema de reparo.

Apoptose foi a principal via de degeneração celular observada neste trabalho. A literatura revela que este mecanismo está associado à frequência de células nas classes 3 e 4 (Yasuhara et al., 2003). Neste trabalho, nas células HSG tratadas com as concentrações maior, intermediária ou menor da amostra PAM, os cometas de classe 3 e 4 (danos intensos) representavam 7%, 2,3% ou 1,3%, respectivamente, do total de células com danos em cada grupo experimental. Nas células CM estes valores eram 1%, 0,7% e 0%, respectivamente. Estes valores não têm relação direta com as maiores porcentagens de apoptose apresentadas por ambos os tipos celulares após os tratamentos com PAM. Várias razões poderiam explicar este fato: a presença continuada de radicais livres, a possibilidade de que células das classes 1 e 2 também levem as células à apoptose, alterações nos mecanismos de reparo que os tornem ineficientes.

As alterações morfológicas indicativas de apoptose detectadas nas células HSG e CM pelo ensaio de coloração alaranjado de acridina e brometo de etídio, não se confirmou ao microscópio de luz. É plausível que os dados desses dois ensaios tenham sido controversos porque as células em fase tardia da apoptose se depreendem das lamínulas, ficando suspensas no meio de cultura e, subsequentemente, sendo perdidas nas diversas lavagens no decorrer da preparação das células para a microscopia de luz. Vale lembrar que pelo ensaio de alaranjado de acridina e brometo de etídio, as células detectadas em apoptose se encontravam, em sua grande maioria, em apoptose tardia. É possível que no início da apoptose as células não apresentem as alterações características desse processo, ou que essas alterações sejam muito sutis e por isso não possam ser visualizadas ao microscópio de luz. É provável que as células analisadas ao microscópio de luz representassem o conjunto de células viáveis e células em fase inicial da apoptose, já que não apresentavam nenhuma alteração morfológica evidente.

Ao microscópio de luz não foram encontradas alterações morfológicas, o que é um resultado interessante no que tange ao uso deste material nanoestruturado em aplicações biomédicas. Esta observação foi confirmada pelas análises ao microscópio eletrônico de

transmissão, mesmo na presença de alguns aglomerados de NPM interiorizados em ambos os tipos celulares. Ao microscópio de luz não foi observada a interiorização de NPM, o que pode refletir a limitação em detectar as NPM pelas colorações utilizadas ou ainda a morte das células que haviam endocitado NPM e subsequente perda da capacidade de adesão das mesmas às lamínulas investigadas.

Segundo discute Azevedo e colaboradores (2003), a interiorização das nanopartículas pelas células é um processo ativo, sendo as nanopartículas magnéticas, como todas as outras nanopartículas, seletivamente incorporadas pela membrana plasmática, em um processo que depende da estrutura molecular da membrana plasmática. Outras explicações para a interiorização de NPM têm sido descritas. Em particular, Pradhan e colaboradores (2007) discutem que este processo está relacionado com a estrutura da cobertura. No presente estudo, as nanopartículas foram encapsuladas com albumina. A utilização de albuminas (rato, bovina, ou humana) como sistemas entregadores de drogas para células tumorais é bastante conhecida (Stehle et al, 1999). As células podem endocitar as moléculas ligadas à albumina que são subsequentemente hidrolisadas nos lisossomos e liberadas dentro do citossol, onde exercem sua ação biológica (Stehle et al, 1999). Embora NPM tenham sido visualizadas, ao MET, dentro das células, é importante observar que essas não apresentavam vesículas de absorção, uma característica do processo de endocitose.

Em síntese, este estudo mostrou que o PAM (1) apresenta citotoxicidade relacionada à concentração da amostra e tipo celular; (2) induz, como principal via de degeneração, a apoptose, que é sempre menor do que 20%; (3) tem atividade genotóxica, mas, em sua maioria, os danos são de intensidade leve (classe 1 e 2); (4) em concentrações menores, pode apresentar atividade genotóxica e não ter correspondente atividade citotóxica; (5) não apresentou alterações na morfologia ou ultra-estrutura de ambas as células; (6) teve suas NPM interiorizadas por algumas células.

Nos estudos das interações nanopartícula-células realizados *in vitro* é plausível esperar efeitos mais severos do que nos efetuados *in vivo*, uma vez que os organismos vivos dispõem de uma série de mecanismos para restabelecer o equilíbrio homeostático, os quais estão ausentes em culturas de células e que, portanto, descrevem uma situação de citotoxicidade aguda. Conquanto os resultados obtidos neste trabalho apontem para a

biocompatibilidade da amostra de polímeros de albumina magnéticos, outros estudos deverão ser realizados de modo a estabelecer um modelo experimental *in vivo* para esclarecer melhor sobre a biocompatibilidade dos polímeros de albumina magnéticos.

## **6. CONCLUSÃO**



Com bases nos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que, nas condições experimentais utilizadas, a amostra PAM:

- 1 possui nanopartículas magnéticas com diâmetro modal igual a 9,2nm;
- 2 apresenta citotoxicidade relacionada à concentração da amostra e tipo celular;
- 3 induz apoptose, sempre em menos de 20%, tanto nas células HSG, quanto nas CM, evidenciáveis pelo ensaio de coloração e análise ao MET;
- 4 tem atividade genotóxica nas células HSG e CM, mas, em sua maioria, os danos são de intensidade leve (classe 1 e 2);
- 5 em concentrações menores, pode apresentar atividade genotóxica e não ter correspondente atividade citotóxica;
- 6 não induz alterações morfológicas nas células HSG ou CM aderidas às lamínulas de vidro, evidenciáveis ao microscópio de luz;
- 7 não induz alterações ultra-estruturais na maioria das células HSG e CM, evidenciáveis ao MET;
- 8 é interiorizado nas células HSG e CM, conforme revelado pela presença de pequeno número de corpos eletrondensos, característicos de nanopartículas, ao MET;
- 9 tem potencial para uso em aplicações biomédicas e, portanto, deve ser investigada por testes *in vivo*.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALEXIOU, C.; JURGONS, R.; SCHMID, R.; HILPERT, A.; BERGEMANN, C.; PARAK, F.; IRO, H. In vitro and in vivo investigations of targeted chemotherapy with magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 293: 389–393; 2005.
- ALMEIDA, A. M., BERTONCINI, C. R. A., BORECKY, J. Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe<sup>2+</sup>-citrate. **Academia Brasileira de Ciências** 78: 505-514, 2006.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa** 1: 37-58, 2007. Disponível em [www.metrocamp.com.br/pesquisa](http://www.metrocamp.com.br/pesquisa), acessado 20/11/2007 APUD Kerr, 2002.
- ARRUEBO, M.; PACHECO, R. F.; IBARRA, M. R.; SANTAMARÍA, J. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery. **Nano today** 2: 22- 32; 2007.
- ATSUMI, T.; IWAKURA, I.; FUJISAWA, S. UEHA, T. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. **Biomaterials** 22: 1459-1466; 2001.
- AZEVEDO, R. B.; SILVA, L. P.; LEMOS, A. P. C.; BÁO, S.; LACAVA, Z. G. M.; SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M.; MORAIS, P. C.; Morphological study of *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with magnetic fluid **IEEE Transactions on Magnetism** 39: 1, 2003.
- BANAS, B.; LUCKOW, B.; MÖLLER, M.; KLIER, C.; NELSON, P. J.; SCHADDE, E.; BRIGL, M.; HALEVY, D.; HOLTHÖFER, H.; REINHART, B.; SCHLÖNDORFF, D. Chemokine and Chemokine Receptor Expression in a Novel Human Mesangial Cell Line. **Journal of the American Society of Nephrology** 10: 2314–2322, 1999.
- BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C. M.; GAREWAL, H. DNA repair/proapoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: failsafe protection against carcinogenesis. **Mutation Research** 511: 145-178, 2002.
- BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of physics d: applied physics** 36: R198–R206; 2003a.
- BERRY, C. C.; WELLS, S.; CHARLES, S.; CURTIS, A. S. G. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. **Biomaterials** 24: 4551–4557, 2003b.
- BRUGIN, A. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas** *Swiss*. 2007, 57 f. Dissertação de Mestrado. Instituto de biologia – Departamento de genética e morfologia, Universidade de Brasília. 2007.

- BSD MEDICAL CORPORATION FOR INFORMATIONAL PURPOSES.  
**Hyperthermia as a Cancer Therapy.** 2002
- CAMPOS DA PAZ, M. **Citotoxicidade induzida pelo extrato de Pteridium aquilinum sobre células HSG e OSCC.** 2005. Dissertação de Mestrado. Instituto de biologia – Departamento de biologia molecular, Universidade de Brasília. 2005.
- CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogen. ICPEMC publication n°. 14. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research** 204 (3): 379-406; 1988.
- CARTER, D. C.; HO, J.X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry** 45:153-203; 1994.
- CHAN, W. C. W. Bionanotechnology Progress and Advances. **Biology of Blood and Marrow Transplantation** 12:87-91; 2006.
- CHEN, W.; SHEN, H.; LI, X.; JIA, N.; XU, J. Synthesis of immunomagnetic nanoparticles and their application in the separation and purification of CD34+ hematopoietic stem cells. **Applied Surface Science** 253: 1762–1769; 2006.
- CHOULY C, POULIQUEN D, LUCET I, JEUNE JJ, JALLET P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. **Journal of microencapsulation** 3:245–255, 1996.
- CHOY, C. K. M.; BENZIE, I. F. F.; CHO, P. UV –mediated DNA strand breaks in corneal epithelial cells assessed using the comet assay procedure. **Photochemical Photobiology.** 2005 Oct.1
- CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods** 265: 49-72, 2002.
- DANIELS, P. J.; MCARTHUR, C.; HERUTH, D. P.; ROTHBERG, P. G.; PAZTOR, L.; WANG, Y. Cytokine-mediated stimulation of laminin expression and cell-growth arrest in a human submandibulae gland duct-cell line (HSG). **Archives of oral biology** 44:603-615, 1999.
- DANIELS, P. J.; GUSTAFSON, S. A.; FRENCH, D.; WANG, Y.; DEPOND, W.; MCARTHUR, C. P. Interferon-mediated block in cell cycle and altered integrin expression in differentiated salivary gland cell line (HSG) cultured on matrigel. **Journal of Interferon and Cytokine Research** 20: 1101-1109; 2000.
- EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.-C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology** 40: 193-236, 2002.

- FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; BOEDECKER, R. H.; MANN, M.; MERSCH-SUNDERNMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research**. 566:209-229, 2004
- FRACASSO, M. E.; FRANCESCHETTI, P.; DORIA, D.; TALAMINI, G.; BONETTI, F. DNA breaks as measured by the alkaline comet assay in exfoliated cells as compared to void urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: a study of 105 subjects. **Mutation Research** 564: 57-64; 2004.
- GIRI, J.; PRADHAN, P.; SOMANI, V.; CHELAWATA, H.; CHHATRE, S.; BANERJEE, R.; BAHADUR, D. Synthesis and characterizations of water-based ferrofluids of substituted ferrites [ $\text{Fe}_{1-x}\text{B}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ , B  $\frac{1}{4}$  Mn, Co (x  $\frac{1}{4}$  0–1)] for biomedical applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** in press, 2007.
- GOETZE, T.; GANSAU, C.; BUSKE, N.; ROEDER, M.; GORNERT, P.; BAHR, M. Biocompatible magnetic core/shell nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 252: 399, 2002.
- GUEDES, M. H. A.; SADEGHIANI, N.; LIMA, D. G. P.; COELHO, J. P., BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, R. B.; KÜCKELHAUS, S.; SILVA, M. F.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Effects of AC magnetic field and carboxymethyl dextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 293: 283–286, 2005.
- GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. **Biomaterials** 26: 1565–1573, 2005a.
- GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials** 26: 3995–4021; 2005b.
- HÄFELI, U. O.; PAUER, G. J. In vitro and in vivo toxicity of magnetic microspheres. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 194: 76, 1999.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal** 219, 1–14, 1984
- HARISINGHANI, M. G.; WEISSLEDER, R. Sensitive, Noninvasive Detection of Lymph Node Metastases. **Plos Medicine** 1: 202 – 209; 2004.
- HARISINGHANI, M. G.; SAKSENA, M.; ROSS, R. W.; TABATABAEI, S.; DAHL, D.; MCDUGAL, S.; WEISSLEDER, R. A pilot study of lymphotropic Nanoparticle-enhanced magnetic resonance Imaging technique in early stage testicular Cancer: a new method for noninvasive Lymph node evaluation. **Adult urology** 66: 1066–1071; 2005.

- HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature** 358:209-215; 1992.
- HERGT, R.; HIERGEIST, R.; HILGER, I.; KAISER, W.A.; LAPATNIKOV, Y.; MARGEL, S.; RICHTER, U. Maghemite nanoparticles with very high AC-losses for application in RF-magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 270: 345–357; 2004
- HILDEBRANDT, B.; WUST, P.; AHLERS, O.; DIEING, A.; SREENIVASA, G.; KERNER, T.; FELIX, R.; RIESS, H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 43: 33–56; 2002.
- HILGER, I.; HERGT, R.; KAISER, W. A. Towards breast cancer treatment by magnetic heating. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 293: 314–319; 2005.
- ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 100:1–11; 2005.
- ITO, A.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of ‘‘heat-controlled necrosis’’ with heat shock protein expression. **Cancer Immunology, Immunotherapy** 55: 320–328; 2006.
- JALONSYNSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-SWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J.; SZYFTER, K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. **Mutation research** 385: 223-233, 1997.
- JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; WUST, P.; HLING, H. F.; FELIX, R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 201: 413 -419; 1999.
- KANEKO, T.; TAHARA, S.; TAGUCHI, T.; KONDO, H. Accumulation of oxidative DNA damage, 8-oxo-2'-deoxyguanosine and change of repair systems during in vitro cellular aging of cultures human skin fibroblast. **Mutation Research** 487: 19-30; 2001.
- KOSMIDER, B.; ZYNER, E.; OSIECKA, R.; OCHOCKI, J. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt (II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, 563: 61-70; 2004.
- LACAVA, Z. G. M. ; LACAVA, L. M. ; FONSECA, M. J. P. ; SOUZA, T. M. M. ; PEREIRA, L. O. ; SILVA, O. ; PELEGRINI, F. ; SABOLOVIC, D. ; SESTIER, C. ; AZEVEDO, R. B.; BUSKE, N. ; MORAIS, P. C. Magnetic Resonance and Light Microscopy Investigation of Raw Cells Treated with Dextran-Based Magnetic Fluid. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 42, p. 3599-3601, 2006

- LANG, D.; TERSTESSE, M.; DOHLE, F.; BANGEN,P.; BANAS,B.; PAUELS, H.; HEIDENREICH, S. Protein kinase C (PKC) dependent induction of tissue factor (TF) by mesangial cells in response to inflammatory mediators and release during apoptosis. **British Journal of Pharmacology** 137: 1116-1124, 2002.
- LEE, M.; KWON, J.; CHUNG, M. Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. **Mutation Research** 541: 9 – 19; 2003.
- LEE, S. W.; BAE, S.; TAKEMURA, Y.; SHIM, I. B.; KIM, T. M.; KIM, J.; LEE, H. J.; ZURN, S.; KIM, C. S. Self-heating characteristics of cobalt ferrite nanoparticles for hyperthermia application. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 310: 2868–2870; 2007.
- LIU, T.; BROUHA, B.; GROSSMAN, D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. **Oncogene** 23: 39-48, 2004.
- LÜBBE. A. S.; BERGEMANN, C.; RIESS, H.; SCHRIEVER, F.; REICHARDT, P.; POSSINGER, K.; MATTHIAS, M.; DÖRKEN, B.; HERRINANN, F.; GURTLER, R.; HOHENBERGER, P.; HAAS, N.; SOHR, R.; SANDER, B.; LEMKE, A. J.; OHLENDORF, D.; HUHN, W.; HUHN, D. Clinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: A Phase I Study with 4'-Epidoxorubicin in 14 Patients with Advanced Solid Tumors. **Cancer Research** 56: 4686-4693; 1996.
- MATSUNAGA, T.; TAKAHASHI, M.; YOSHINO, T.; KUHARA, M.; TAKEYAMA, H. Magnetic separation of CD14+ cells using antibody binding with protein A expressed on bacterial magnetic particles for generating dendritic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 350: 1019–1025; 2006.
- MENEZES, T. O. **Efeito da pioglitazona sobre a atividade transcricional do promotor TNF – a em células mesangiais.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. 2005.
- MICHOR, F.; IWASA, Y.; VOGELSTEIN, B.; LENGAUER, C.; NOWAK, M.A. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? **Seminars in Cancer Biology** 15: 43-49, 2005.
- MOGHIMI, S.M.;HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long circulating and target specific nanoparticles: theory to practise. **Pharmacological Reviews** 53:283–318,2001.
- MORGAN, W. F.; CORCORAN, J.; HARTMANN, A.; KAPLAN, M. I.; LIMOLI, C. L.; PONNAIYA, B. DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. **Mutation Research** 404: 125-128, 1998.
- NASCHIE, M. S. EL. Nanotechnology for the developing world. **Chaos, Solitons and Fractals** 30: 769–773; 2006.

- NEUBERGER, T.; SCHÖPFA, B.; HOFMANNB, H.; HOFMANN C, M.; RECHENBERG, B. V. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 293: 483–496; 2005.
- NISHIMURA, H.; TANIGAWA, N.; HIRAMATSU, M.; TATSUMI, Y.; MATSUKI, M.; NARABAYASHI, I. Preoperative Esophageal Cancer Staging: Magnetic Resonance Imaging of Lymph Node with Ferumoxtran-10, an Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide. **Journal American College of Surgeons** 202: 604 – 611; 2006.
- OLIVER, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “ Comet Assay”. **Radiation Research** 122: 86 -94; 1990.
- PEREIRA, L. O. **Apoptose Induzida por Extrato de Pteridium aquilinum em Células de Glândula Submandibular Humana (HSG) e de Epitélio Bucal (OSCC-3)**. 2006. Dissertação de Mestrado. Faculdade de biologia – Departamento de biologia molecular, Universidade de Brasília. 2006.
- PRADHAN, P.; GIRI, J.; BANERJE, R.; BELLAR, J.; BAHADUR, D. Cellular interactions of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 311: 282–287, 2007.
- PUNTARULO, S. Iron, oxidative stress and human health. **Molecular Aspects of Medicine** 26:299–312, 2005.
- REITH M. Nano-engineering in science and technology: an introduction to the world of nanodesign. **Series on the Foundations of Natural Science and Technology**, V.6, World Scientific, New Jersey, 2003.
- SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. **Journal of Chromatography B**, 722: 33–53; 1999.
- SESTIER, C.; LACAVA, Z. G. M. ; LACAVA, L. M. ; DA SILVA, M. F. ; AZEVEDO, R. B. ; BUSKE, N. ; GANSAU, C. ; MORAIS, P. C. ; SILVA, O. ; PELEGRINI, F.; SABOLOVIC, D. In vitro toxicity of magnetic fluids evaluated for macrophage cell lines. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** .252: 403, 2002.
- SONVICO, F.; MORNET, S.; VASSEUR, S.; DUBERNET, C.; JAILLARD, D. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. **Bioconjugate Chemical** 16: 1181-1188, 2005.
- SHIRASUNA, K.; SATO, M.; MIYAZAKY, T. A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. **Cancer** 48: 745; 1981.

- SILVEIRA, E. B.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, 35: 129-139, 2003.
- SILVEIRA L. B. **Estudos de propriedades magnéticas de fluídos e nanocompósitos magnéticos biocompatíveis**. 2006. Tese de Doutorado em Física, UnB - Universidade de Brasília, 2006.
- SIMIONI, A. R.; MARTINS, O. P.; LACAVALA Z.G.M.; AZEVEDO R. B.; LIMA, E. C.; LACAVALA, B. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Cell toxicity studies of albumin-based nanosized magnetic beads. **Journal of Nanoscience Nanotechnology** 6:2413 – 2415; 2006.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell Research** 175: 184-191, 1998.
- SREENIVASA, G.; HILDEBRANDT, B.; KÜMMEL, S.; JUNGnickel, K.; CHO, C. H.; TILLY, W.; BÖHMER, D.; BUDACH, V.; FELIX, R.; WUST, P. Radiochemotherapy combined with regional pelvic Hyperthermia induces high response and respectability Rates in patients with nonresectable cervical cancer >figo iib “bulky. **I. J. Radiation Oncology ? Biology ? Physics** 66: 1159–1167; 2006.
- STEHLE, G.; WUNDER, A.; SCHRENK, R. R.; HARTUNG, G.; HEENE, D. L.; SINN, H. Albumin-based drugs carriers: comparation between serum albumin of different species on pharmacokinetics and tumor uptake of the conjugate. **Anti-cancer Drugs** 10:785-790, 1999.
- STROBER, W., COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A., MARGULIES, D.H., SHEVACH, E.M. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology III**: A.3B.1–A.3.B.2; 1997.
- TAKAHASHI, A.; MATSUMOTO, H.; YUKI, K.; YASUMOTO, J.; KAJIWARA, A.; AOKI, M.; FURUSAWA, Y.; OHNISHI, K.; OHNISHI, T. High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of status. **International Journal of Radiation Oncology\*Biological\*Physics**. 60 (2): 591-597; 2004.
- TANAKA, K.; ITO, A.; KOBAYASHI, T.; KAWAMURA, T.; SHIMADA, S.; MATSUMOTO, K.; SAIDA, T.; HONDA, H. Heat Immunotherapy Using Magnetic Nanoparticles and Dendritic Cells for T-Lymphoma. **Journal of bioscience and bioengineering** 100: 112–115; 2005.
- TATSUMI, Y.; TANIGAWA, N.; NISHIMURA, H.; NOMURA, E.; MABUCHI, H.; MATSUKI, M.; NARABAYASHI, I. Preoperative diagnosis of lymph node metastases in gastric cancer by magnetic resonance imaging with ferumoxtran-10. **Gastric Cancer** 9(2):120-8; 2006.

- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicologic testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 35 (3): 206-221; 2000.
- WANG, X.; GU, H.; YANG, Z. The heating effect of magnetic fluids in an alternating magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 293: 334-340; 2005.
- WÖRNLE, M.; SCHMID, H.; MERKLE, M.; BANAS, B. Effects of chemokines on proliferation and apoptosis of human mesangial cells. **BMC Nephrology** 5: 1-14, 2004.
- WUST, P.; HILDEBRANDT, B.; SREENIVASA, G.; RAU, B.; GELLERMANN, J.; RIESS, H.; FELIX, R.; SCHLAG, P. M. Hyperthermia in combined treatment of cancer. **The lancet oncology** 3: 487-497; 2002.
- YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **Journal Histochemical and Cytochemical** 51: 873-885, 2003.