



**Universidade de Brasília Faculdade de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia**

Efeitos a longo prazo da administração endovenosa de nanopartículas magnéticas à base de maghemita funcionalizadas com DMSA mediante análises hematológicas, imaginológica e histológica

Aline Ramos Marques Marangon

Brasília, 2019

**ALINE RAMOS MARQUES MARANGON**

Efeitos a longo prazo da administração endovenosa de nanopartículas magnéticas à base de maghemita funcionalizadas com DMSA mediante análises hematológicas, imaginológica e histológica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Paulini

Brasília, 2019

## DEDICATÓRIA

Mais do que máquinas precisamos de humanidade. Mais do que inteligência precisamos de afeição e doçura. Sem essas virtudes a vida será de violência e tudo estará perdido (Charles Chaplin)

Nunca se vence uma guerra lutando sozinho (Raul Seixas).

## AGRADECIMENTOS

É durante um período de dificuldades e exigências que são rompidas barreiras nunca antes imaginadas. É com alegria que encerro mais um ciclo de desafios. Não é fácil vestir todos os personagens que a vida nos exige e por isso e em função disso sou grata a cada um aqui disposto:

- Como de praxe, à Deus, por ter estado sempre comigo, por me fazer sentir como sua filha amada e diariamente abençoada em nossas conversas informais matinais. Obrigada por ter-me permitido multiplicar-me e conseguir me desdobrar em todos os meus papéis assumidos até aqui. Sem ti, nada seria possível.
- Aos meus filhos amados, metade de mim, que me permitem ser inteira, por terem me escolhido, acolhido, me ajudado a tabular dados, perguntado a mim a cada reunião com minha orientadora: “E aí mãe, ganhou elogio?”. Observarem e aprenderem com o exemplo como apenas o conhecimento nos faz crescer e engrandecer. Não sintam orgulho, eu que me orgulho por estarem presentes.
- À família que construí e constituí na figura de Lucas que me acolhe e entende (ou tenta entender) a importância que este grande passo têm para mim.
- À família do laboratório que me recebeu cada qual com sua particularidade, com coleguismo, cooperação, e acima de tudo cumplicidade. Em especial à Juliana e Vanessa, obrigada pela presença de sempre.
- Às amigas de vida sempre presentes, me acalmando, me nutrindo de amor e cumplicidade. Obrigada por não terem me deixado enlouquecer. Por cada sorriso, olhar terno, ouvido aberto e lenço fornecido. Pelos meus companheiros de viagem que não seguiram comigo, respeito vossas escolhas; que um dia na estação da vida possamos nos olhar e termos a paz no coração de que fizemos nosso melhor.
- Aos meus parceiros de trabalho dentro da ultrassonografia por tantas e tantas vezes encaixaram suas necessidades às minhas.
- À Secretaria de Educação do Distrito Federal e em especial à minha chefe e equipe da Corregedoria, por terem acreditado, me cedido e afastado do trabalho árduo diário para poder me dedicar à esta missão.
- E finalmente à esta tese que permitiu-me reinventar-me mais uma vez, expandindo meus conhecimentos e capacidades e provando-me que somos seres ilimitados e que tudo podemos enquanto acreditarmos.

**Não foi fácil, mas também ninguém disse que seria.**

## **AGRADECIMENTOS PROFISSIONAIS:**

Gostaria de agradecer imensamente à Universidade de Brasília por ter me recebido de braços abertos, uma casa que já foi minha e que convivi novamente durante dois anos. Ao Programa de Pós Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia na figura da minha Orientadora, Professora, mãezona (no sentido literal da palavra) Carolina Madeira Lucci. À minha coorientadora Fernanda Paulini por ter me adotado e devotado à mim todo o estoque de carinho e paciência.

Agradecimentos infindáveis ao INCT Nanobiotecnologia, aos laboratórios cedidos ao longo do experimento nas figuras do Professor Ricardo e Professora Zulmira e ao Biotério. Obrigada Professor Marcelo Henrique pela síntese e caracterização das nanopartículas.

Grata pelo trabalho não menos importante, mas essencial da Médica Veterinária Marcelle Lemos pelas anestésias nos procedimentos, à aluna de Medicina Veterinária Carolina Leme de Azevedo pelo acompanhamento, monitoramento e ajuda na manutenção das cobaias e coleta de dados.

À Scan Medicina Diagnóstica pela cessão das tomografias computadorizadas.

## RESUMO

Materiais nanoestruturados têm sido amplamente estudados, especialmente em relação à sua potencial aplicação como agentes de liberação de fármacos e terapias contra o câncer. As nanopartículas de maghemita revestidas com DMSA (FM – DMSA) foram estudadas anteriormente quanto à sua biocompatibilidade e toxicidade, *in vitro* e *in vivo*, mas os estudos avaliam apenas os efeitos a curto prazo (30 a 90 dias). Este trabalho teve o objetivo de estudar os efeitos a longo prazo de nanopartículas de maghemita revestidas com DMSA por meio de análises hematológicas, de imagem e histológicas. O experimento consistiu na injeção intravenosa de um fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com DMSA. Ratas Wistar fêmeas (N = 15) foram divididas em três grupos compostos por 5 animais cada: controle (receberam 100 µL de solução salina), T0,5 (receberam 100 µL de fluido magnético a 0,5 mg Fe / Kg) e T5 (receberam 100 µL de fluido magnético a 5 mg Fe / Kg) e este foi considerado dia zero (D0). Os animais foram submetidos a avaliações hematológicas (hematócrito e bioquímicos) mensais e ultrassonográficas (Mindray Z5Vet com sonda microconvexa 10Mz) nos dias 120, 180, 210, 240, 270 e 300 após o tratamento, completando 10 meses de acompanhamento e terminando este período com eutanásia e coleta de órgãos para histopatologia. Os órgãos avaliados pela ultrassonografia foram rins e baço (ecogenicidade, volume e índice de resistividade vascular pelo Doppler), fígado e pulmão (ecogenicidade do parênquima). À interpretação dos valores hematológicos não foi observada nenhuma variação significativa que pudesse ser correlacionada com a administração da FM – DMSA. Nas ultrassonografias, foram visualizadas, em animais tratados, alterações renais compatíveis com dilatação da pelve renal (hidronefrose). Aos 4 meses, apenas um animal do grupo T 0,5, apresentou essa alteração que se repetiu aos 6, 7 e 9 meses. Aos 6 meses, o animal 1 deste mesmo grupo apresentou tal alteração, que foi vista novamente aos 9 meses. Ainda no grupo T 0,5, dois outros apresentaram hidronefrose aos 7, 8 e 10 meses. Quanto ao grupo T5, todos os animais, em algum momento do experimento, apresentaram hidronefrose. A alteração foi mais consistente aos 10 meses quando quatro dos cinco animais apresentaram hidronefrose. As demais alterações foram observadas de forma isolada, sendo assim: T5 – 1 aos 7 meses, T5-2 e 3 aos 10 meses, T5-4 aos 8 e 10 meses. O animal 5 foi o que apresentou mais vezes: aos 8, 9 e 10 meses. No grupo controle, apenas um animal apresentou hidronefrose no 8º mês, achado que não foi mais observado nos meses subsequentes. Na análise histopatológica, a dilatação pélvica também foi observada nos animais 4 e 5 do grupo T0,5 e nos animais 1, 2, 3 e 5 do grupo T5, mas nenhum dano ao parênquima renal foi observado. Os demais órgãos não apresentaram alterações sugestivas de lesão tecidual na análise ultrassonográfica, no entanto, os pulmões dos animais dos grupos tratados apresentaram espessamento de septo alveolar. Em conclusão, com base nas avaliações realizadas, a administração endovenosa de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com DMSA nas concentrações testadas é segura e não causa dano tecidual no fígado e baço por até 300 dias. Os achados renais não são consistentes com danos graves ao órgão, especialmente porque não há envolvimento do parênquima renal. Os danos observados em parênquima pulmonar precisam ser mais estudados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nanobiotecnologia; histopatologia; nanotoxicidade; ultrassonografia; hemograma; pulmão; hidronefrose.

## ABSTRACT

Nanostructured materials have been widely studied, especially regarding to their potential application as drug agents and cancer therapies. DMSA - coated maghemite nanoparticles (FM - DMSA) have been studied for their biocompatibility and toxicity, *in vitro* and *in vivo*, but the studies only evaluate the short - term effects (30 to 90 days). This work had the objective to study the long-term effects of DMSA-coated maghemite nanoparticles by means of hematological, imaging and histological analyzes. The experiment consisted of the intravenous injection of a magnetic fluid composed of DMSA – coated maghemita nanoparticles. Female Wistar rats (N = 15) were divided in to three groups composed of 5 animals each: control (receiving 100  $\mu$ L of saline solution), T0.5 (receiving 100  $\mu$ L of magnetic fluid at 0.5 mg Fe / Kg) and T5 (receiving 100  $\mu$ L of magnetic fluid at 5 mg Fe / Kg) and this was considered the “day zero” (D0) of the experiment. The animals were submitted monthly to blood analysis (biochemical and hematological) and ultrasound evaluations (Mindray Z5Vet with microconvex probe 10Mz) at days 120, 180, 210, 240, 270 and 300 after treatment, completing 10 months of follow up and at the end of this period they were euthanasiated and organs were collected for histopathology. The organs evaluated by ultrasonography were kidneys and spleen (echogenicity, volume and vascular resistivity index by Doppler), liver and lung (echogenicity of the parenchyma). The interpretation of the hematological values did not show any significant variation that could be correlate with the FM - DMSA administration. Ultrasonography revealed renal alterations compatible with renal pelvis expansion (hydronephrosis) in treated animals. At 4 months, only one animal in T 0.5 group (animal 3) presented this alteration, which was recurrent at 6, 7 and 9 months. At 6 months, another of this same group presented such alteration, which was seen again at 9 months. Still in the T 0.5 group, two other different animals presented hydronephrosis at 7, 8 and 10 months. As for the T5 group, all animals, at some point in the experiment, presented hydronephrosis. The change was more consistent at 10 months when four of the five animals had hydronephrosis. Specifically, the alterations observed were as follows: T5 - 1 at 7 months, T5-2 and 3 at 10 months, T5-4 at 8 and 10 months. Animal 5 presented the most: at 8, 9 and 10 months. In the control group, only one animal (1) presented hydronephrosis in the 8th month, a finding that was not observed in the subsequent months. In the histopathological analysis, pelvic dilation was seen in animals 4 and 5 of the T0.5 group and in the animals 1, 2, 3 and 5 of the T5 group, but no damage to the renal parenchyma was observed. The other organs did not show changes suggestive of tissue lesion in the histopathological analysis, however, the lungs of the animals of the treated groups showed thickening of the alveolar septum. In conclusion, based on the evaluations performed, intravenous administration of DMSA - coated maghemite nanoparticles at the concentrations tested is safe and does not cause tissue damage in the liver and spleen for up to 300 days. Renal findings are not consistent with severe damage to the organ, especially since there is no involvement of the renal parenchyma. Damage observed in pulmonary parenchyma needs to be further studied.

**KEY WORDS:** Nanobiotechnology; histopathology; nanotoxicity; ultrasonography; blood analysis; lung; hydronephrosis.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	01
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	02
<b>JUSTIFICATIVA</b>	12
<b>OBJETIVOS</b>	
Objetivo Geral	13
Objetivos Específicos	13
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	14
<b>RESULTADOS</b>	19
<b>DISCUSSÃO</b>	37
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	42
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	43
<b>APÊNDICES</b>	47

## 1. INTRODUÇÃO

A Nanobiotecnologia tem se desenvolvido grandemente nos últimos anos, oferecendo ao campo biomédico uma gama de novas possibilidades de tratamento e diagnóstico. Especial atenção merecem as nanopartículas magnéticas, as quais tem sido largamente estudadas. Ensaio experimentais estão sendo incessantemente realizados *in vitro* e *in vivo* para que se tenha conhecimento dos efeitos da administração destes compostos. Estudos *in vivo* são necessários, pois é por meio deles que se compreende os efeitos da administração das nanopartículas magnéticas no organismo como um todo. Vários estudos *in vivo* já foram realizados com nanopartículas de magnetita e maghemita, avaliando seus efeitos em diferentes órgãos e sistemas do organismo a curto e médio prazo. Estes estudos têm mostrado que as nanopartículas magnéticas provocam alguns efeitos no organismo, mas que, de modo geral, sua administração é segura. No entanto, possíveis efeitos a longo prazo ainda não foram avaliados.

Este trabalho apresenta o acompanhamento a longo prazo (por um período de 300 dias) de animais que receberam nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA por via endovenosa. Os animais foram sistematicamente avaliados por meio de exames hematológicos e ultrassonográficos, que são métodos de diagnóstico não invasivos, permitindo o acompanhamento dos mesmos animais ao longo do tempo. Desta forma este trabalho dá mais um passo na investigação da segurança da administração de nanopartículas magnéticas, trazendo o diferencial de demonstrar a evolução dos animais a longo prazo por meio de técnicas não invasivas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### As nanopartículas magnéticas e seus efeitos no organismo

A nanotecnologia tem sido o foco de diversos estudos na área de biomedicina, na tentativa de desenvolver novas estratégias terapêuticas para as mais diversas enfermidades. Dentro deste campo, as nanopartículas magnéticas merecem destaque. Nanopartículas magnéticas são nanopartículas de óxido de ferro, mais comumente magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e sua forma oxidada maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Dentre as aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas, pode-se destacar três: 1) Liberação Controlada de Fármacos; 2) Hipertermia; 3) Imagem por Ressonância Magnética (revisado por Gupta & Gupta, 2005).

A citotoxicidade das nanopartículas magnéticas têm sido objeto de intensa investigação. Muitos estudos têm sido desenvolvidos com ensaios *in vitro* (Jeng & Swanson, 2006; Delcroix *et al.*, 2009; Naqvi *et al.*, 2009; Souza, 2011). No entanto, apesar desta avaliação de citotoxicidade de determinadas nanopartículas em determinados tipos celulares *in vitro* fornecer informações importantes, estes dados são insuficientes quando isolados. Isto porque, estes estudos não fornecem informação sobre o impacto destas nanopartículas no organismo vivo como um todo (Villiers *et al.*, 2009). Para que as aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas seja seguras, não testes *in vivo* precisam ser realizados com o intuito de conhecer seus efeitos no organismo, tanto a curto prazo quanto a longo prazo.

Alguns trabalhos já reportam os efeitos de nanopartículas magnéticas *in vivo*. Lacava *et al.* (2002) administraram nanopartículas de magnetita cobertas com dextran em camundongos intravenosamente e analisaram a biodistribuição por ressonância magnética de 5 a 90 minutos. Com 10 minutos a concentração no sangue já estava diminuída. Fígado e baço foram os órgãos que apresentaram maior concentração das nanopartículas durante todo o tempo estudado. Já pulmão, coração, cérebro, pâncreas e rins não apresentaram nanopartículas em parênquima em nenhum momento. Em estudo subsequente, Lacava *et al.* (2003) mostraram que as nanopartículas magnéticas estavam visíveis na microscopia ótica no fígado, baço e medula óssea até 28 dias após a administração. Já em 2004, Lacava *et al.* aumentaram o tempo de observação para até 6 meses após a injeção. Os autores observaram mais uma vez que as nanopartículas magnéticas são direcionadas principalmente para fígado e baço (restrito à polpa vermelha) e que ao longo do tempo os aglomerados de nanopartículas nestes órgãos diminuem em número e aumentam em tamanho. Além disso, seus achados sugerem que dos 3 aos 6 meses após a aplicação as nanopartículas estejam sendo degradadas,

liberando ferro, e que este processo é mais observado no fígado. Apesar disso, não foram observadas lesões histopatológicas no fígado ou no baço.

Chaves *et al.* (2002) administraram nanopartículas de magnetita cobertas com DMSA em camundongos por via intravenosa e analisou os efeitos nos pulmões e no fígado após 5, 10, 30, 60, 120 e 240 minutos. Com 30 minutos foram observados muitos aglomerados de nanopartículas nos pulmões, que foram diminuindo progressivamente até o final das observações (de 60 a 240 minutos). Foram encontradas nanopartículas dentro dos capilares sanguíneos nos pulmões. Os autores mencionam ainda que 5 animais tiveram morte subita com dificuldade respiratória logo após a administração, e sugerem que as nanopartículas podem ter causado bloqueio de capilares pulmonares. Neste estudo não houve alterações no fígado. Em estudo subsequente, Chaves *et al.* (2005) investigaram mais a fundo a ação inflamatória das nanopartículas de magnetita coberta com DMSA nos pulmões nos tempos de 5, 10 e 30 minutos, 1, 2, 4, 12 e 24 horas, e observaram grande reatividade das células musculares ao redor dos alvéolos e vasos sanguíneos após 12h da administração, que estava ainda maior após 24h.

Já Garcia *et al.* (2005) administraram nanopartículas de magnetita cobertas com DMSA em camundongos por via intravenosa e avaliaram apenas os pulmões por histologia após 24h, 48h, 7, 15, 30 e 90 dias. De modo geral, os autores observaram um crescente acúmulo de nanopartículas nos pulmões, iniciado na luz de vasos e passando ao parênquima e bronquíolos, associado a processo inflamatório e presença de leucócitos (mais especificamente macrófagos) até os 30 dias. Já aos 90 dias após a administração, o processo inflamatório havia regredido. Em outro trabalho, a investigação de lavado bronquioalveolar de camundongos após administração intravenosa de nanopartículas de magnetita recobertas com DMSA até 72 horas após a administração mostrou que há um aumento de leucócitos tempo-dependente. Até 12 horas de estudo, houve predominância de macrófagos juntamente com a presença de monócitos. Já entre 12 e 72 horas há um retorno do número de leucócitos para os níveis normais. O estudo conclui que este composto está envolvido no mecanismo pró-inflamatório nos pulmões (Valois *et al.*, 2010).

Sadeghiani *et al.* (2005) estudaram os efeitos de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico administrado em camundongos, por via intravenosa, duas doses diferentes e acompanharam até 30 dias de experimento. À luz da histopatologia, foi observada a presença de nanopartículas apenas em baço, fígado e pulmões, sem alterações morfológicas ou processos inflamatórios associados. Este estudo concluiu que todos os resultados foram dose-dependente e que além disso, a biodistribuição deste composto é muito similar aos compostos com cobertura de ácido cítrico e muito diferente à biodistribuição dos compostos recobertos com dextran ou DMSA.

A forma oxidada da magnetita, a maghemita, sob a forma de nanopartículas cobertas com

citrato foram injetadas em camundongos, por via intravenosa ou intraperitoneal, e análises sanguíneas (hemograma) e histológicas de fígado, pulmão, baço e rins, foram realizadas nos tempos de 6h, 12h, 24h, 48h e 7 dias após as injeções (Brugin, 2007). Com relação às análises de sangue, foi observada uma diminuição progressiva dos leucócitos, em especial de linfócitos, das 6 às 48 horas após a administração. Aos 7 dias havia queda de monócitos, mas o número de linfócitos havia retornado ao normal. Na histopatologia de pulmão às 6h houve pouco acúmulo de nanopartículas, às 12h havia infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar e aglomerados de nanopartículas próximos aos vasos; com 24h foram observados poucos aglomerados de nanopartículas no parênquima e espessamento alveolar, além de pequeno infiltrado inflamatório ao redor dos vasos. Às 48h foi observada área hemorrágica no parênquima pulmonar, não associada às nanopartículas, e aos 7 dias havia infiltrado inflamatório junto aos vasos e pouco acúmulo de nanopartículas no parênquima. Já no fígado a quantidade de nanopartículas que pode ser identificada foi pequena às 6h, aumentou às 12 h e voltou a diminuir às 24h e 48h. Não foi observada nenhuma alteração histológica neste órgão. No baço, a quantidade de nanopartículas presentes foi variável e também não houve alterações histológicas. Nos rins foi observada reação inflamatória na pelve renal em todos os tempos, porém sem correlação com a administração das nanopartículas. Já às 12h e 24h havia aglomerados de nanopartículas nos glomérulos renais, porém sem alterações histopatológicas (Brugin, 2007).

Moreira (2012) estudou os efeitos da partícula de maghemita recoberta com DMSA ao longo de 90 dias, em camundongos, administrada por via intravenosa em 4 aplicações sequenciais a cada 15 dias (0-15-30-45d), através da análise de tomografia computadorizada, análise sanguínea e histopatológica. A tomografia computadorizada foi realizada aos 30, 45, 60 e 90 dias e não foi observada nenhuma alteração. As análises sanguíneas incluíram a avaliação de ALT, DHL, Creatinina, Ferro sérico, bilirrubinas totais e frações e nesta análise nenhuma alteração foi detectada. Às análises histopatológicas, foram encontradas nanopartículas nos quatro órgãos analisados: rim, pulmão, baço e fígado. Nenhum dos órgãos apresentou alterações morfológicas, no entanto, alguns achados devem ser aqui descritos. No rim, foram encontradas mais nanopartículas na região de córtex sem associação a focos inflamatórios perivasculares. Os achados de pulmão foram relativos a aglomerados em bronquíolos e região perivascular além de um dos animais ter apresentado imagem sugestiva à trombose associada à presença de nanopartículas. Quanto ao baço as nanopartículas encontravam-se em polpa vermelha e com poucos aglomerados. Já no fígado, as que foram vistas estavam em parênquima e associadas às células de Kupffer além de estarem próximas a ductos biliares.

Parca (2006) estudou os efeitos do fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA, em camundongos, ao longo de 120 dias com foco em lesões de

fígado com análises de microscopia de luz e microscopia eletrônica e transmissão (MET). Nos dias 1 e 2 as nanopartículas foram encontradas dentro de células de Kupffer e em capilares sinusóides com poucos processos inflamatórios associados. Aos 7 dias as nanopartículas encontravam-se dentro de hepatócitos e próximas às veias centro-lobulares, com pequenos infiltrados inflamatórios associados. Aos 15 dias encontravam-se em capilares sinusóides, no endotélio de veias centro-lobulares e canalículos biliares com aumento dos infiltrados inflamatórios. Aos 30 dias foi o tempo experimental com maior quantidade de nanopartículas em parênquima hepático e também maior quantidade de focos inflamatórios de tamanho médio. Aos 60 e 90 dias as nanopartículas foram encontradas em tecido conjuntivo de espaço porta e próximo a ductos biliares com poucos infiltrados inflamatórios. Aos 120 dias o autor relata que foi nítida a queda da quantidade de nanopartículas bem como de focos inflamatórios associados. A análise de MET corroborou com os achados de microscopia de luz mostrando provavelmente a via de eliminação deste fluido magnético dentro do fígado iniciando-se pelos capilares sinusóides, e progressivamente células de Kupffer, células endoteliais e hepatócitos, canalículos biliares e ductos biliares. Ainda foi feita uma análise dos focos inflamatórios que mostrou ser crescente nos dias 1, 2 e 7, havendo uma queda aos 15 dias, um novo aumento aos 30 e 60 e caindo novamente aos 90 e 120 dias.

Em outro estudo, nanopartículas de maghemita cobertas com DMSA foram administradas por via intravenosa em macacos prego e os efeitos no baço, fígado e linfonodos foram avaliados após 12 horas e 90 dias (Braz, 2008). Em 12 horas foi observado um acúmulo de nanopartículas no fígado, enquanto poucos agregados foram observados no baço, e agregados raros em linfonodos. Aos 90 dias as mesmas alterações foram observadas nos linfonodos. No entanto no fígado foram observadas dilatação de sinusóides, sem inflamação, e as nanopartículas se encontravam no citoplasma dos hepatócitos e em células epiteliais. No baço foram vistas mais nanopartículas aos 90 dias do que às 12 horas, especificamente no citoplasma de linfoblastos (Braz, 2008).

Ainda em macacos-prego, Monge-Fuentes *et al.* (2011) injetaram um fluido magnético com DMSA por via intravenosa e fizeram análises dos órgãos 12h, 30 e 90 dias após a administração. Foram observadas nanopartículas nos pulmões já às 12h após a administração, presente no lúmen dos vasos, região perivascular, alvéolos, epitélio de brônquios e bronquíolos, e até na cartilagem, formando aglomerados, e reduzindo progressivamente após 30 e 90 dias. No fígado também foram vistos aglomerados no parênquima em todos os tempos. Às 12h principalmente nos hepatócitos, aos 30 dias no tecido conjuntivo e ao redor de ductos biliares e sinusóides, e aos 90 dias no espaço de Disse e nos vasos sanguíneos. Nos rins, com 12hs havia nanopartículas no córtex renal em túbulos proximais, vasos sanguíneos e capilares glomerulares, 30 e 90 dias as nanopartículas encontravam-se em túbulos proximais, mas em menor quantidade. Análises de sangue também foram feitas às 12h, 7,

15, 30, 60 e 90 dias após a administração, mas não foram vistas alterações.

No intuito de explicar melhor os efeitos causados por nanopartículas magnéticas em diferentes órgãos, um estudo *in vitro* expôs macrófagos peritoneais e alveolares de camundongo a nanopartículas de maghemita cobertas com DMSA e observou os efeitos por até 180 minutos (Braz, 2011). Nos macrófagos alveolares houve diminuição da atividade pró-inflamatória durante toda a observação. Já nos macrófagos peritoneais houve resposta anti-inflamatória. O estudo conclui que as nanopartículas podem desencadear efeitos diferentes em tipos celulares diferentes.

Mejias *et al.* (2013) estudou camundongos tratados de forma intravenosa com 5 injeções em 2 semanas com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA durante três meses. Neste estudo, nas análises histopatológicas, foram observados acúmulos de ferro dos 30 dias aos 3 meses de experimento. Fígado e pulmão apresentaram queda progressiva de aglomerados, no entanto, em especial o fígado apresentou aumento do tamanho destes aglomerados o que seria devido à ação dos fagócitos no parênquima. Em baço foram observados aglomerados em polpa vermelha e no rim foi o único órgão onde não foram observados aglomerados. Nas fezes, o conteúdo de ferro foi crescente do 7º ao 30º dia sem sinais paramagnéticos o que mostra que as nanopartículas foram biotransformadas em outros compostos férricos. Aumentos transitórios de AST e ALT (enzimas presentes em lesões hepáticas) com presença de pico aos 30 dias de experimento, foram observadas nas análises bioquímicas. 7 dias após a última administração de NPM – DMSA foi observado aumento transitório de GGT e creatinina, no entanto, os valores observados não ultrapassaram o valor máximo considerado normal para a espécie.

Como pode ser visto, vários trabalhos já abordaram os efeitos da administração de nanopartículas magnéticas em organismos vivos, no entanto a maioria deles faz um estudo de curto (horas a dias) e médio prazo (poucos meses – geralmente até 3 meses). Além disso, todos os trabalhos até o momento utilizam a histologia como ferramenta de estudo. Apesar do exame histopatológico ser de fato o mais definitivo em termos de identificar lesões aos órgãos, a desvantagem de usá-lo como única forma de análise é o fato de ser um exame invasivo, e que na maioria das vezes exige a eutanásia do animal para a retirada dos órgãos. Dessa forma, os resultados para os diferentes tempos analisados são obtidos de animais diferentes, e o acompanhamento dos efeitos da administração de nanopartículas ao longo do tempo em um mesmo animal não são conhecidos, especialmente a longo prazo. Uma forma de abordar a reação do organismo frente à administração de nanopartículas magnéticas ao longo do tempo seria utilizando técnicas de diagnóstico por imagem. Estas técnicas têm sido cada vez mais utilizadas na medicina (humana e veterinária), pois trazem informações dos órgãos internos com baixa ou nenhuma invasividade.

## **A ultrassonografia e outras ferramentas de diagnóstico por imagem**

A ultrassonografia faz parte de um avanço tecnológico na investigação e diagnóstico de alterações patológicas também para a Medicina Veterinária (Santos *et al*, 2004). É ainda mais fantástico por não ser um método invasivo e que permite a avaliação dos órgãos de diversas cavidades (abdominal, torácica e craniana por exemplo) de diversas espécies domésticas ou não (Kealy & McAllister, 2000).

A investigação ultrassonográfica ou exame ultrassonográfico de alta qualidade requer essencialmente o conhecimento dos fenômenos físicos que envolvem particularmente a formação de imagem (Nyland & Mattoon, 2001; Burk & Feeney, 2003). A perícia em se realizar este exame reivindica conhecimentos extensos em anatomia, fisiologia, patologia e composição corporal do paciente, bem como recursos e limitações do aparelho disponível para uso (Nyland & Mattoon, 2001; Kealy & McAllister, 2000). É importante também ter conhecimento de artefatos que podem ser gerados o que pode acarretar em má interpretação, seja pela falta de identificação da lesão ou por julgá-la mais grave do que realmente é, e comprometer seriamente o diagnóstico (Kealy & McAllister, 2000; Levitov *et al*. 2009).

As imagens de um exame ultrassonográfico são geradas através de ondas sonoras com frequência superior ao valor audível por um humano. As médias das frequências utilizadas nos aparelhos comerciais transitam entre 2 e 15 Mhz (Kealy & McAllister, 2000). Quem emite estas ondas sonoras são os transdutores que podem ter frequência única ou ser multifrequenciais. Assim, o ultrassonografista deve selecionar a frequência adequada à parte anatômica a ser estudada (Nyland & Mattoon, 2001; Burk & Feeney, 2003; Santos *et al*, 2004; Levitov *et al*. 2009).

Altas frequências são indispensáveis para a formação de imagens de alta resolução, no entanto, neste caso, o comprimento da onda diminui, o que impede a penetrância nos tecidos. Cabe à experiência do ultrassonografista saber qual frequência ideal que penetrará à profundidade necessária para o estudo em questão. Com a experiência esta escolha torna-se intuitiva (Nyland & Mattoon, 2001). Por exemplo, um transdutor de 7,5 MHz pode ser ideal para ultrassonografia renal de um gato, mas pode não ser adequado para avaliar um cão de grande porte. Portanto em pequenos animais geralmente as frequências usadas são mais altas e em grandes animais as frequências mais usadas são mais baixas. Quanto maior a penetrância, ou seja, menor a frequência, melhor será a imagem de estruturas distantes da pele. Da mesma forma, altas frequências, e portanto, menor poder de penetrância, traduzem imagens com profundidade menor, no entanto, com alta resolução. Os aparelhos de ultrassom geralmente estão calibrados para atingirem imagens de profundidade máxima entre 10 e 20 cm (Santos *et al.*, 2004).

A formação da imagem é fundamentada no princípio pulso x eco (Burk & Feeney, 2003; Santos *et al*, 2004). O som pulsado (e não contínuo) que é produzido pelo transdutor através da vibração dos cristais piezelétricos, após interagir com os tecidos, retorna ao transdutor (Santos *et al*, 2004). Os aparelhos de ultrassom são então calibrados dentro de uma escala de cinza para que cada retorno de ultrassom seja cronometrado quanto à sua amplitude/força do eco (Burk & Feeney, 2003; Santos *et al*, 2004). Atualmente é convencionado que um eco com baixo retorno, ou seja, baixa intensidade, apresenta-se como um ponto preto. Ecos de alta intensidade são estabelecidos como uma imagem branca (Nyland & Matton, 2001). Já os ecos intermediários formam imagens em diversos tons de cinza (Santos *et al*, 2004). À composição do tecido e como ele interage com as ondas ultrassônicas, classifica-se estas imagens como anecóica (preto), hiperecóica (branco) e hipoecóica (cinza) (Santos *et al*, 2004). Na prática da rotina ultrassonográfica, sabe-se que quanto maior a presença de líquido a estrutura vai apresentar uma imagem mais escura (anecóica), como por exemplo o conteúdo da bexiga, que aparece em preto, enquanto tecidos pobres em líquido vão apresentar uma imagem mais clara (hiperecóica), como por exemplo a superfície de ossos, que aparecem em branco. Órgãos e tecidos, em função da sua composição, irão apresentar-se em tons de cinza variados, por exemplo: fígado normalmente apresenta uma imagem cinza escuro, por possuir alta composição de água, enquanto tecido adiposo apresenta imagem cinza bem claro, devido à baixa composição aquosa.

Este método de diagnóstico por imagem apresenta alguns modos particulares. O modo A, pouco utilizado na rotina clínica e mais específico para a área da oftalmologia, tem como objetivo exames que necessitam de precisão na medida de comprimento e profundidade que se mostram como picos que se originam de linhas verticais. O modo M é o utilizado dentro da avaliação cardíaca por meio da ecocardiografia e funciona através da movimentação dos tecidos (interfaces refletoras) e tem como objetivo a aferição de câmaras, paredes cardíacas e movimento de válvulas. O modo B é o mais difundido e é o que utiliza a escala em cinza e relaciona a amplitude com a penetrância das ondas sonoras no tecido, como explicado anteriormente. As imagens são obtidas em movimento e em tempo real por um feixe de ultrassom fino e exibem a anatomia em corte transversal. Vários planos podem ser obtidos através da mudança de posicionamento do transdutor em relação ao paciente (Nyland & Mattoon, 2001).

Para um exame ultrassonográfico de abdômen de pequenos animais, a preparação do paciente envolve a tricotomia da região, para a redução da camada de ar entre a pele e o transdutor (Kealy & McAllister, 2000), jejum alimentar de 8 horas e hídrico de 2 horas e se possível, administração de antifisético para diminuição de gás em trato gastrointestinal. O posicionamento do paciente para o exame não é bem determinado, já que isso depende de preferências particulares de cada profissional que irá conduzir o exame (Kealy & McAllister, 2000). A sedação ou anestesia geral pode ser

necessária em algumas poucas situações, como agressividade extrema que coloque em risco a segurança dos envolvidos no procedimento, dor intolerável e procedimentos invasivos a serem guiados por ultrassom (citologia aspirativa ou biópsia).

Deve-se adotar um protocolo de exame, já que a orientação do transdutor, planos de estudo e nomenclatura seguem um padrão (Kealy & McAllister, 2000). Geralmente inicia-se o exame por um órgão/ponto de referência abdominal, no caso a bexiga. O transdutor é utilizado para a varredura do próprio órgão e suas adjacências, gerando imagens que podem ser captadas através do sistema específico de cada aparelho (imagem e/ou vídeo). Considerando-se a bexiga como ponto de partida, segue-se o exame em sentido anti-horário, abordando a área lateral abdominal esquerda: rim esquerdo; mais cranialmente: baço; crânio-medial: estômago; área lateral abdominal direita: fígado, rim direito e duodeno, e medialmente: alças intestinais. Este seria um protocolo amplamente difundido e básico onde outras estruturas não relatadas aqui, menores e não menos importantes, também são obrigatoriamente avaliadas.

É importante salientar que a qualidade da imagem, e conseqüentemente, a fidedignidade do diagnóstico, depende diretamente do conhecimento da interação das ondas sonoras com o tecido a ser estudado e, não menos importante, da perícia na utilização do aparelho de ultrassom e de todos os seus recursos. O conhecimento de áreas específicas como a anatomia também é fundamental para a diferenciação entre o normal e anormal/patológico. Além disso, ao contrário dos outros exames de imagem, esta avaliação ultrassonográfica é dinâmica, ou seja, deve ser realizada no momento do exame (Nyland & Mattoon, 2001).

O exame ultrassonográfico deve ser completo, observando e analisando todos os órgãos abdominais, mesmo que a sua indicação seja para um órgão específico, com base em outras informações, por exemplo radiografias, análises bioquímicas, hematológicas ou de pesquisa histopatológica disponíveis (Burk & Feeney, 2003). Com o exame ultrassonográfico é possível obter informações valiosas como tamanho, forma e localização das estruturas, a arquitetura de tecidos moles e órgãos.

As várias modalidades de diagnóstico por imagem disponíveis hoje no mercado como a radiografia, ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ainda a mais recente ressonância magnética, estão à disposição para que se possa aumentar a acurácia do diagnóstico. No entanto, a escolha irá variar com o processo da doença mais provável. Por exemplo, quando o parênquima pulmonar precisa ser avaliado, é o método de eleição é a tomografia computadorizada. No entanto, o custo do aparelho e a necessidade de anestesia para o paciente acabam apresentando-se como desvantagens desta técnica. Em muitos casos, a indicação de mais de uma modalidade poderá acontecer e na verdade frequentemente será necessário (Burk & Feeney, 2003).

A especificidade de cada uma das modalidades de diagnóstico por imagem aqui relatadas é um consenso. Em geral, para exame de órgãos abdominais a ultrassonografia é o primeiro método de escolha. Para avaliação de ossos, o raio-x; enquanto para órgãos torácicos e suspeita de neoplasias a tomografia computadorizada é a opção mais acertada. A ressonância magnética, por sua vez, é mais indicada para alterações vasculares e metástases. Publicações científicas comprovam a acurácia e a eficácia de cada um destes métodos. No entanto, a eficiência é um conceito novo que relaciona acurácia, eficácia e a avaliação econômica associando condições reais e custos dos recursos com o objetivo de melhoras na relação custo – efetividade para a rotina clínica (Watanabe *et al*, 2007). Dos quatro métodos aqui relatados, não há dúvida que a ultrassonografia ainda é o mais acessível física e economicamente.

A radiografia é a representação bidimensional estática das cavidades avaliadas. Para gerar imagens de raio X, radiações eletromagnéticas de alta frequência e alta energia são utilizadas. Um fluxo de elétrons bombardeia um material chamado tungstênio que libera fótons. Estes fótons interagem (passando totalmente, parcialmente ou sendo absorvidos) pelos tecidos e sensibilizando o filme de raio-x rico em prata (Burk & Feeney, 2003). Radiografias são excelentes para definição anatômica, mas são de uso limitado na avaliação de alguns tecidos ou órgãos. No caso de órgãos abdominais, como o fígado, as técnicas radiográficas são insuficientes para diagnosticar alguma alteração de parênquima, apenas aumento ou desvio de topografia anatômica podem ser observados. Técnicas radiográficas não contrastadas e não-computadorizadas podem diferenciar apenas cinco densidades relativas de pacientes ou objetos (ar, gordura, água/tecido mole, osso e metal), o que limita imensamente o diagnóstico de patologias (Burk & Feeney, 2003).

A ultrassonografia e o raio X são exames complementares, um exemplo é uma radiografia torácica onde é gerada uma imagem de cardiomegalia mas que será no ultrassom que todos os componentes cardíacos serão avaliados e a qualificação e quantificação da doença (prognóstico) será definida. É importante lembrar que a presença de fluidos na radiografia dificulta a formação das imagens, enquanto este mesmo fluido no ultrassom melhora a aquisição das mesmas (Kealy & McAllister, 2000). A ultrassonografia é superior ao raio-x pois consegue distinguir estruturas sólidas de cavitárias, conseguindo muitas vezes definir no caso de neoplasias de qual órgão se origina, a extensão da infiltração, o grau de disseminação ou ainda a presença de metástases. É ideal para avaliação de animais com líquido pleural ou peritoneal. Em pacientes com líquido pleural, massas mediastinais ou doença cardíaca, a ultrassonografia fornece informações que podem não ser evidentes na radiografia como a presença de celularidade ou ainda quantificar este derrame em discreto, moderado e severo, podendo ainda realizar centeses ou biópsias aspirativas diagnósticas (Burk & Feeney, 2003).

O desenvolvimento do exame tomográfico é muito recente e data da década de 70 do século passado. O grande avanço proposto por esta modalidade é a resolução espacial que proporciona. A imagem é obtida, assim como na radiografia, por partícula radioativa ionizante que interage com os diferentes tecidos formando as imagens. Os cortes sequenciais podem ser escolhidos de acordo com o protocolo adotado e uma grande vantagem é que através dos programas de reformatação cortes oblíquos ou sagitais podem ser adquiridos sem expor o paciente novamente à radiação. A tomografia computadorizada é mais sensível que as radiografias na detecção por exemplo de descalcificação óssea e na avaliação de imagens transversais o que só é possível com várias projeções radiográficas. Além disso, para o estudo de neoplasias, pode-se usar contraste iodado que proporciona excelente contraste e visualização do suprimento sanguíneo, no entanto, muitos pacientes tem restrição alérgica quanto ao seu uso, dificultando o diagnóstico (Manso, 1995). Aqui, assim como na radiografia, tanto o técnico (se não protegido) como o paciente ficam expostos a cargas de radioatividade. Já a ultrassonografia, como já explicado, não utiliza radiação ionizante, e não existem relatos de efeitos deletérios causados pela exposição às ondas sonoras a pacientes ou a ultrassonografistas dentro da rotina clínica (Nyland & Mattoon, 2001).

Já a ressonância magnética é um método não invasivo que não utiliza partículas ionizantes. A imagem é formada através da interação de prótons e nêutrons, radiofrequência e um forte campo magnético gerado pelo aparelho. Uma grande vantagem neste exame é o uso de contraste paramagnético não iodado, o gadolínio, que tem baixo potencial alérgico. Através de programas de formatação é possível suprimir por exemplo a gordura no momento do exame propiciando imagens que individualizem lesões adjacentes e gerando excelente resolução. A ressonância magnética fornece resolução superior de tecido mole e pode ser particularmente útil na avaliação de cartilagem e outras estruturas de tecido mole (Burk & Feeney, 2003). Apesar disso, e de ser excelente para diagnosticar lesões vasculares, a ressonância magnética é um exame demorado e com alto custo não sendo priorizado na rotina clínica se não tiver indicação exclusiva (Manso, 1995).

### **3. JUSTIFICATIVA**

A nanotecnologia tem se desenvolvido para diversas aplicações, dentre elas a biomedicina. Dentre as estratégias nanotecnológicas, as nanopartículas magnéticas possuem aplicabilidade para o tratamento de diversas doenças. Vários estudos já avaliaram os efeitos da administração de nanopartículas magnéticas em organismos vivos, porém sempre a curto/médio prazo. Pesquisas dos efeitos de longo prazo são importantes, especialmente fazendo o acompanhamento do mesmo animal experimental ao longo do tempo. O uso da ultrassonografia como método avaliador dos efeitos do uso de nanopartículas in vivo é extremamente novo e vantajoso pois é indolor, não invasivo, acessível, móvel, e de mais baixo custo quando comparado com as outras opções de diagnóstico por imagem disponíveis no mercado. Além disso, a ultrassonografia permite acompanhar o mesmo indivíduo ao longo do tempo, avaliando de forma mais fidedigna e acompanhando a evolução de possíveis alterações causadas pelo tratamento. Assim o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos a longo prazo da administração endovenosa de um fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita revestidas com DMSA por meio de análises hematológicas, ultrassonográficas e histológicas.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Geral**

Estudar os efeitos a longo prazo da administração endovenosa de um fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita revestidas com DMSA por meio de análises hematológicas, de imagem e histológicas.

### **4.2. Específicos**

- Análise dos possíveis danos hepáticos e renais advindos da administração do FM-DMSA no organismo, mediante exames hematológicos e de bioquímica de soro.
- Verificação da presença de possíveis alterações morfológicas e fisiológicas provocadas pela administração do FM-DMSA no organismo dos animais experimentais, utilizando análise de imagem
- Análise histopatológica de órgãos dos animais experimentais aos 10 meses pós-administração do FM-DMSA.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Nanopartículas utilizadas**

O fluido magnético composto de nanopartículas de Maghemita recobertas com DMSA (FM – DMSA) foi produzida no Instituto de Química da Universidade de Brasília e caracterizado a partir das seguintes análises: concentração de ferro, difratometria de raio-X, medidas do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta, microscopia eletrônica de transmissão (MET) para mensurar o diâmetro e avaliar a frequência de distribuição de tamanho das nanopartículas no FM-DMSA.

A amostra de FM - DMSA contendo nanopartículas de maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) foi estabilizada com ácido meso-2-3-dimercaptosuccínico (DMSA) em meio aquoso, contendo concentração de ferro total de 14,7 mg/mL. A técnica de difração de raios X mostrou que a estrutura cristalina das nanopartículas é do tipo espinélio, sem a detecção de outra fase cristalina concomitante, com predomínio da forma oxidada (maghemita). Além disso, a partir do ajuste matemático do pico principal de difração (311) e utilizando a fórmula de Scherrer, foi possível determinar um diâmetro cristalino médio de 11,5 nm.

Foi feita a medida do espalhamento dinâmico da luz no aparelho Zetasizer. O potencial zeta de FM-DMSA foi de -39 mV. O diâmetro hidrodinâmico médio foi de 113,2 nm com PDI de 0,256 e o pH da amostra foi de 6,48. A caracterização por microscopia eletrônica de transmissão, com a medição de 200 nanopartículas, que resultou no diâmetro médio de  $23,03 \pm 4,22$  nm.

### **5.2. Animais e desenho experimental**

O projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso animal (CEUA) da Universidade de Brasília, em 13/04/2016 sob número 17607/2016.

Foram utilizados 15 ratos Wistar fêmeas, mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em caixas de plástico com grade superior em grupos de 4 animais, mantendo ciclo claro/escuro de 12 horas, ração e maravalha comerciais e água filtrada ad libitum. (Figura 2).



**Figura 2.** Foto ilustrativa de exemplares de wistar aos 5 meses de vida organizados em grupos de 4 animais.

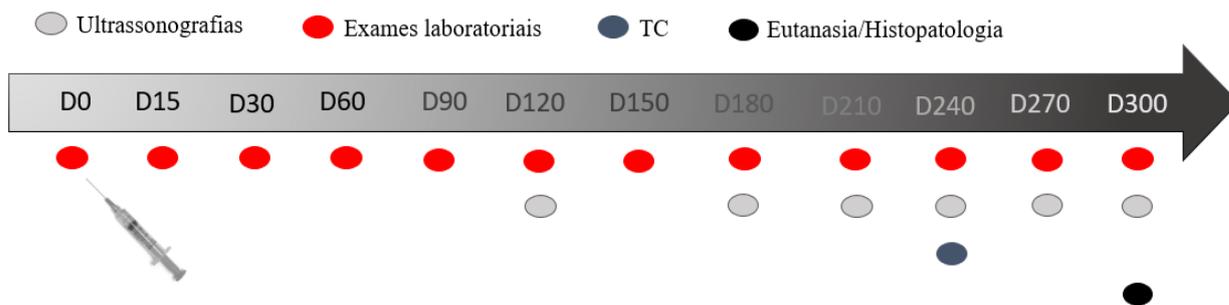
Foram formados 3 grupos com 5 animais cada que ao início do projeto tinham 5 semanas de vida:

- Grupo controle (C): Animais receberam 100  $\mu$ L de solução salina;
- Grupo T0,5: Animais receberam injeção de FM-DMSA diluído em solução salina na dose de 0,5 mg Fe/kg em um volume total de 100  $\mu$ L;
- Grupo T5: Animais receberam injeção do FM-DMSA diluído em solução salina na dose de 5 mg Fe/kg em um volume total de 100  $\mu$ L.

Os grupos formados tiveram o FM-DMSA e a solução salina administrado através de cateter, sob anestesia inalatória com isoflurano, via veia caudal, e o dia da aplicação foi considerado o Dia 0 (D0).

Foram realizadas observações de comportamento durante as primeiras horas após a injeção e na primeira semana. Na primeira semana após a injeção do FM-DMSA os animais foram pesados a cada 2 dias e após 7 dias, as pesagens tornaram-se semanais e assim ocorreu até o final do experimento.

Assim, com as administrações do FM-DMSA, foi possível o início da execução do projeto, onde cada animal foi acompanhado ao longo de 10 meses por meio de análises hematológicas, imaginológicas e histopatológicas, conforme a linha de tempo ilustrada na Figura 3:



**Figura 3.** Representação do cronograma considerando D0 o dia da administração do FM-DMSA.

### 5.3. Análises Hematológicas

Inicialmente foi coletado sangue de todos os animais, antes da sua divisão em grupos e da administração de qualquer solução, e este foi considerado o Dia 0 do experimento (D0, N=18). Em seguida os animais foram distribuídos nos grupos (controle, T0,5 e T5) aleatoriamente.

Foram realizadas 12 coletas de sangue no decorrer do experimento, nos dias 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 pós-administração do FM-DMSA. O sangue foi coletado e dividido em dois tubos Minicollect (Greiner Bio-One, AUST), um com anticoagulante EDTA para a realização de hemograma e outro com gel separador para análises bioquímicas. Para a obtenção do hemograma, as amostras foram imediatamente levadas ao analisador hematológico veterinário Sysmex pocH-100iV Diff (Sysmex, Japão) e os parâmetros analisados foram: número total de células brancas (TCB), número total de células vermelhas (TCV), hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas (PLT), porcentagem de linfócitos (PL), monócitos (PM), valor absoluto de linfócitos (VAL) e monócitos (VAM). Os valores obtidos para as diversas análises nos diferentes dias de cada grupo foram comparados com o D0 (considerado o valor padrão antes de qualquer tratamento ou manipulação).

Para as análises bioquímicas, as amostras recém coletadas foram centrifugadas a 5000 rpm por cinco minutos, congeladas a -20 °C e analisadas no equipamento ChemWell-T (LabTest, Brasil), para os seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina, ureia e ferro sérico. Para a análise de tais parâmetros foram utilizados kits Liquiform (LabTet, Brasil). A partir dos 30 dias de experimento foi feita reposição de fluido (2 ml) a cada coleta de sangue (1ml).

#### **5.4. Análise Imaginológica**

O diagnóstico por imagem com o ultrassom e Doppler colorido foi realizado aos 4, 6, 7, 8, 9 e 10 meses após o início do experimento, marcado pela injeção do FM-DMSA. O equipamento utilizado é o Z5 vet da Mindray (EUA), com probe microconvexa e multifrequencial de 5 a 8 Mhz e linear de 7,5 a 10 MHz. Foram realizadas análises da ecogenicidade de rins, baço, estômago, fígado, bexiga e pulmões e medidas de comprimento, largura, espessura e volume dos rins e comprimento e largura do baço, assim como o índice de resistividade (IR) do fluxo sanguíneo renal e esplênico, obtidos a partir do Doppler colorido. As imagens de Doppler pulsado foram realizadas com no mínimo três ondas consecutivas com aparência similar no traçado para cada região avaliada, de acordo com o descrito por Melo et al. (2006).

As alterações observadas nas análises ultrassonográficas foram verificadas por análises de tomografia computadorizada (TC). Os exames de TC foram realizados ao completar 8 meses da administração do FM-DMSA, a fim de corroborar as alterações encontradas na ultrassonografia. Essas imagens foram realizadas em duas etapas com o uso do equipamento *Toshiba Asteion VP* (Amber Diagnostic- EUA), no qual os parâmetros utilizados foram: 150 kV e 100 mA com resolução de espessura de corte de 2mmx 2 Pitch. Para a obtenção das imagens foram captadas imagens sem contraste e em seguida com contraste endovenoso (via veia caudal) iohexol (Omnipaque- Artmed, Brasil). A reconstrução das imagens foi realizada com o *software* Osirix-MD (EUA). Foram avaliadas alterações de contorno e realce dos mesmos órgãos avaliados na ultrassonografia.

#### **5.5. Análises Histopatológicas**

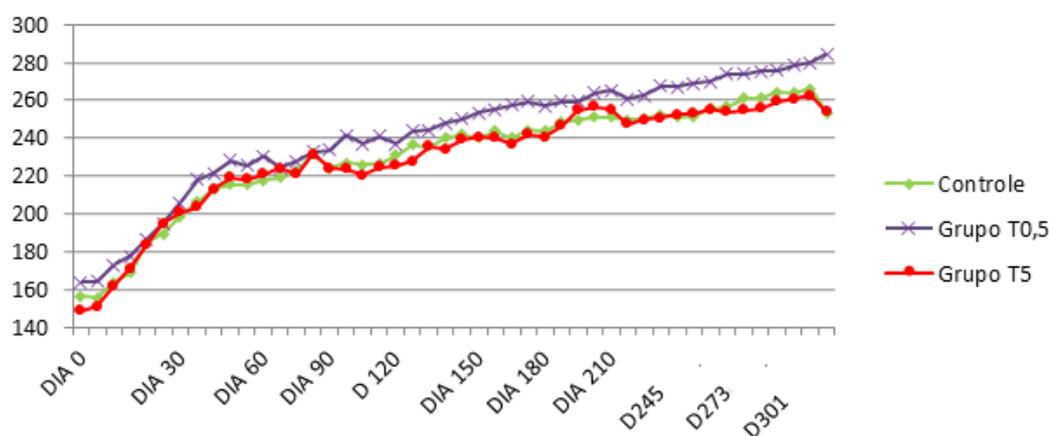
Os animais foram eutanasiados com superdose de anestésicos (ketamina e xilazina) via peritoneal aos 10 meses após o início do experimento. Os órgãos (fígado, baço, rins, pulmões, coração e artéria aorta) foram lavados com solução salina e fixados com formalina tamponada (10%) durante 48 horas. Após esse período, os órgãos foram transferidos individualmente para solução de álcool 70% e foram realizados procedimentos de desidratação em soluções crescentes de álcool (80%, 90% e 100%), diafanização em xilol, infiltração e inclusão em parafina (Paraplast, Sigma). De cada órgão foram realizados 5 cortes da região central do órgão na espessura de 5µm que foram montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (Leica DM1000, Leica, Wetzlar, Germany) e fotografadas com câmera digital (Leica DFC280, Leica, Wetzlar, Germany) acopladas ao software Leica Application SuitZe (versão 2.7.0 R1 Copyright 2003-2007, Leica Microsystems, Switzerland).

## **5.6. Análise Estatística**

Os dados de comprimento, largura e volume renal, comprimento e largura de baço, e índice de resistividade renais e esplênicos foram comparados entre os grupos por ANOVA e teste de Tukey e considerados significantes quando  $P < 0,05$  (software SPSS 22.0 - IBM® Statistics).

## 6. RESULTADOS

Nenhum dos animais apresentou alteração comportamental durante as primeiras horas e a primeira semana após a injeção do FM-DMSA. No período de 300 dias (10 meses) do experimento foi observado ganho de peso dos animais, com períodos de estabilização e sem queda significativa após a injeção, conforme observado na Figura 3.



**Figura 3.** Peso (médias por grupo) dos animais no decorrer do experimento.

Os resultados das análises de hemograma de cada animal individualmente podem ser observados nos apêndices A a O. Os valores mínimos e máximos para cada parâmetro avaliado antes do início do tratamento (D0) são mostrados na Tabela 1, e foram utilizados como padrão fisiológico dos animais, com os quais os resultados obtidos ao longo do estudo foram comparados.

As médias dos valores hematológicos obtidos ao longo do estudo são apresentados nas Tabelas 2 a 4, respectivamente para os grupos Controle, T0,5 e T5. Apesar de algumas alterações pontuais terem sido observadas, de modo geral não foi possível identificar quaisquer alterações hematológicas que possam ser relacionadas à administração de FM-DMSA, nem na dose de 0,5 mg Fe/kg nem na de 5 mg Fe/kg. Como cada parâmetro sanguíneo normalmente possui um intervalo de referência para ser considerado padrão, é importante ressaltar que diferenças pontuais nem sempre possuem significado biológico. Assim, foi decidido proceder a análise individual dos parâmetros de cada animal, comparando-os com os dados considerados padrão (D0 do experimento).

**Tabela 1.** Valores hematológicos mínimo e máximo das fêmeas de ratos Wistar utilizadas no experimento antes de qualquer tratamento (D0) considerados como padrão (N=18).

<i>Padrão</i>	TCB (x10 <sup>3</sup> /μl)	TCV (x10 <sup>6</sup> /μl)	HGB (g/dl)	HCT (%)	VGM (fl)	HGM (x10 <sup>3</sup> /μl)	CHCM (g/dl)	PLT (x10 <sup>3</sup> /μl)	PL (%)	PM (%)	VAL (x10 <sup>3</sup> /μl)	VAM (x10 <sup>3</sup> /μl)
	3,9-12,0	6,1-10,8	12,4-23,5	33,1-60,1	53,6-59,7	20,2-22,5	36,0-39,1	129,0-1123,0	60,4-82,5	17,5-39,6	2,4-8,4	0,8-3,6

TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PLT: plaquetas, PL: porcentagem de linfócitos, PM: monócitos, VAL: valor absoluto de linfócitos, VAM: valor absoluto de monócitos.

**Tabela 2.** Valores hematológicos do grupo controle com médias ( $\pm$  desvio padrão) e variação ao longo do experimento.

<i>Parâmetros</i>	D0	D15	D30	D60	D90	D120	D150	D180	D210	D240	D270	D300
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	7 $\pm$ 3,0 (4,7-12,0)	8,9 $\pm$ 2,1 (6,2-12,2)	10,7 $\pm$ 1,6 (8,2-12,7)	8,9 $\pm$ 1,3 (7,7-10,7)	8,3 $\pm$ 0,4 (8,0-8,8)	5,7 $\pm$ 0,6 (4,8-6,6)	4,6 $\pm$ 1,2 (3,3-6,6)	5,1 $\pm$ 0,8 (3,6-5,5)	6,1 $\pm$ 1,5 (4,8-8,6)	5,5 $\pm$ 1,0 (4,4-6,9)	5,6 $\pm$ 0,5 (4,9-6,1)	3,2 $\pm$ 0,5 (2,4-8,6)
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	6,7 $\pm$ 0,5 (6,2-7,4)	10,8 $\pm$ 1,5 (10,2-11,8)	7,8 $\pm$ 0,3 (7,3-8,1)	8,1 $\pm$ 0,2 (7,75-8,3)	8,4 $\pm$ 0,3 (8,1-8,8)	7,8 $\pm$ 0,2 (7,4-8,0)	8,6 $\pm$ 1,1 (7,5-10,4)	8,7 $\pm$ 1,2 (8,9-9,7)	8,6 $\pm$ 0,7 (7,9-9,5)	8,5 $\pm$ 0,5 (7,8-9,2)	9,5 $\pm$ 1,1 (8,1-10,8)	9,2 $\pm$ 1,3 (7,8-10,9)
<i>HGB</i> (g/dl)	14,1 $\pm$ 1,2 (12,5-15,5)	22,2 $\pm$ 3,3 (20,8-24,7)	15,7 $\pm$ 0,7 (14,6-16,7)	16,0 $\pm$ 0,5 (15,5-16,6)	16,7 $\pm$ 0,5 (16,0-17,2)	15,4 $\pm$ 0,5 (16,0-14,7)	16,6 $\pm$ 2,4 (14,1-20,6)	17,0 $\pm$ 2,3 (13,0-18,6)	16,9 $\pm$ 1,8 (15,0-19,6)	17,0 $\pm$ 1,1 (15,6-18,4)	18,6 $\pm$ 2,1 (16,2-20,8)	18,0 $\pm$ 2,7 (15,3-21,8)
<i>HCT</i> (%)	37,2 $\pm$ 3,5 (33,1-43,0)	60,2 $\pm$ 8,8 (43,6-66,5)	44,1 $\pm$ 1,7 (41,9-45,8)	43,9 $\pm$ 0,8 (43,0-44,8)	44,6 $\pm$ 1,9 (42,1-46,6)	40,8 $\pm$ 1,8 (38,4-43,0)	45,3 $\pm$ 5,9 (39,7-55,3)	45,4 $\pm$ 6,1 (34,7-50,3)	45,1 $\pm$ 4,5 (40,9-51,6)	44,9 $\pm$ 2,2 (42,7-48,5)	50,4 $\pm$ 5,8 (43,2-56,9)	49,5 $\pm$ 7,6 (41,4-60,0)
<i>VGM</i> (fl)	55,4 $\pm$ 1,5 (53,6-58,0)	55,9 $\pm$ 0,7 (54,9-56,6)	56,1 $\pm$ 0,6 (55,2-57,1)	54,1 $\pm$ 1,2 (52,5-56,0)	53,1 $\pm$ 0,7 (51,9-53,6)	52,3 $\pm$ 0,8 (51,6-53,5)	52,8 $\pm$ 0,5 (52,2-53,3)	52,1 $\pm$ 0,7 (51,5-53,4)	52,4 $\pm$ 1 (51,5-54,1)	52,7 $\pm$ 1,3 (51,3-54,7)	53,1 $\pm$ 0,5 (52,5-53,5)	53,9 $\pm$ 0,8 (53,4-55,3)
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	21,0 $\pm$ 0,4 (20,3-21,4)	20,6 $\pm$ 0,2 (20,4-20,9)	20,0 $\pm$ 0,3 (19,8-20,5)	19,8 $\pm$ 0,3 (19,5-20,0)	19,9 $\pm$ 0,3 (19,6-20,3)	19,8 $\pm$ 0,1 (19,7-19,9)	19,3 $\pm$ 0,5 (18,8-19,8)	19,6 $\pm$ 0,6 (19,0-20,5)	19,6 $\pm$ 0,6 (18,9-20,5)	19,9 $\pm$ 0,3 (19,5-20,3)	19,6 $\pm$ 0,5 (18,9-20,1)	19,6 $\pm$ 0,3 (19,4-20,1)
<i>CHCM</i> (g/dl)	37,8 $\pm$ 1,0 (36,0-38,7)	37,0 $\pm$ 0,5 (36,4-37,9)	35,7 $\pm$ 0,6 (34,8-36,5)	36,6 $\pm$ 1,0 (35,7-38,2)	37,4 $\pm$ 0,6 (36,7-38,0)	37,8 $\pm$ 0,5 (37,2-38,3)	36,6 $\pm$ 0,7 (35,5-37,3)	37,5 $\pm$ 0,6 (36,9-38,4)	37,5 $\pm$ 0,7 (36,7-38,4)	37,6 $\pm$ 1,0 (36,4-38,5)	36,9 $\pm$ 0,6 (36,0-37,5)	36,4 $\pm$ 0,5 (35,8-37,0)
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	659 $\pm$ 317,8 (129-1002)	446 $\pm$ 190,2 (299-817)	845,3 $\pm$ 69,1 (762-948)	787,8 $\pm$ 211,2 (433-977)	751,6 $\pm$ 180,6 (454-937)	693,4 $\pm$ 209,5 (323-826)	464,4 $\pm$ 271,5 (184-832)	495 $\pm$ 232,6 (148-742)	799,2 $\pm$ 164,5 (618-1055)	838,6 $\pm$ 88,3 (718-934)	612,6 $\pm$ 159,9 (352-791)	660,6 $\pm$ 151,1 (437-813)
<i>PL</i> (%)	76,3 $\pm$ 6,1 (67,8-80,8)	70,1 $\pm$ 3,9 (64,4-74,9)	74,1 $\pm$ 3,8 (68,5-79,7)	76,0 $\pm$ 2,1 (73,0-78,6)	70,4 $\pm$ 2,5 (66,3-73,0)	66,5 $\pm$ 7,4 (53,8-73,2)	70,4 $\pm$ 5,4 (66,3-75,7)	68,8 $\pm$ 1,9 (66,4-71,7)	63,1 $\pm$ 8,5 (48,9-70,7)	65,2 $\pm$ 2,9 (61,3-67,9)	65,0 $\pm$ 2,1 (61,6-67)	61,3 $\pm$ 5,5 (53,6-67,4)
<i>PM</i> (%)	23,7 $\pm$ 6,1 (17,5-32,2)	29,9 $\pm$ 3,9 (25,1-33,1)	25,9 $\pm$ 3,8 (20,3-27,8)	24,0 $\pm$ 2,1 (21,4-27)	29,6 $\pm$ 2,5 (27-33,7)	33,5 $\pm$ 7,4 (26,8-46,2)	29,6 $\pm$ 5,4 (24,3-36,7)	31,2 $\pm$ 1,9 (28,3-33,6)	36,9 $\pm$ 8,5 (29,3-51,7)	34,8 $\pm$ 2,9 (32,1-38,7)	35,0 $\pm$ 2,1 (33,0-38,4)	38,7 $\pm$ 5,5 (32,6-46,4)
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	5,3 $\pm$ 2,1 (3,3-8,4)	6,3 $\pm$ 1,7 (4,4-9,1)	8,0 $\pm$ 1,3 (5,6-9,3)	6,8 $\pm$ 1,1 (5,9-8,3)	5,9 $\pm$ 0,2 (5,7-6,1)	3,8 $\pm$ 0,7 (3,1-4,8)	3,2 $\pm$ 0,9 (2,4-4,8)	3,5 $\pm$ 0,6 (2,5-3,9)	3,8 $\pm$ 1,0 (3,0-5,3)	3,6 $\pm$ 0,5 (2,9-4,2)	3,6 $\pm$ 0,3 (3,3-4,0)	1,9 $\pm$ 0,3 (1,5-2,2)
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1,7 $\pm$ 1,0 (0,8-3,6)	2,7 $\pm$ 0,6 (1,8-3,6)	2,8 $\pm$ 0,6 (2,0-3,4)	2,1 $\pm$ 0,3 (1,8-2,4)	2,5 $\pm$ 0,3 (2,2-3,0)	1,9 $\pm$ 0,4 (1,6-2,6)	1,4 $\pm$ 0,4 (0,9-1,8)	1,6 $\pm$ 0,3 (1,1-1,8)	2,3 $\pm$ 0,8 (1,6-3,3)	1,9 $\pm$ 0,5 (1,5-2,7)	2 $\pm$ 0,2 (1,6-2,2)	1,3 $\pm$ 0,3 (0,9-1,7)

Grupo controle recebeu 100 $\mu\text{l}$  de solução salina. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PLT: plaquetas, PL: porcentagem de linfócitos, PM: monócitos, VAL: valor absoluto de linfócitos, VAM: valor absoluto de monócitos.

**Tabela 3.** Valores hematológicos do grupo T-0,5 com médias e desvio padrão ao longo do experimento.

<i>Parâmetros</i>	D0	D15	D30	D60	D90	D120	D150	D180	D210	D240	D270	D300
<i>TCB (x10<sup>3</sup>/μl)</i>	6,2 ±2,5 (3,9-10,6)	8,9±2,0 (6,1-11,7)	10,3±2,2 (8,1-13,5)	9,3±1,8 (6,8-11,1)	7,1±1,7 (4,8-9,4)	5,2±2,1 (3,4-8,3)	5,2±1,2 (4,1-7)	4,9±0,2 (4,0-7,0)	5,4±1,1 (4,1-6,4)	6,1±0,2 (5,9-6,3)	4,9±1,6 (3,2-6,9)	2,5±1,0 (1,8-3,9)
<i>TCV (x10<sup>6</sup>/μl)</i>	7,1 ±0,7 (6,1-7,8)	8,2±1,8 (5,9-10,3)	8,3±0,4 (7,8-8,7)	8,5±0,7 (8,1-9,4)	8,2±0,4 (7,6-8,7)	7,7±0,4 (7,2-8,4)	8±0,5 (7,4-8,6)	8,9±1,3 (7,5-10,8)	7,6±1,3 (5,3-8,4)	7,9±0,6 (7,3-8,4)	9±0,4 (8,8-9,6)	8,5±0,7 (7,7-9,3)
<i>HGB (g/dl)</i>	15,1 ±1,4 (12,4-16,6)	17,5±3,7 (12,4-22,3)	17,2±1,1 (16,9-18,1)	17,4±1,5 (16-18,4)	16,7±0,8 (15,8-17,6)	15,7±0,8 (14,4-16,7)	16,3±1 (15,2-17,6)	17,7±2,7 (15,2-21,5)	15,3±1,3 (11,1-16,8)	16,1±0,9 (15-16,9)	18,4±0,3 (18-18,8)	17,1±1,2 (16,0-18,6)
<i>HCT (%)</i>	39,9 ±3,6 (33,1-43,8)	46,8±9,7 (33,9-59,5)	46,9±2,4 (43,3-49)	46,7±3,7 (43,4-49,3)	44,7±2,3 (42,3-44,8)	42±1,9 (39,2-44,4)	43,5±2,4 (40,8-46,3)	47,5±6,8 (41-56,5)	40,9±6,9 (28,6-44,8)	42±3,2 (38-47,4)	49,4±1,6 (47,8-51,5)	47,1±3,9 (43,1-51,4)
<i>VGM (fl)</i>	56,4 ±2 (53,9-59,7)	57±1,3 (55,3-58,7)	56,8±1,1 (56-58)	54,8±0,7 (54-55,8)	54,5±0,8 (53,6-55,6)	54,4±1 (53,1-54,7)	54,0±0,8 (53,3-55,4)	53,7±1,1 (52,6-54,7)	53,7±0,4 (53,1-54,1)	54,3±1,5 (52,2-55,4)	54,7±1,2 (53,6-55,9)	55,3±0,7 (54,4-56,1)
<i>HGM (x10<sup>3</sup>/μl)</i>	21,4 ±0,7 (20,2-22,5)	20±3,5 (12,2-22,6)	20,8±0,6 (19,7-21,2)	20,4±0,3 (20,1-20,7)	20,4±0,4 (20-21)	20,3±0,4 (20-21)	20,3±0,4 (19,8-20,7)	20±0,2 (19,6-20,3)	20,2±0,4 (19,8-20,8)	20,3±0,2 (20,1-20,6)	20,3±0,5 (19,6-20,8)	20,1±0,5 (19,7-20,8)
<i>CHCM (g/dl)</i>	37,9 ±0,7 (37,5-38,6)	37,4±0,8 (36,3-38,6)	35,6±0,7 (36,3-37,2)	37,2±0,3 (36,9-37,6)	37,5±0,6 (36,7-38,4)	37,3±0,5 (36,7-37,9)	37,5±0,4 (37,1-38,0)	37,2±0,5 (36,7-38,1)	37,6±0,7 (36,9-38,8)	37,4±0,9 (36,4-38,5)	37,2±0,5 (36,5-37,7)	36,4±0,6 (35,7-37,1)
<i>PLT (x10<sup>3</sup>/μl)</i>	720 ±414 (140-1123)	463±325 (73-858)	807±215 (651-1167)	638±248 (211-822)	505±150 (377-765)	551±376 (41-920)	811±86 (723-905)	421±279 (123-744)	622±397 (116-992)	550±468 (19-1065)	611±242 (261-776)	579±88 (455-646)
<i>PL (%)</i>	74,9 ±6,7 (60,4-79,7)	72,5±6,1 (65,1-79,5)	73,7±3,7 (67,5-76,7)	72,7±2,4 (69,1-74,7)	70,4±1 (69,3-71,8)	65,8±4,5 (61-71)	65,7±4,8 (58-70,2)	66,0±4,6 (58,7-69,6)	67,9±6,3 (60,7-76,7)	68,0±8,5 (56,2-76,4)	61,0±7,1 (50,8-66,3)	59,3±6,3 (53,0-66,7)
<i>PM (%)</i>	25,1 ±6,7 (20,3-39,6)	27,5±6,1 (23,8-34,9)	26,3±3,7 (23,3-32,5)	27,3±2,4 (24,9-28,2)	29,6±1,0 (28,2-30,7)	34,2±4,5 (29-37,7)	34,3±4,8 (29,8-42)	34±4,5 (30,4-41,3)	32,1±6,3 (23,3-39,3)	32,1±8,5 (23,6-43,8)	39,0±7,1 (33,7-49,2)	40,7±6,3 (33,3-47,0)
<i>VAL (x10<sup>3</sup>/μl)</i>	4,7 ±2,0 (2,4-8,2)	6,5±1,7 (4-9,2)	7,6±1,5 (6,4-9,9)	6,8±1,4 (4,7-8,3)	5,0±1,1 (3,4-6,5)	3,4±1,4 (2,1-5,2)	3,5±1,0 (2,4-4,8)	3,3±0,9 (2,3-4,8)	3,7±0,7 (2,7-4,3)	3,7±1,1 (2,4-4,8)	3,0±1,2 (1,6-4,5)	1,5±0,7 (1,0-2,6)
<i>VAM (x10<sup>3</sup>/μl)</i>	1,5 ±0,6 (0,9-2,4)	2,4±0,6 (1,6-3,4)	2,7±0,8 (2,0-3,6)	2,5±0,4 (2,0-2,8)	2,1±0,6 (1,4-2,9)	1,8±0,8 (1,2-3,1)	1,7±0,3 (1,4-2,2)	1,7±0,4 (1,2-2,2)	1,8±0,5 (1-2,4)	1,7±0,7 (1-2,6)	1,9±0,5 (1,3-2,4)	1,0±0,3 (0,7-1,3)

Grupo T0,5 recebeu injeção de 0,5 mg Fe/kg de FM-DMSA. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PLT: plaquetas, PL: porcentagem de linfócitos, PM: monócitos, VAL: valor absoluto de linfócitos, VAM: valor absoluto de monócitos.

**Tabela 4.** Valores hematológicos do grupo T -5 com médias e desvio padrão ao longo do experimento.

<i>Parâmetros</i>	<b>D0</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<b><i>TCB</i></b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	6,4 $\pm$ 1,4 (4,5-8,3)	7,9 $\pm$ 0,8 (6,8-8,7)	10,5 $\pm$ 4,4 (5,2-15,5)	6,3 $\pm$ 2,0 (4,7-9,0)	6,4 $\pm$ 2,7 (2,3-8,7)	5,3 $\pm$ 1,3 (4,5-7,5)	4,1 $\pm$ 1,4 (2,3-5,6)	3,7 $\pm$ 1,2 (2,9-5,8)	4,3 $\pm$ 1,0 (3,5-6,1)	4,5 $\pm$ 1,9 (2,9-7,6)	4,2 $\pm$ 1,0 (3,3-5,9)	2,5 $\pm$ 0,2 (1,8-4,1)
<b><i>TCV</i></b> ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	10,0 $\pm$ 0,7 (9,3-10,8)	8,5 $\pm$ 1,2 (6,7-9,3)	8,9 $\pm$ 1,2 (7,5-10,6)	8,2 $\pm$ 0,3 (7,9-8,5)	7,5 $\pm$ 1,7 (4,6-8,5)	8,3 $\pm$ 0,7 (7,9-9,6)	7,9 $\pm$ 0,5 (7-8,2)	8,3 $\pm$ 0,4 (7,8-8,8)	8,8 $\pm$ 0,6 (8,2-9,7)	8,0 $\pm$ 0,6 (7-8,5)	7,9 $\pm$ 0,5 (7,3-8,5)	7,8 $\pm$ 0,3 (7,7-10,9)
<b><i>HGB</i></b> (g/dl)	21,6 $\pm$ 1,5 (19,9-23,5)	18,3 $\pm$ 2,5 (14,2-20,4)	18,5 $\pm$ 2,3 (15,9-21,5)	16,6 $\pm$ 0,3 (16,2-16,9)	15,2 $\pm$ 3,5 (9-17,4)	16,6 $\pm$ 1,1 (15,9-18,5)	15,9 $\pm$ 1,2 (13,9-16,7)	16,6 $\pm$ 0,7 (16,2-17,3)	17,8 $\pm$ 1,5 (16,6-20)	16,3 $\pm$ 1,6 (13,8-17,9)	15,8 $\pm$ 1,0 (14,4-16,6)	15,6 $\pm$ 0,8 (15,3-21,8)
<b><i>HCT</i></b> (%)	55,9 $\pm$ 3,4 (51,5-60,1)	48,3 $\pm$ 6,2 (38,4-53,1)	50,6 $\pm$ 6,0 (44,4-58,8)	45,8 $\pm$ 1,0 (44,5-46,1)	41,2 $\pm$ 8,9 (25,4-46,3)	45,2 $\pm$ 3,3 (43,2-51,1)	43,0 $\pm$ 2,8 (38,8-45,3)	44,5 $\pm$ 2,0 (41,6-46,6)	47,7 $\pm$ 3,9 (44,2-53,4)	42,7 $\pm$ 4 (36,4-46,7)	42,7 $\pm$ 2,9 (39,1-45,1)	42,9 $\pm$ 2,0 (41,1-60,0)
<b><i>VGM</i></b> (fl)	56 $\pm$ 1,1 (54,8-57,5)	56,5 $\pm$ 0,9 (55,3-57,1)	57,0 $\pm$ 1,3 (55,5-58,7)	55,7 $\pm$ 0,9 (54,4-56,3)	54,6 $\pm$ 0,9 (53,7-55,8)	54,3 $\pm$ 0,6 (53,3-54,7)	54,3 $\pm$ 1,1 (52,5-54,7)	53,5 $\pm$ 1,0 (52,2-54,8)	53,9 $\pm$ 0,7 (53,3-55,1)	53,6 $\pm$ 1,1 (52,2-55,2)	54,3 $\pm$ 1,4 (52,9-56,4)	49,1 $\pm$ 0,1 (53,4-57,0)
<b><i>HGM</i></b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	21,6 $\pm$ 0,3 (21,2-22,0)	21,3 $\pm$ 0,5 (20,8-21,9)	20,8 $\pm$ 0,4 (20,3-21,3)	20,1 $\pm$ 0,4 (19,8-20,6)	20,1 $\pm$ 0,4 (19,5-20,7)	19,9 $\pm$ 0,4 (19,3-20,3)	20,1 $\pm$ 0,3 (19,8-20,5)	20,0 $\pm$ 0,4 (19,5-20,5)	20,1 $\pm$ 0,4 (19,6-20,6)	20,4 $\pm$ 0,6 (19,8-21,2)	20,1 $\pm$ 0,7 (19,3-21,1)	17,9 $\pm$ 0,1 (19,4-20,8)
<b><i>CHCM</i></b> (g/dl)	38,7 $\pm$ 0,4 (38,1-39,1)	37,8 $\pm$ 0,6 (37,0-38,4)	36,5 $\pm$ 0,5 (35,8-37)	36,2 $\pm$ 0,3 (35,9-36,6)	36,8 $\pm$ 0,8 (35,4-37,6)	36,7 $\pm$ 0,4 (36,2-37,2)	36,9 $\pm$ 0,6 (36,2-37,6)	37,4 $\pm$ 0,2 (37,1-37,4)	37,4 $\pm$ 0,4 (36,8-37,8)	38,1 $\pm$ 0,3 (37,3-38,4)	37,1 $\pm$ 0,4 (36,6-37,6)	32,4 $\pm$ 0,1 (35,7-37,1)
<b><i>PLT</i></b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	673 $\pm$ 31 (628-714)	531 $\pm$ 195 (298-702)	608 $\pm$ 289 (130-871)	625 $\pm$ 332 (76-849)	552 $\pm$ 362 (128-903)	655 $\pm$ 328 (94-884)	504 $\pm$ 337 (204-928)	586 $\pm$ 362 (27-877)	748 $\pm$ 130 (581-916)	702 $\pm$ 285 (229-942)	540 $\pm$ 319 (200-892)	5649 $\pm$ 37 (337-813)
<b><i>PL</i></b> (%)	71,3 $\pm$ 2,6 (68,5-75,0)	65,0 $\pm$ 8,2 (53,2-71,2)	71,5 $\pm$ 11,8 (59,1-90,8)	68,1 $\pm$ 6,0 (59,8-76,5)	67,4 $\pm$ 2,7 (65,2-71,6)	64 $\pm$ 6,8 (56,3-74,8)	59,1 $\pm$ 6,6 (50,5-66,3)	64,3 $\pm$ 5,2 (56,9-69,7)	59,2 $\pm$ 4,1 (56,5-66,3)	62,4 $\pm$ 4,9 (56,8-69,1)	59,7 $\pm$ 7,9 (48,5-68)	53,6 $\pm$ 0,6 (51,3-68,7)
<b><i>PM</i></b> (%)	28,7 $\pm$ 2,6 (25-31,5)	34,9 $\pm$ 8,2 (28,5-46,8)	28,5 $\pm$ 11,8 (9,2-40,9)	31,9 $\pm$ 6,0 (23,5-40,2)	32,6 $\pm$ 2,7 (28,4-34,8)	36,0 $\pm$ 6,8 (25,2-43,7)	40,9 $\pm$ 6,6 (33,7-49,5)	35,7 $\pm$ 5,2 (30,3-43,1)	40,8 $\pm$ 4,1 (33,7-43,5)	37,6 $\pm$ 4,9 (30,9-43,2)	40,3 $\pm$ 7,9 (32,0-51,5)	36,6 $\pm$ 0,7 (31,1-48,7)
<b><i>VAL</i></b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	4,6 $\pm$ 1 (3,4-6,0)	5,2 $\pm$ 1,1 (3,9-6,2)	7,2 $\pm$ 2,3 (4,7-10,0)	4,4 $\pm$ 1,7 (3,2-6,3)	4,3 $\pm$ 1,8 (1,5-5,7)	3,5 $\pm$ 1,2 (2,5-5,6)	2,4 $\pm$ 0,8 (1,5-3,6)	2,4 $\pm$ 0,9 (1,8-3,9)	2,5 $\pm$ 0,6 (2,0-3,4)	2,9 $\pm$ 1,3 (1,6-4,9)	2,5 $\pm$ 0,9 (1,8-4,0)	1,5 $\pm$ 0,2 (1,0-2,8)
<b><i>VAM</i></b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1,8 $\pm$ 0,5 (1,1-2,3)	2,7 $\pm$ 0,4 (2,5-3,4)	3,3 $\pm$ 2,1 (0,5-5,5)	2,0 $\pm$ 0,5 (1,5-2,7)	2,1 $\pm$ 0,9 (0,8-3)	1,9 $\pm$ 0,2 (1,7-2)	1,7 $\pm$ 0,7 (0,8-2,8)	1,3 $\pm$ 0,4 (0,9-1,9)	1,8 $\pm$ 0,5 (1,4-2,7)	1,7 $\pm$ 0,6 (1,3-2,7)	1,6 $\pm$ 0,3 (1,2-2)	1,0 $\pm$ 0,0 (0,7-1,7)

Grupo T5 recebeu injeção de 0,5 mg Fe/kg de FM-DMSA. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PLT: plaquetas, PL: porcentagem de linfócitos, PM: monócitos, VAL: valor absoluto de linfócitos, VAM: valor absoluto de monócitos.

Nos apêndices de P a AD podem ser observados os resultados dos bioquímicos de cada animal experimental ao longo de 10 meses de experimento. As médias destes valores encontram-se nas tabelas 6 a 8, respectivamente para os grupos Controle, T0,5 e T5. Todos os dados bioquímicos foram comparados com o D0 (Tabela 5). Foi observado que os valores médios para ureia e ALT estavam elevados (em relação ao D0) entre o D15 e o D90, e a partir desta data os valores apresentam-se normais, tanto nos grupos tratados como no grupo controle. Analisando os exames de cada animal individualmente, o mesmo padrão de resultado foi observado. No que se refere ao bioquímico ferro sérico (Fe) foi possível observar que as taxas mantiveram-se dentro de um limite relativamente pequeno de variação, de modo geral nos grupos controle, T0,5 e T5.

**Tabela 5.** Valores mínimo e máximo para dosagens bioquímicas de soro das fêmeas de ratos Wistar utilizadas no experimento antes de qualquer tratamento (D0) considerados como padrão (N=18).

Parâmetro	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Ferro (µg/dL)
	0,5-1	48-95	28-90	127-333	184-556

ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

**Tabela 6.** Valores das dosagens bioquímicas de soro do grupo controle com médias e desvio padrão ao longo do experimento.

<i>Parâmetros</i>	<b>D0</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D 270</b>	<b>300</b>
<b><i>Creatinina K</i></b> <b><i>(mg/dL)</i></b>	0,6±0,1 (0,5-0,68)	0,7±0,1 (0,62-0,94)	0,9±0,3 (0,76-1,44)	1,1±0,6 (0,77-2,12)	0,9±0,1 (0,79-0,93)	0,5±0,1 (0,4-0,66)	0,7±0,4 (0,5-1,5)	0,5±0,1 (0,48-0,61)	0,7±0,1 (0,71-0,85)	0,7±0,1 (0,65-0,8)	0,8±0,3 (0,57-1,1)	0,2±0,2 (0,01-0,75)
<b><i>Uréia</i></b> <b><i>(mg/dL)</i></b>	67,3±17,3 (95-51)	80,8±9,8 (69-94)	94,7±9,1 (78-103)	80,8±8 (73-89)	80±6 (74-89)	56,4±10,9 (39-69)	38,6±13,2 (21-58)	51,6±6,5 (47-63)	45,6±4,8 (38-50)	44,5±3,0 (42-48)	39,8±4,1 (33-44)	39,8±10,1 (23-50)
<b><i>ALT</i></b> <b><i>(U/L)</i></b>	59,2±19,1 (42-90)	83±24 (53-126)	90,8±18,7 (68-117)	85±50,6 (46-173)	89,2±32,9 (35-125)	46,4±25,5 (19-80)	44,8±14,9 (21-60)	53,2±23,9 (14-71)	36,2±14,7 (18-56)	51,0±28,2 (18 - 89)	51,2±23,5 (29-89)	42,8±22,8 (10-71)
<b><i>AST</i></b> <b><i>(U/L)</i></b>	204,7±64,5 (164-333)	218,5±51 (170-288)	263,3±84,9 (173-379)	233,4±85 (153-364)	237±41,8 (166-272)	186±53,3 (130-243)	154,4±133,9 (84-393)	158,2±63,5 (62-230)	173,6±39,7 (112-217)	154,8±34,3 (127 - 210)	145,8±44,7 (92-195)	192,2±50,3 (118-232)
<b><i>Ferro</i></b> <b><i>(µg/dL)</i></b>	254,3±56 (184-321)	314±26,9 (283-328)	394,6±43,8 (317-420)	1232,5±191,6 (1097-1368)	308,6±73,7 (249-403)	309,4±60,5 (140-434)	186±53,3 (41-280)	262,6±260,3 (191-306)	295,4±296,1 (250-354)	286,8±294,2 (250-375)	368,8±388,9 (288-434)	296,6±316,3 (288-434)

Grupo controle recebeu 100µl de solução salina. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

**Tabela 7** - Valores das dosagens bioquímicas de soro do grupo T-0,5 com médias e desvio padrão ao longo do experimento.

<i>Parâmetros</i>	<b>D0</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>Creatinina K (mg/dL)</i>	0,7±0,1 (0,54-0,92)	0,7±0 (0,63-0,75)	0,7±0,1 (0,47-0,8)	0,8±0,1 (0,77-0,89)	0,7±0,2 (0,36-0,92)	0,4±0,2 (0-0,56)	0,6±0,1 (0,49-0,69)	0,7±0,1 (0,61-0,8)	0,8±0,1 (0,74-0,99)	0,8±0,2 (0,53-1,04)	0,9±0,1 (0,77-0,94)	0,5±0,1 (0,37-0,58)
<i>Uréia (mg/dL)</i>	66,3±10,8 (51-80)	76,1±7,2 (66-84)	66±30,3 (15-87)	80,4±4,3 (75-86)	73,6±15,4 (53-85)	52,2±13,7 (36-70)	46±0,64 (39-54)	57,6±4,3 (53-63)	52±3,6 (48-55)	52,8±8,8 (39-61)	41,5±3,5 (38-45)	42,0±12,0 (28-57)
<i>ALT (U/L)</i>	49,9±19,5 (28-72)	79,6±16,5 (65-112)	78,8±35,1 (51-125)	74±7,6 (66-84)	89,6±34,3 (58-136)	70,8±36,6 (51-136)	51,4±8 (40-61)	58,6±10 (44-69)	59,7±2,9 (63-58)	60,2±11,6 (43-71)	63,0±22,3 (43-95)	52,5±14,6 (35-65)
<i>AST (U/L)</i>	192,3±57,8 (127-290)	147,2±16,8 (124-174)	238±107,7 (136-336)	146,4±71,3 (51-251)	146,8±54,6 (105-227)	201,2±140,8 (106-445)	113,4±32,9 (75-156)	164,2±39 (128-226)	175±128,5 (47-304)	213,4±111,0 (122-374)	139,0±25,4 (113-165)	201,3±52,2 (133-260)
<i>Ferro (µg/dL)</i>	320,3±123,8 (222-556)	349,3±39,7 (294-396)	319,5±268 (130-509)	347±30,1 (317-396)	318,2±37,2 (273-372)	236,4±40,9 (167-273)	277±43,9 (239-348)	280,4±39,9 (223-333)	319,7±15,8 (306-337)	240,2±49,9 (163-295)	402,0±246,0 (181-667)	343,5±103,0 (235-474)

Grupo T0,5 recebeu injeção de 0,5 mg Fe/kg de FM-DMSA. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

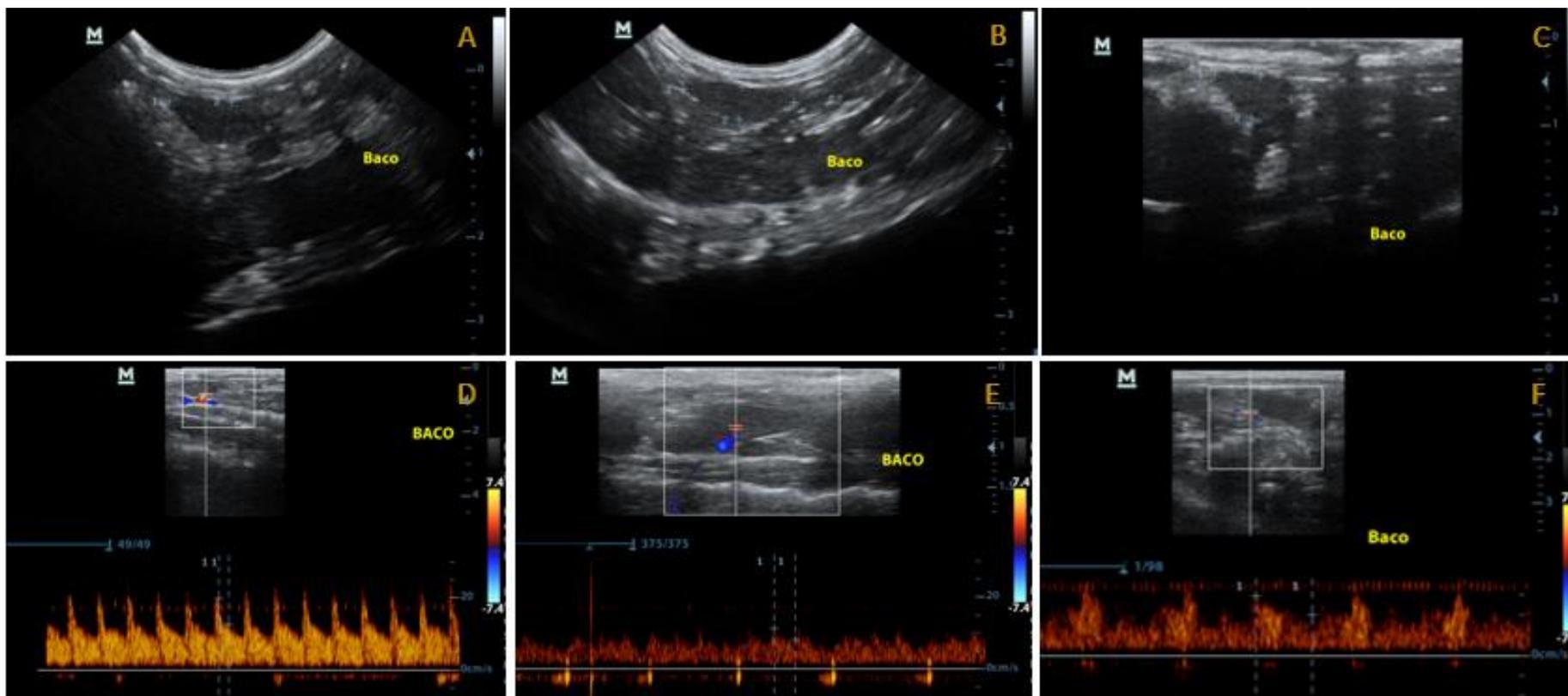
**Tabela 08** – Valores das dosagens bioquímicas de soro do grupo T-5 com médias e desvio padrão ao longo do experimento.

<i>Parâmetros</i>	<b>D0</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<b><i>Creatinina K</i></b> <b><i>(mg/dL)</i></b>	0,8±0,1 (0,62-1)	0,7±0,1 (0,59-0,78)	0,8±0,1 (0,66-0,93)	0,8±0 (0,76-0,89)	0,9±0,2 (0,74-1,17)	0,5±0 (0,46-0,58)	0,4±0,4 (0-0,82)	0,6±0,1 (0,54-0,66)	0,8±0,2 (1,58-1,3)	0,8±0,1 (0,68-0,87)	0,9±0,1 (0,71-1,03)	0,5±0,4 (0,06-0,89)
<b><i>Uréia</i></b> <b><i>(mg/dL)</i></b>	82,2±8,8 (70-94)	76,4±12,3 (63-92)	102,8±7,9 (93-107)	79,8±5,1 (74-85)	83,8±5,9 (77-90)	71±4,8 (65-78)	52,8±13,3 (36-68)	53,8±4,3 (49-60)	50,4±4,7 (43-56)	47,6±6,4 (44-59)	46,4±5,7 (38-54)	49,2±9,3 (43-64)
<b><i>ALT</i></b> <b><i>(U/L)</i></b>	54,2±15,1 (37-73)	76,6±17,9 (62-107)	69,8±30,7 (26-91)	65,3±14,5 (53-86)	88,4±17,4 (68-108)	67,2±11,5 (56-85)	42,8±16,5 (20-63)	55,6±7,5 (49-66)	51,6±13,1 (40-73)	60,4±14,5 (53-80)	63,0±21,0 (42-98)	62,2±37,8 (39-129)
<b><i>AST</i></b> <b><i>(U/L)</i></b>	188,5±600,1 (144-277)	142,8±29,7 (109-178)	305,5±48,8 (271-340)	206,8±114,9 (137-378)	206,8±43,6 (162-266)	197,4±64,4 (119-271)	137,6±52,3 (78-212)	176±54,8 (116-266)	121±38,4 (85-174)	129,8±40,7 (101-201)	151,8±60,5 (94-249)	185,4±49,9 (126-226)
<b><i>Ferro</i></b> <b><i>(µg/dL)</i></b>	310,5±95 (225-423)	479,3±97,6 (376-570)	403±38,2 (376-430)	345,5±42,2 (294-386)	328,8±30,9 (292-365)	254,6±14,8 (239-270)	260±48,6 (201-331)	271,4±38,6 (212-310)	298,6±36,2 (254-347)	348,6±85,5 (243-465)	376,6±87,4 (299-507)	303,8±139,0 (542-205)

Grupo T5 recebeu injeção de 5 mg Fe/kg de FM-DMSA. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

A partir das avaliações ultrassonográficas foi possível observar que todos os animais em todos os grupos nos meses avaliados apresentaram ecogenicidade e topografia normais no baço (Figura 6), fígado (Figura 7), bexiga (Figura 8), estômago (Figura 9) e pulmões (Figura 10).

Os rins (Figura 11) de todos os animais de todos os grupos apresentaram ecogenicidade e topografia normal. Porém, foram visualizadas, em animais tratados, alterações renais compatíveis com dilatação da pelve renal (hidronefrose – Figura 11B e C). Aos 4 meses, apenas o animal do grupo T 0,5 o animal 3 apresentou essa alteração que se repetiu aos 6, 7 e 9 meses. Aos 6 meses, o animal 1 deste mesmo grupo apresentou tal alteração, que foi vista novamente aos 9 meses no mesmo animal. Ainda no grupo T 0,5, os animais 4 e 5 apresentaram hidronefrose aos 7, 8 e 10 meses. Quanto ao grupo T5, todos os animais, em algum momento do experimento, apresentaram hidronefrose. A alteração foi mais consistente aos 10 meses quando quatro dos cinco animais apresentaram hidronefrose. As demais alterações foram observadas de forma isolada, sendo assim: T5 – 1 aos 7 meses, T5-2 e 3 aos 10 meses, T5-4 aos 8 e 10 meses. O animal 5 foi o que apresentou mais vezes: aos 8, 9 e 10 meses. No grupo controle, apenas um animal (1) apresentou hidronefrose no 8º mês, achado que não foi mais observado nos meses subsequentes. Um resumo das observações de hidronefrose nos animais experimentais é mostrado no Quadro 1. As análises estatísticas não correlacionaram o aumento de volume renal com a presença de hidronefrose aqui descrita.



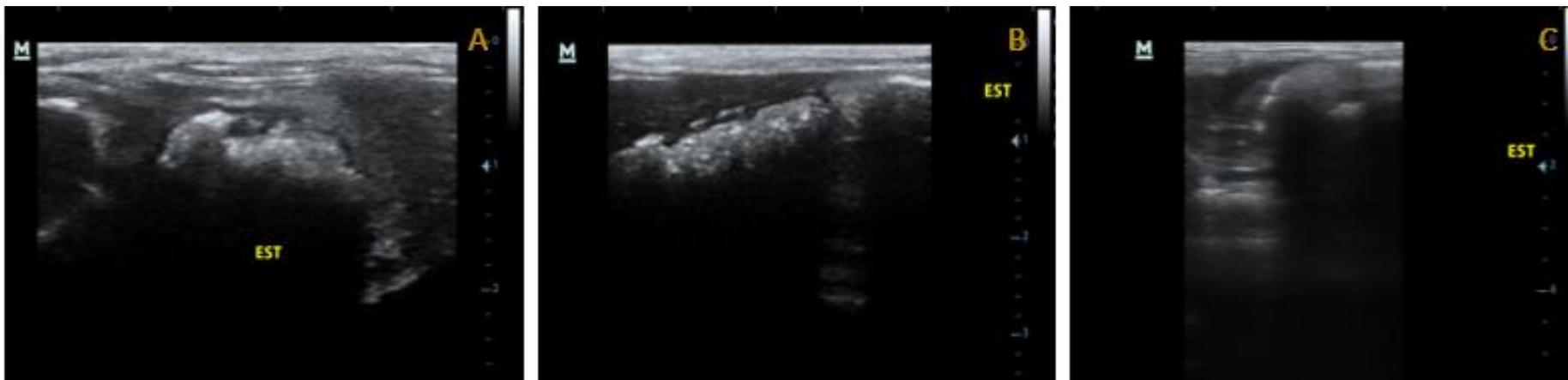
**Figura 6.** Imagens representativas de avaliações ultrassonográficas de baço dentro dos padrões de normalidade de ecogenicidade, tamanho e topografia, independente do tratamento (A a C) e análise da ferramenta Doppler no hilo esplênico (artéria esplênica) para cálculo do índice de resistividade (D a F). **A.** Grupo Controle (animal 5 aos 6 meses). **B.** Grupo T0,5 (animal 2 aos 7 meses). **C.** Grupo T5 (animal 1 aos 5 meses). **D.** Grupo Controle (animal 4 aos 10 meses) **E.** Grupo T0,5 (animal 2 aos 9 meses). **F.** Grupo T5 (animal 2 aos 10 meses).



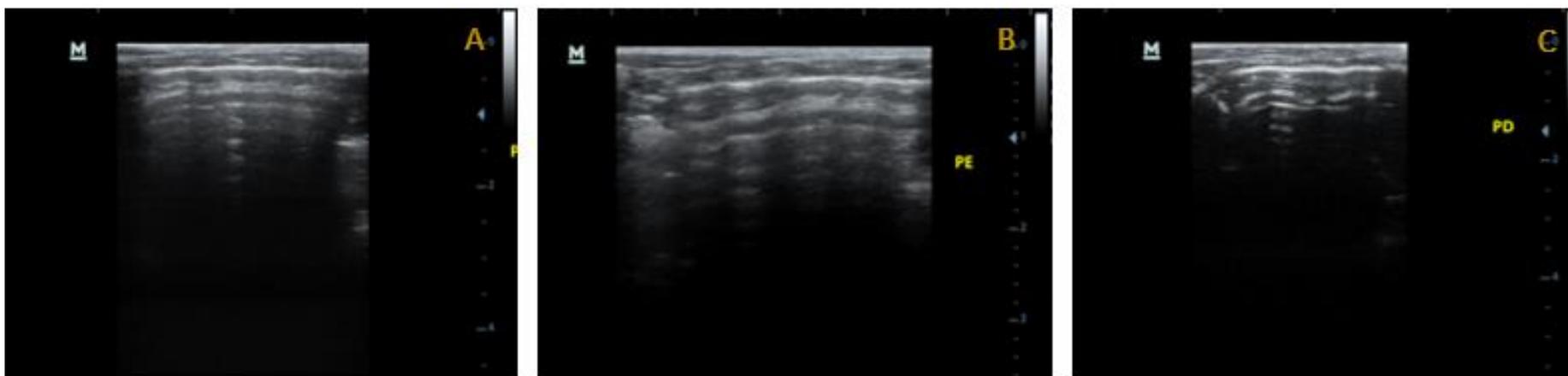
**Figura 7.** Imagens representativas de avaliações ultrassonográficas de fígado dentro dos padrões de normalidade de ecogenicidade, tamanho e topografia, independente do tratamento (A a C). **A.** Grupo Controle (animal 3 aos 7 meses) **B.** Grupo T 0,5 (animal 2 aos 5 meses) **C.** Grupo T 5 (animal 2 aos 5 meses).



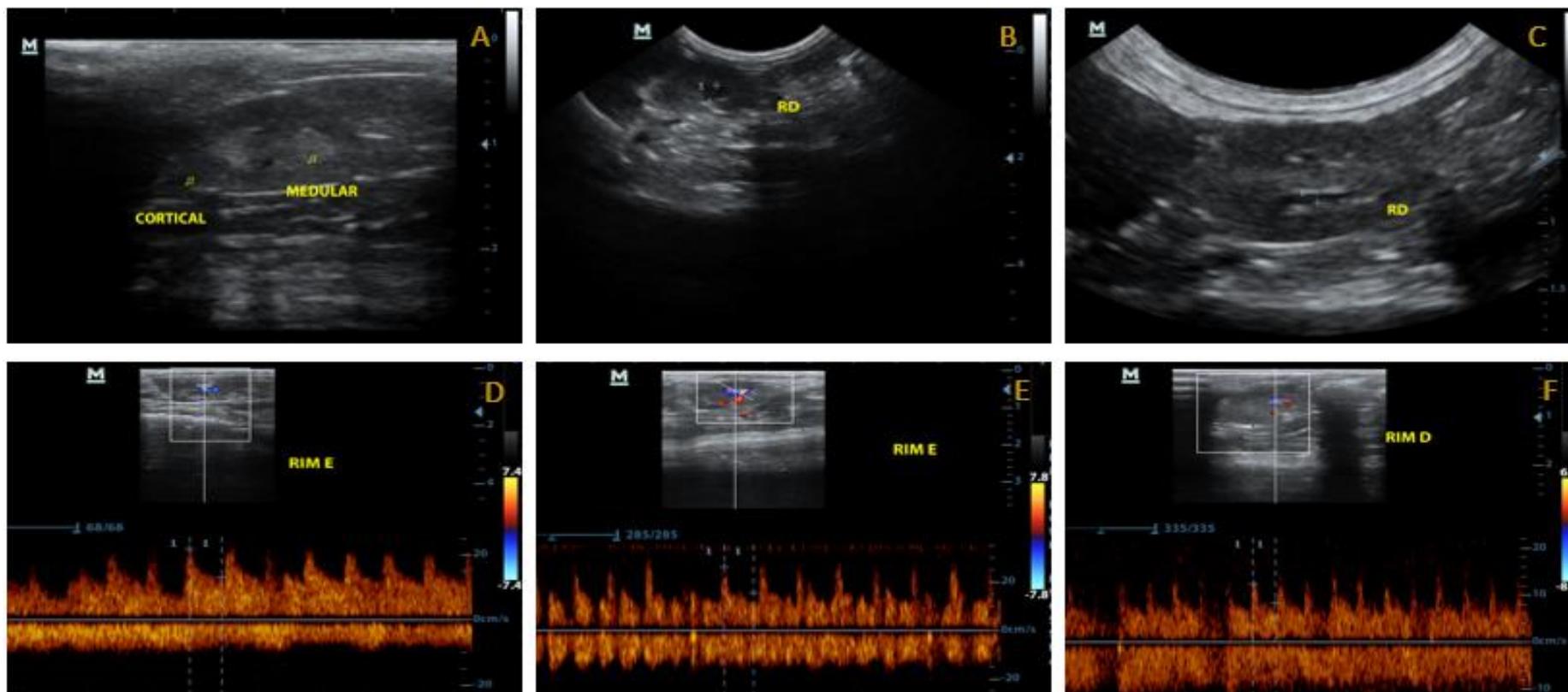
**Figura 8.** Imagens representativas de avaliações ultrassonográficas de bexiga dentro dos padrões de normalidade de ecogenicidade, tamanho e topografia, independente do tratamento (A a C). **A.** Grupo Controle (animal 4 aos 5 meses) **B.** Grupo T 0,5 (animal 3 aos 7 meses) **C.** Grupo T 5 (animal 5 aos 9 meses).



**Figura 9.** Imagens representativas de avaliações ultrassonográficas de estômago dentro dos padrões de normalidade de ecogenicidade, tamanho e topografia, independente do tratamento (A a C). **A.** Grupo Controle (animal 1 aos 5 meses) **B.** Grupo T 0,5 (animal 4 aos 10 meses) **C.** Grupo T 5 (animal 4 aos 9 meses).



**Figura 10.** Imagens representativas de avaliações ultrassonográficas de pulmão (direito ou esquerdo) dentro dos padrões de normalidade de ecogenicidade, tamanho e topografia, independente do tratamento (A a C). **A.** Grupo Controle (animal 2 aos 7 meses, pulmão direito) **B.** Grupo T 0,5 (animal 1 aos 10 meses, pulmão esquerdo) **C.** Grupo T 5 (animal 3 aos 10 meses, pulmão direito).



**Figura 11.** Imagens representativas de avaliações ultrassonográficas de rim dentro dos padrões de normalidade de ecogenicidade e topografia, independente do tratamento (A a C) e análise da ferramenta Doppler de vasos interlobares (artéria interlobar renal) para cálculo do índice de resistividade (D a F). **A.** Rim direito sem alterações, destacando arquitetura renal preservada (região cortical e medular), grupo controle (animal 1 aos 5 meses). **B.** Rim direito com alteração significativa de dilatação de pelve renal (cruzes marcadas). Grupo T0,5 (animal 3 aos 6 meses). **C.** Rim direito com alteração significativa de dilatação de pelve renal (cruzes marcadas). Grupo T5 (animal 1 aos 8 meses). **D.** Ultrassonografia com Doppler do rim esquerdo com dilatação de pelve renal e sem alterações no índice de resistividade. Mapa de vascularização. Grupo Controle (animal 5 aos 10 meses) **E.** Ultrassonografia com Doppler do rim esquerdo com dilatação de pelve renal e sem alterações no índice de resistividade. Mapa de vascularização. Grupo T0,5 (animal 4 aos 9 meses). **F.** Ultrassonografia com Doppler do rim direito com dilatação de pelve renal e diminuição do índice de resistividade. Mapa de vascularização. Grupo T5 (animal 1 aos 8 meses).

Quadro 1. Resumo das observações de hidronefrose nos animais experimentais ao longo do experimento

	<b>D 120</b>	<b>D180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<b>Controle</b>				1		
<b>T 0,5</b>	3	1 e 3	3,4 e 5	4 e 5	1 e 3	4 e 5
<b>T 5</b>			1	4 e 5	5	1, 2, 3 e 5

Grupo controle recebeu 100µl de solução salina, Grupo T0,5 recebeu injeção de 0,5 mg Fe/kg de FM-DMSA e Grupo T5 recebeu injeção de 5 mg Fe/kg de FM-DMSA.

Na análise da tomografia computadorizada, não foi possível observar alterações na pelve renal e nenhum outro tipo de alteração pode ser visualizada.

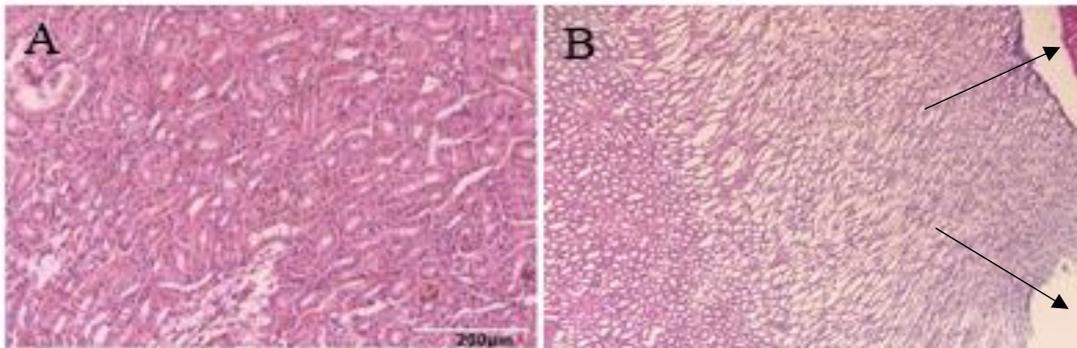
Na Tabela 9 estão apresentadas as medidas de avaliações ultrassonográficas com médias e desvio padrão de volume e índice de resistividade (IR) dos rins, e comprimento, largura e índice de resistividade do baço. Em geral, não houve variação nos dados ao longo do tempo e nem entre os grupos. Apenas o volume do rim esquerdo no Grupo T5 apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) aos 10 meses em relação aos 4 e 6 meses. E o comprimento do baço apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) aos 8 e 9 meses em relação ao mês 4.

**Tabela 9.** Médias ( $\pm$ DP) das medidas de comprimento, largura e índice de resistividade (IR) dos rins e do baço e de volume dos rins obtidas a partir da ultrassonografia associada ao Doppler.

GRUPO	MÊS	Rim Esquerdo		Rim Direito		Baço		
		Volume (cm3)	IR	Volume (cm3)	IR	Comprimento (cm)	Largura (cm)	IR
CONTROLE	4	0,50 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,34	0,41 $\pm$ 0,02	1,08 $\pm$ 0,10	0,46 $\pm$ 0,09	0,37 $\pm$ 0,08
	6	0,49 $\pm$ 0,18	0,41 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,12	0,41 $\pm$ 0,03	1,23 $\pm$ 0,29	0,48 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,04
	7	0,59 $\pm$ 0,16	0,39 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,17	0,39 $\pm$ 0,18	1,40 $\pm$ 0,21	0,50 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,02
	8	0,63 $\pm$ 0,11	0,39 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,13	0,39 $\pm$ 0,02	1,74 $\pm$ 0,39	0,55 $\pm$ 0,09	0,29 $\pm$ 0,02
	9	0,55 $\pm$ 0,13	0,42 $\pm$ 0,07	0,74 $\pm$ 0,25	0,41 $\pm$ 0,04	1,38 $\pm$ 0,21	0,51 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,04
	10	0,76 $\pm$ 0,18	0,4 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,14	0,42 $\pm$ 0,03	1,27 $\pm$ 0,25	0,47 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,04
T0,5	4	0,62 $\pm$ 0,1	0,40 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,05	1,34 $\pm$ 0,60	0,48 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,02
	6	0,57 $\pm$ 0,14	0,37 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,12	0,45 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,06
	7	0,76 $\pm$ 0,26	0,38 $\pm$ 0,07	0,65 $\pm$ 0,16	0,37 $\pm$ 0,05	1,33 $\pm$ 0,28	0,54 $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,04
	8	0,63 $\pm$ 0,67	0,37 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,05	1,65 $\pm$ 0,40	0,52 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,03
	9	0,81 $\pm$ 0,51	0,41 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,12	0,41 $\pm$ 0,06	1,35 $\pm$ 0,28	0,56 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,04
	10	0,94 $\pm$ 0,22	0,40 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,15	0,37 $\pm$ 0,02	1,38 $\pm$ 0,04	0,57 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,01
T 5	4	0,61 $\pm$ 0,24 <sup>A</sup>	0,41 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,10	0,40 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	0,52 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,06
	6	0,55 $\pm$ 0,10 <sup>A</sup>	0,39 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,09	0,43 $\pm$ 0,06	1,25 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,04
	7	0,66 $\pm$ 0,14	0,39 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,01	1,43 $\pm$ 0,29	0,52 $\pm$ 0,09	0,30 $\pm$ 0,03
	8	0,78 $\pm$ 0,19	0,38 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,04	1,87 $\pm$ 0,43 <sup>B</sup>	0,54 $\pm$ 0,10	0,32 $\pm$ 0,05
	9	0,65 $\pm$ 0,13	0,39 $\pm$ 0,03	0,63 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,03	1,68 $\pm$ 0,43 <sup>B</sup>	0,55 $\pm$ 0,14	0,32 $\pm$ 0,03
	10	0,98 $\pm$ 0,17 <sup>B</sup>	0,40 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,06	1,37 $\pm$ 0,36	0,46 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,04

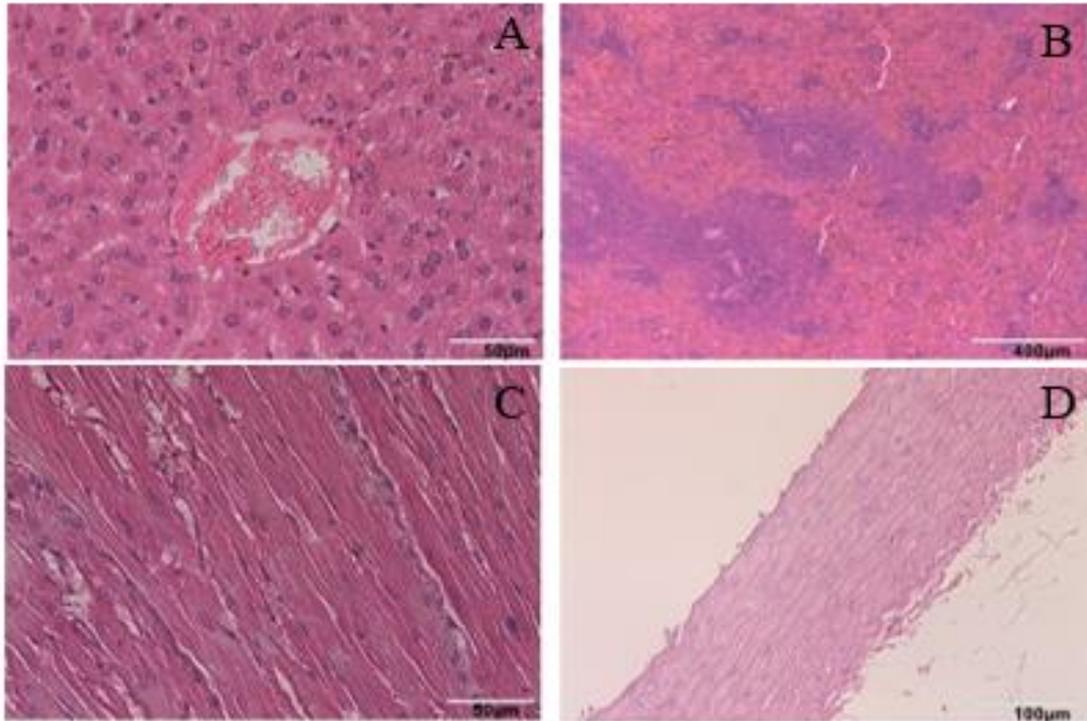
A,B – Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

As análises de histopatologia confirmaram as alterações de dilatação de pelve renal após a eutanásia, porém nenhum dano ao parênquima renal foi visualizado em nenhum dos animais. (Figura 12)

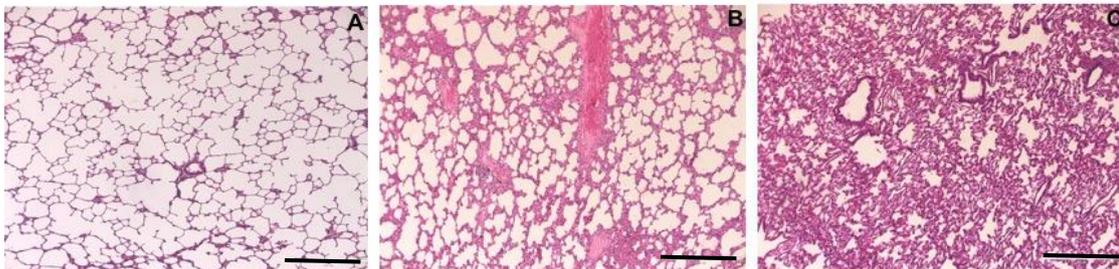


**Figura 12.** Fotomicrografia. **A.** Parênquima em região cortical renal sem alteração (animal do grupo T5). **B.** Região corticomedular e pélvica mostrando dilatação de pelve renal (espaço em branco com setas pretas, animal do grupo T5).

Na análise histopatológica, todos os animais apresentaram fígado, baço, tecido cardíaco e artéria aorta com morfologia normal após 10 meses da aplicação do FM-DMSA (Figura 13). Nos pulmões foi possível observar alterações de espessamento de septos interalveolares, que se apresentavam de maneira extensa nos animais do grupo T5 e parcial/focal nos animais do grupo T0,5, as quais foram observadas em todos os animais de ambos os grupos. O grupo controle apresentou morfologia normal do tecido pulmonar (Figura 14).



**Figura 13.** Fotomicrografias. **A.** Fígado sem alteração (animal do grupo T0,5). **B.** Baço sem alteração (animal do grupo T5). **C.** Coração sem alteração (animal do grupo T0,5). **D.** Artéria aorta sem alteração (animal do grupo T5).



**Figura 14.** Fotomicrografias de tecido pulmonar. **A.** Pulmão de animal do grupo controle, sem alterações. **B.** Pulmão com espessamento leve e focal dos septos interalveolares (animal do grupo T0,5). **C.** Pulmão com extenso espessamento de septos interalveolares (animal do grupo T5). Barras: 400µm.

## 5. DISCUSSÃO

Este trabalho é o primeiro a investigar os efeitos a longo prazo da administração sistêmica de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com DMSA, em relação à toxicidade potencial e capacidade para induzir alterações sanguíneas e de imagem em um sistema vivo. O rato de laboratório Wistar (*Rattus norvegicus*) utilizado como organismo experimental é um modelo excelente para os estudos de toxicologia a longo prazo, pois apresenta um ciclo de vida médio (3 anos), sua anatomia, fisiologia e genética são bem conhecidas no meio científico, o que é primordial para a uniformização dos resultados dos testes.

No presente trabalho, optamos por analisar os dados hematológicos e bioquímicos de cada animal individualmente, utilizando como critério de normalidade os dados dos animais experimentais antes de qualquer tratamento (D0). Foi constatado que dois dos parâmetros bioquímicos analisados (ureia e ALT) estavam aumentados em vários animais, especialmente nas coletas de sangue realizadas entre os dias 15 e 90 após a injeção. Na literatura há uma grande variação de limites de normalidade para parâmetros bioquímicos descritos para ratos (Melo et al., 2012; Lima et al., 2014)<sup>1</sup>. Comparando os dados de cada animal deste trabalho individualmente com o apresentado na literatura (Melo et al., 2012), verifica-se que a maioria dos animais apresentavam todos os parâmetros bioquímicos analisados (ureia, creatinina, ALT e AST) acima dos limites de normalidade entre os dias 15 e 90 após o início do experimento, independente do grupo. O manual de boas práticas da USP (Universidade de São Paulo) preconiza que apenas 1% do peso corporal pode ser coletado de ratos sem reposição de fluido e que o intervalo entre coletas deve ser de no mínimo duas semanas. É importante destacar aqui que durante o experimento as alterações de elevação dos parâmetros bioquímicos haviam sido notadas, o que foi relacionado com a coleta repetitiva de sangue. Assim, iniciou-se um procedimento de reposição de fluido, que consistia em administrar 2 ml de solução salina subcutânea após a coleta de sangue de cada animal. Este procedimento coincidiu com o retorno dos parâmetros aos limites de normalidade a partir do D120.

Após o D120 os valores se mostravam majoritariamente normais, apenas com

---

<sup>1</sup> Em Melo et al. (2012) os valores de referência relatados são: creatina: 0,4 – 0,7; ureia: 30-57; ALT: 26-60 e AST: 83- 154. Em Lima et al. (2014) os valores de referência relatados são: creatina: 0,28 – 1,10; ureia: 24 - 49; ALT: 32 - 63 e AST: 51 – 211.

alterações pontuais sem correlação com o tratamento. O significado de normalidade referente a uma amostra de sangue analisado é relativo. Os valores de referência, com um limite inferior e um limite superior são definidos através de dados de populações que gozam de boa saúde. No entanto, como em toda análise estatística, 5% da amostragem se encontra fora da norma. Assim, estar ligeiramente fora dos valores de referência nem sempre significa que existe uma patologia e que tal resultado deve ser sempre correlacionado com as alterações clínicas tais como sintomatologia e outros exames complementares (Gonzalez e Scheffer, 2003). No presente estudo, nenhuma alteração clínica foi observada nos animais experimentais. Assim, é possível afirmar que nas condições do presente estudo a injeção endovenosa de FM-DMSA não causou alterações hematológicas nos animais até 300 dias após o tratamento.

A exemplo do que está aqui sendo discutido, ao analisar os dados observamos diversos resultados de exame bioquímicos com ureia baixa após o D120, que se mostrou aleatório entre os grupos e em vários momentos ao longo do experimento, não mostrando qualquer constância de alteração ascendente ou descendente. A ureia é a principal forma de excreção de nitrogênio proveniente do catabolismo proteico, sendo assim, a finalidade da dosagem no sangue é utilizada para avaliar de forma grosseira a função renal, ou para confirmar e/ou avaliar a evolução de uma patologia que afete a função dos rins, ajudando a avaliar a extensão do dano renal. No entanto, a concentração sérica da ureia abaixo dos valores normais esperados pode ser ignorada no animal saudável. Diminuição da uremia é justificada em quadros de insuficiência hepática grave, o que não foi observado no presente estudo pelos exames bioquímicos de avaliação de danos hepáticos ou histopatológico de fígado, em nenhum dos grupos (controle e/ou tratamentos). Desta forma, talvez a associação dos exames aqui realizados com a urinálise seriada dos animais, poderia trazer mais informações a respeito do funcionamento renal, o que pode ser considerado para próximos estudos.

Em relação à dosagem de ferro sérico, não houve alterações significantes entre os grupos tratados e o controle, nem entre os dias pós-tratamento. O ferro é um componente comum no sangue, uma vez que é parte integrante da hemoglobina. A degradação da hemoglobina libera  $Fe^{+2}$  que pode permanecer estocado no interior dos macrófagos na forma de ferritina ou ainda ser exportado para o meio extracelular. O Fe é transportado no sangue pela transferrina até os locais onde este será reutilizado. Quando a capacidade de ligação da transferrina está totalmente saturada, o ferro pode circular livremente pelo

soro, na forma não ligada (Grotto, 2011). É possível que o Fe do fluido magnético injetado tenha permanecido circulante por pouco tempo (menos de 15 dias), e assim não ter sido detectado nos momentos em que os exames foram feitos. De fato, Chaves et al. (2002) mostraram que a meia vida das nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA no sangue é de cerca de 5 minutos.

A alteração visibilizada na ultrassonografia (dilatação de pelve renal) e confirmada pela histologia dos rins, parece estar relacionada com a administração do FM-DMSA nos animais. Esta alteração foi observada em vários animais tratados e em um animal controle, de forma intermitente, por vezes unilateral e por outras bilateral, e não mostrou causar dano ao parênquima renal, que não foi observado na histopatologia e nem correlacionado com o aumento de ureia e/ou creatinina no sangue. Casals et al (2008) durante um estudo correlacionando nanopartículas e toxicidade hipotetizaram que Nanopartículas poderiam ser nucleadoras de litíase renal. Sendo assim os casos de hidronefrose aqui encontrados de forma intermitente nos grupos T0,5 e T5 e de forma consistente em um animal do grupo T5, poderiam ser justificados pela presença de cristais que poderiam estar obstruindo de forma parcial a pelve e/ou os ureteres. Uma obstrução parcial ou completa, a curto prazo, origina diminuição da função renal, que pode ser reversível se o fluxo de urina for restabelecido prontamente (Adams & Syme, 2010). Isto pode ter ocorrido no presente estudo em função da fluidoterapia estabelecida, no momento em que o maior volume plasmático proporciona maior pressão de filtração e consequente maior produção de urina, o que promove a expulsão forçada de cristais ou sedimento. Embora a pelve renal não seja visualizada por ultrassom em rins normais, a diurese salina (fluidoterapia) também pode causar hidronefrose moderada de até 3,0 mm, às vezes unilateral, em cães (Nyland & Mattoon, 2005). Portanto, o uso de diurético (o que não é o caso deste estudo) ou pacientes submetidos a fluidoterapia devem ser considerados durante a avaliação. Apesar de termos acompanhados os animais ao longo de 10 meses e assim termos resultados a longo prazo do uso de FM-DMSA nunca antes relatados, talvez seja necessário um estudo ainda mais completo e longo focado em alterações renais, com urinálise associada para que se consiga identificar outras alterações além da observada nos exames de imagem.

É importante ressaltar que este trabalho é pioneiro na inserção da avaliação ultrassonográfica como método de qualificação de lesão tecidual. Por ser um método acessível, a ultrassonografia é um exame simples, indolor e seguro, não apresentando

riscos para o paciente e nem para o examinador. É de realização rápida, então não necessita de um preparo físico para o paciente, e pode ser realizado tanto em ambulatório como em unidades de tratamento intensivo e até mesmo durante cirurgias, por ser um equipamento com boa mobilidade. Apresenta custo baixo em relação aos demais exames de diagnóstico por imagem e possibilita a obtenção de imagens em tempo real permitindo avaliar de forma completa os órgãos da cavidade abdominal e até mesmo torácica (Seoane et al., 2011).

A alterações em parênquima pulmonar, também visualizadas em cortes histológicos, já foram descritas anteriormente. Chaves et al. (2002) mostrou que nanopartículas de magnetita recobertas com DMSA apresentam nas primeiras 24 horas após administração endovenosa, distribuição preferencial pelo pulmão, onde desencadeia um quadro inflamatório de moderado a severo caracterizado pela migração transendotelial dos leucócitos para o parênquima pulmonar. Os efeitos subcrônicos e crônicos da administração endovenosa de nanopartículas de magnetita recobertas com DMSA, por um período de até 90 dias, foram avaliados em outro estudo (Garcia et al., 2005), que relatou que a migração dos leucócitos pode se estender do parênquima pulmonar e alcançar o epitélio dos brônquios e alvéolos. O acúmulo de leucócitos nos compartimentos extra vasculares do pulmão pode causar lesão tecidual devido à liberação de substâncias tóxicas tais como proteases e espécies reativas de oxigênio resultando no desenvolvimento de quadros patológicos ou ainda contribuindo para o agravamento de doenças já estabelecidas (Gojova *et al.*, 2007). O acúmulo de leucócitos em compartimentos extra vasculares do pulmão reflete um efeito adverso causado pelas nanopartículas com DMSA a modelos animais (Chaves et al., 2005; Garcia et al., 2005). O curso temporal do processo de migração transendotelial dos leucócitos no pulmão ainda não foi determinado. É importante ressaltar que focos inflamatórios em tecido pulmonar são muito comuns devido ao alto contato do parênquima com o meio externo e partículas irritantes ou corpos estranhos inspirados pelas vias aéreas (Junqueira e Carneiro, 2008), e não necessariamente pode estar relacionada com a presença ou ausência das nanopartículas. Existem ainda estudos que demonstram que a distribuição preferencial para o parênquima pulmonar não se aplica para nanopartículas magnéticas com outras coberturas estabilizantes (Lacava et al., 2002; 2003; 2004; Sadeghiani et al., 2005; Brugin, 2007).

Os fluidos magnéticos que contém Nanopartículas magnéticas recobertas com

DMSA têm sido estudados *in vivo* em camundongos, mostrando por meio da ressonância magnética, uma maior deposição no tecido pulmonar. Garcia et al. (2005) e Chaves et al. (2002) relatam que, no entanto, após o sétimo dia, o acúmulo de nanopartículas é maior no fígado, chegando a atingir um valor seis vezes maior que no pulmão em 30 dias da administração intravenosa das Nanopartículas. Relatam ainda que o baço também é um órgão que recebe acúmulo de Nanopartículas, no entanto, em menor extensão. Parca (2006) ao analisar estas mesmas nanopartículas conseguiu visualizá-las no interior de hepatócitos, no tecido conjuntivo do espaço porta, na veia centro-lobular e em torno dos ductos biliares, mas sem causar alterações morfológicas no fígado. Já um estudo feito em macacos (Monge-Fuentes et al., 2011) menciona que aglomerados de NPMs foram principalmente observados no pulmão, fígado, rim e baço em todos os tempos experimentais, no caso 12 horas, 30 e 90 dias após injeção intravenosa. A análise mostrou também que conforme o tempo avançou, menos aglomerados foram visualizados. Alterações morfológicas foram observadas unicamente no tecido hepático 90 dias após administração, mostrando um aumento na área ocupada pelo espaço de Disse, e os autores sugerem que essa hepatotoxicidade foi possivelmente causada por um excesso de ferro no tecido (Monge-Fuentes et al., 2011). No presente estudo também não foram vistas alterações morfológicas no fígado ou no baço nas análises de imagem e histopatológicas 300 dias após a administração.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi proposta deste trabalho a investigação do potencial tóxico a longo prazo da nanopartícula de maghemita recoberta com DMSA utilizando avaliando-se alterações sanguíneas laboratoriais e também exames de imagem. Demonstrou-se que: I) Os animais apresentaram ganho de peso, com períodos de estabilização e sem queda significativa após a injeção de FM recoberta com DMSA, II) não foi possível identificar, quaisquer alterações hematológicas que possam ser relacionadas à administração de FM-DMSA, nem na dose de 0,5 mg Fe/kg nem na de 5 mg Fe/kg, III) A partir das avaliações ultrassonográficas foi possível observar que todos os animais em todos os grupos nos meses avaliados apresentaram ecogenicidade, topografia e tamanho normal nos rins, baço, fígado, bexiga, estômago e pulmões, IV), quanto às alterações de dilatação de pelve renal podemos associá-las à reposição de fluido feita em virtude das frequentes coletas para análises sanguíneas, V) Na análise da tomografia, não foi possível observar alterações na pelve renal e nenhum outro tipo de alteração pode ser visualizada, VI) Todos os órgãos apresentaram histopatologia normal após 10 meses da aplicação do FM-DMSA, exceto os pulmões e rins. Nos pulmões foi possível observar alterações de espessamento de septos interalveolares, que se apresentavam de maneira extensas no grupo T5 e parciais/focais no grupo T0,5, apesar de observadas em todos os animais de ambos os grupos. O grupo controle apresentou morfologia normal do tecido pulmonar. A dilatação de pelve renal foi confirmada nas análises histopatológicas.

Sendo assim, frente aos referidos resultados, o uso de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com DMSA (FM-DMSA) não apresenta toxicidade em sistema vivo a longo prazo, devendo-se realizar mais estudos quanto às alterações pulmonares.

Sugere-se também avaliar os efeitos renais por tempo mais longo e com exames adicionais como por exemplo urinálise. Quanto ao fígado, análises séricas mais completas podem trazer novos dados sobre lesões agudas que não foram percebidas no presente estudo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L.G.; SYME, H.M. Canine ureteral and lower urinary tract diseases. ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E. (Eds.) *Veterinary Internal Medicine*. ST. Louis: Saunders Elsevier p.2114 , (2010).
- BRAZ, Shélida Vasconcelos. Avaliação morfológica de baco, linfonodo e fígado de macacos-prego *Cebus apella* tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA. 2008. 85f. Dissertação de mestrado em Patologia molecular. Universidade de Brasília, Brasília (2008).
- BRAZ, Juliana Machado. Efeitos das nanopartículas magnéticas à base de maghemita recobertas com ácido 2, 3 – dimercaptosuccínico em macrófagos de camundongos. 2011. 106f. Dissertação de mestrado em Biologia Animal. Universidade de Brasília, Brasília (2011).
- BRUGIN, Adriana. Avaliação da biocompatibilidade/ toxicidade de fluidos magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas swiss. 2007. 100 f. Dissertação de mestrado em Patologia Molecular - Universidade de Brasília, Brasília (2007).
- BURK, R.L.; FEENEY, D.A. *Small Animal Radiology and Ultrasonography, A diagnostic Atlas and Text*. Elsevier Science (2003).
- CASALS, E., VÁZQUEZ-CAMPOS, S., BASTÚS, N. G., & PUNTES, V. Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(8), 672–683 (2008).
- CHAVES, S. B.; *et al.*, Light microscopy and magnetic resonant characterization of DMSA – coated magnetic fluid in mice. *IEEE Transaction on Magnetics*, v.38, n.5, p 3231 – 3233, (2002).
- CHAVES, S.B.; *et al.*, Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lungs induced by 2, 3 meso-dimercaptosuccinic-coated magnetic nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, 97:10Q915 (2005).
- DELCROIX, G.J-R., *et al.*: Mesenchymal and neural stem cells labeled with HEDP-coated SPIO nanoparticles: in vitro characterization and migration potencial in rat brain. *Brain Res.* 1255, 18-31 (2009).
- GARCIA, M. P. *et al.*, Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. *Journal of Magnetism and*

Magnetic Materials, 293, 277–282 (2005).

GOJOVA, et al. Induction of Inflammation in Vascular Endothelial Cells by Metal Oxide Nanoparticles: Effect of Particle Composition. *Environmental Health perspectives*. 115. 403-9. 10.1289/ehp.8497 (2007).

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. Simpósio de patologia clínica veterinária da região sul do Brasil, 2003, Porto Alegre. Anais p.73-87. Porto Alegre: UFRGS, (2003).

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev. Bras. Hematologia. Hemoterapia*. v. 30, n. 5, p. 390-397, (2011).

GUPTA A. K., GUPTA M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995 (2005).

KEALY J.K.; MCALLISTER H. *Diagnostic Radiology and Ultrasonography of Dog and Cat*. 3a ed. Saunders Company (2000).

JENG, H.A; SWANSON, J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J. Environ Sci Health Part A* 41 (12), 2699-2711 (2006).

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (2008).

SADEGHIANI, N *et al.*, Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetic nanoparticle surface with polyaspartic acid. *Journal of Magnetic Materials*, v. 289, p – 466 – 468 (2005).

LACAVA, L.M. *et al.*, Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Journal of magnetism and magnetic materials* 252, 367-369 (2002).

LACAVA, L.M., *et al.*, Magnetic resonance and light microscopy investigation of a dextran coated magnetic fluid. *Journal of applied physics*, v.93 n. 10, 7563-7565, (2003).

LACAVA, L.M., *et al.*, Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. *Journal of magnetism and magnetic materials* 272 - 276, p. 2434 – 2435 (2004).

LEVITOV, A.; MAYO, P.H.; SLONIM, A.D. *Critical Care Ultrasonography*. McGraw-Hill Companies (2009).

LIMA et al.; Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes.

Scientia Plena, vol. 10, n. 03, 1-9 (2014).

MANSO, P.G, Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética. Arquivo Bras. De Oftalmologia 58(6), 495-498 (1995).

Universidade de São Paulo - Pro-reitoria de Pesquisa. Manual de Boas Práticas em Pesquisa da Universidade de São Paulo. (2017).

MEJÍAS, R. *et al.*, Long-term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications. Journal of controlled release 171, 225 – 233 (2013).

MELO, M. B.; VEADO, J. C. C.; SILVA, E. F.; MOREIRA, S. M.; PASSOS, L. M. F. Dopplerfluxometria das artérias renais: valores normais das velocidades sistólica e diastólica e do índice resistivo nas artérias renais principais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 58, n. 4, p. 691-693 (2006).

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe Scientia Plena, vol. 8 num. 4 (2012).

MONGE – FUENTES, V. *et al.*, Biodistribution and biocompatibility of DMSA – stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus* spp.). Nanomedicine 6 (9), 1529 – 1544 (2011).

MOREIRA, Vanessa Carvalho; Múltiplas injeções de nanopartículas magnéticas à base de maghemita recobertas com ácido meso- 2,3 – dimercaptosuccínico em camundongos: biocompatibilidade e toxicidade. 2012. 72f. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, Brasília (2012).

NAQVI, S., *et al.*: Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. Int J. Nanomed. 5, 983 – 989 (2009).

NYLAND GT, MATTOON J: Veterinary diagnostic ultrasonography. WB Saunders, Philadelphia (2001).

PARCA, Renata Miranda. Estudos morfológicos dos efeitos das nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com DMSA, em fígado de camundongo Swiss. 2006. 67f. Dissertação de mestrado em Biologia Animal. Universidade de Brasília, Brasília (2006).

SANTOS, M.H.B. dos; OLIVEIRA, M.A.L; LIMA, P.F. Diagnóstico de Gestaçã na Cabra e Ovelha. São Paulo, Livraria Varela (2004).

SEOANE, M. P. dos R., GARCIA, D. A. A., FROES, T. R. A história da ultrassonografia veterinária em pequenos animais. *Archives of Veterinary Science*, 16(1) v16i1.17646 (2011).

SOUZA, Aryane Toffanelo de. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa) 2011. 131f. Dissertação de mestrado em Biofísica Molecular. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), São Paulo (2011).

VILLIERS CL *et al.*, Analysis of the toxicity of gold nanoparticles on the immune system: Effect on dendritic cell functions. *J Nanoparticle Res.*; 12:55–60 (2010).

WATANABE, M; MORAIS, C.A. de; JUNIOR, A. de S. C. Considerações sobre a eficiência administrativa relacionado aos exames de ultra-sonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética nas afecções orbitárias. *Ver. Bras. De Oftalmologia* 66 (6): 376 – 82 (2007).

## **APÊNDICES**

## Apêndice A

**Tabela 1:** Valores hematológicos individuais (animal experimental C1) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9,4	10,3	9,6	8,7	6,6	6,6	5,5	6,1	4,4	4,9	3,2
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	11,8	7,3	7,8	8,4	8,0	8,0	9,2	8,2	8,4	8,1	10,9
<i>HGB</i> (g/dl)	24,7	14,6	15,5	17,1	15,7	15,8	18,0	16,3	17,0	16,2	21,8
<i>HCT</i> (%)	65,1	41,9	43,4	45,2	42,0	42,6	47,7	42,4	44,1	43,2	60,0
<i>VGM</i> (fl)	55,2	57,1	56,0	53,6	52,6	53,3	52,1	51,8	52,6	53,5	55,3
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	20,9	19,9	20,0	20,3	19,7	19,8	19,7	19,9	20,3	20,1	20,1
<i>CHCM</i> (g/dl)	37,9	34,8	35,7	37,8	37,4	37,1	37,7	38,4	38,5	37,5	36,3
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	469	845	433	454	323	832	742	811	785	352	437
<i>PL</i> (%)	73,0	75,4	78,6	70,6	73,2	73,3	71,7	70,7	66,7	67,0	57,8
<i>PM</i> (%)	27,0	24,6	21,4	29,4	26,8	26,7	28,3	29,3	33,3	33,0	42,2
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	6,9	7,8	7,5	6,1	4,8	4,8	3,9	4,3	2,9	3,3	1,8
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	2,5	2,5	2,1	2,6	1,8	1,8	1,6	1,8	1,5	1,6	1,4

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice B

**Tabela 2:** Valores hematológicos individuais (animal experimental C2) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	12,2	12,2	8,9	8,1	5,6	4,5	5,5	4,8	6,9	6,1	3,4
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	7,9	7,8	8,3	8,1	8,0	10,4	8,9	9,5	7,8	9,8	7,8
<i>HGB</i> (g/dl)	16,2	15,6	16,6	16,2	16,0	20,6	18,3	19,6	15,6	19,6	15,3
<i>HCT</i> (%)	43,6	43,2	43,5	43,0	43,0	55,3	47,6	51,6	42,7	52,5	41,4
<i>VGM</i> (fl)	54,9	55,2	52,5	53,1	53,5	53,0	53,4	54,1	54,7	53,5	53,4
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	20,4	19,9	20,0	20,0	19,9	19,8	20,5	20,5	20,0	20,0	19,7
<i>CHCM</i> (g/dl)	37,2	36,1	38,2	37,7	37,2	37,3	38,4	38,0	36,5	37,3	37,0
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	817	899	977	937	826	610	599	701	850	651	745
<i>PL</i> (%)	74,9	72,2	73,0	73,0	68,8	63,3	68,9	66,1	61,3	65,8	64,0
<i>PM</i> (%)	25,1	27,8	27,0	27,0	31,2	36,7	31,1	33,9	38,7	34,2	36,0
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9,1	8,8	6,5	5,9	3,9	2,8	3,8	3,2	4,2	4,0	2,2
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	3,1	3,4	2,4	2,2	1,7	1,7	1,7	1,6	2,7	2,1	1,2

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice C

**Tabela 3:** Valores hematológicos individuais (animal experimental C3) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	8,3	8,2	7,8	8,8	5,7	4,7	5,4	6,1	6,0	5,8	3,6
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu l$ )	11,8	7,9	8,0	8,1	7,4	8,5	9,1	7,9	8,8	10,8	10,2
<i>HGB</i> (g/dl)	24,3	15,9	15,6	16,0	14,7	16,1	17,3	15,0	17,4	20,8	20,0
<i>HCT</i> (%)	66,0	44,6	43,0	42,1	38,4	44,4	46,9	40,9	45,2	56,9	54,5
<i>VGM</i> (fl)	56,1	56,3	53,9	51,9	51,6	52,2	51,5	51,5	51,3	52,8	53,4
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	20,6	20,1	19,5	19,7	19,8	18,9	19,0	18,9	19,8	19,3	19,6
<i>CHCM</i> (g/dl)	36,8	35,7	36,3	38,0	38,3	36,3	36,9	36,7	38,5	36,6	36,7
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	356	788	913	778	768	184	383	1055	906	626	580
<i>PL</i> (%)	70,3	68,5	75,1	66,3	69,5	66,0	66,4	48,9	62,9	61,6	53,6
<i>PM</i> (%)	29,7	31,5	24,9	33,7	30,5	34,0	33,6	51,1	37,1	38,4	46,4
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	5,8	5,6	5,9	5,8	4,0	3,1	3,6	3,0	3,8	3,6	1,9
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	2,5	2,6	1,9	3,0	1,7	1,6	1,8	3,1	2,2	2,2	1,7

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice D

**Tabela 4:** Valores hematológicos individuais (animal experimental C4) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	6,2	10,0	10,7	8,1	4,8	4,0	3,6	8,6	5,0	5,8	3,3
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu l$ )	11,8	8,2	8,3	8,8	7,8	8,5	6,7	8,2	9,2	10,1	8,6
<i>HGB</i> (g/dl)	24,4	16,7	16,3	17,2	15,5	16,3	13,0	15,8	18,4	20,0	16,6
<i>HCT</i> (%)	66,5	45,8	44,7	46,6	40,6	44,5	34,7	42,6	48,5	53,8	46,4
<i>VGM</i> (fl)	56,5	56,2	54,2	53,2	51,9	52,4	51,7	52,2	52,6	53,4	54,1
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	20,7	20,5	19,8	19,6	19,8	19,2	19,4	19,4	20,0	19,8	19,4
<i>CHCM</i> (g/dl)	36,7	36,5	36,5	36,9	38,2	36,6	37,5	37,1	37,9	37,2	35,8
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	350	762	798	755	744	220	148	618	718	643	728
<i>PL</i> (%)	71,3	79,7	77,2	70,8	67,3	75,7	68,4	62,0	67,1	66,2	67,4
<i>PM</i> (%)	28,7	20,3	22,8	29,2	32,7	24,3	31,6	38	32,9	33,8	32,6
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	4,4	8,0	8,3	5,7	3,2	3,0	2,5	5,3	3,4	3,8	2,2
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	1,8	2,0	2,4	2,4	1,6	1,0	1,1	3,3	1,6	2,0	1,1

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice E

**Tabela 5:** Valores hematológicos individuais (animal experimental C5) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	7,5	12,7	7,7	8,0	5,7	3,3	5,4	4,9	5,2	5,3	2,4
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu l$ )	11,1	8,1	8,3	8,6	7,7	7,5	9,7	9,2	8,4	8,7	8,5
<i>HGB</i> (g/dl)	23,0	16,0	16,2	16,9	15,1	14,1	18,6	17,8	16,4	16,4	16,4
<i>HCT</i> (%)	62,5	45,4	44,8	46,0	39,9	39,7	50,3	47,9	43,8	45,6	45,2
<i>VGM</i> (fl)	56,6	56,1	54	53,6	52,0	52,9	51,9	52,2	52,1	52,5	53,4
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	20,8	19,8	19,5	19,7	19,7	18,8	19,2	19,4	19,5	18,9	19,4
<i>CHCM</i> (g/dl)	36,8	35,2	36,2	36,7	37,8	35,5	37,0	37,2	36,4	36,0	36,3
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	385	830	818	834	806	476	603	811	934	791	813
<i>PL</i> (%)	66,9	72,9	76,2	71,2	53,8	73,7	68,5	67,8	67,9	64,3	63,9
<i>PM</i> (%)	33,1	27,1	23,8	28,8	46,2	26,3	31,5	32,2	32,1	35,7	36,1
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	5,0	9,3	5,9	5,8	3,1	2,4	3,7	3,3	3,5	3,4	1,5
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	2,5	3,4	1,8	2,3	2,6	0,9	1,7	1,6	1,7	1,9	0,9

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice F

**Tabela 6:** Valores hematológicos individuais (animal experimental T 0,5 - 1) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	10,2	10,5	10,4	4,8	4,4	4,4	7,0	6,2	3,4	5,4	1,8
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	7,7	7,8	9,1	8,7	7,2	8,5	8,7	8,2	8,4	9,6	9,0
<i>HGB</i> (g/dl)	16,2	15,4	18,4	17,6	14,4	16,9	17,4	16,8	16,9	18,8	17,6
<i>HCT</i> (%)	43,9	43,3	49,3	47,9	39,2	45,6	47,4	44,5	46,4	51,5	49,3
<i>VGM</i> (fl)	57,2	55,5	54,0	55,0	54,7	53,8	54,5	54,1	55,2	53,8	55,1
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	21,1	19,7	20,2	20,2	20,1	20,0	20,0	20,4	20,1	19,6	19,7
<i>CHCM</i> (g/dl)	36,9	35,6	37,3	36,7	36,7	37,1	36,7	37,8	36,4	36,5	35,7
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	805	1167	796	765	41	897	459	905	87	776	455
<i>PL</i> (%)	79,5	76,7	72,6	70,4	71,0	67,1	68,8	70,1	69,5	61,8	62,4
<i>PM</i> (%)	20,5	23,3	27,4	29,6	29,0	32,9	31,4	29,9	30,5	38,2	37,6
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	8,1	8,1	7,6	3,4	3,1	3,0	4,8	4,3	2,4	3,3	1,1
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	2,1	2,4	2,8	1,4	1,3	1,4	2,2	1,9	1,0	2,1	0,7

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice G

**Tabela 7.** Tabela de valores hematológicos individuais (animal experimental T 0,5 - 2) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300*</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9,9	10,9	10,1	7,6	8,3	5,8	4,0	6,4	5,9	3,2	
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	10,2	8,7	8,1	8,5	8,4	7,9	10,8	8,2	7,3	8,9	
<i>HGB</i> (g/dl)	21,7	18,1	16,3	17,0	16,7	15,6	21,5	16,2	15,0	18,4	
<i>HCT</i> (%)	57,2	48,7	43,9	45,7	44,4	41,9	56,5	43,4	40,3	49,5	
<i>VGM</i> (fl)	56,1	56,0	54,5	53,8	53,1	53,3	52,5	53,1	55,4	55,9	
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	21,3	20,8	20,2	20,0	20,0	19,8	20,0	19,8	20,6	20,8	
<i>CHCM</i> (g/dl)	37,9	37,2	37,1	37,2	37,6	37,2	38,1	37,3	37,2	37,2	
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	252	651	822	464	920	905	629	992	1065	771	
<i>PL</i> (%)	65,9	67,5	71,8	70,9	62,3	70,2	58,7	63,0	56,2	50,8	
<i>PM</i> (%)	34,1	32,5	28,2	29,1	37,7	29,8	41,3	37,0	43,8	49,2	
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	6,5	7,4	7,3	5,4	5,2	4,1	2,3	4,0	3,3	1,6	
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	3,4	3,5	2,8	2,2	3,1	1,7	1,7	2,4	2,6	1,6	

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas. \* **Animal eutanasiado em D270.**

## Apêndice H

**Tabela 8:** Valores hematológicos individuais (animal experimental T 0,5 - 3) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB (x10<sup>3</sup>/μl)</i>	11,7	8,1	6,8	7,4	3,4	4,1	4,7	4,4	5,1	1,6	2,5
<i>TCV (x10<sup>6</sup>/μl)</i>	8,2	8,0	9,4	8,2	7,6	8,6	9,5	8,4	7,8	6,9	8,2
<i>HGB (g/dl)</i>	16,4	16,9	19,5	17,2	15,6	17,6	19,1	16,7	16,2	13,9	16,3
<i>HCT (%)</i>	45,2	45,6	51,9	44,8	42,3	46,3	51,7	44,8	43,6	38,0	44,7
<i>VGM (fl)</i>	55,3	56,9	55,2	54,7	55,3	54,0	54,2	53,7	54,5	55,5	54,4
<i>HGM (x10<sup>3</sup>/μl)</i>	20,0	21,1	20,7	21,0	20,4	20,5	20,0	20,0	20,2	20,3	19,9
<i>CHCM (g/dl)</i>	36,3	37,1	37,6	38,4	36,9	38,0	36,9	37,3	37,1	36,6	36,5
<i>PLT (x10<sup>3</sup>/μl)</i>	858	844	703	377	268	792	744	819	720	19	580
<i>PL (%)</i>	78,4	74,3	69,1	69,5	64,7	58,0	64,3	60,7	59,0	57,2	53,0
<i>PM (%)</i>	21,6	25,7	30,9	30,5	35,3	42	35,7	39,3	38,3	42,8	47
<i>VAL (x10<sup>3</sup>/μl)</i>	9,2	6,0	4,7	5,1	2,2	2,4	3,0	2,7	3,2	0,9	1,3
<i>VAM (x10<sup>3</sup>/μl)</i>	2,5	2,1	2,1	2,3	1,2	1,7	1,7	1,7	1,8	0,7	1,2

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice I

**Tabela 9:** Valores hematológicos individuais (animal experimental T 0,5 - 4) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	8,6	8,4	7,9	6,3	3,5	4,6	4,0	4,1	6,3	3,9	1,8
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu l$ )	6,3	8,3	7,8	7,6	7,6	7,4	7,5	5,3	7,6	8,8	7,7
<i>HGB</i> (g/dl)	14,2	17,6	16,0	15,8	15,9	15,2	15,2	11,1	15,6	18,2	16,0
<i>HCT</i> (%)	36,8	47,9	43,4	42,3	42,0	40,8	41,0	28,6	41,5	48,9	43,1
<i>VGM</i> (fl)	58,7	57,8	55,8	55,6	55,4	55,4	54,7	53,7	54,4	55,6	56,1
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	22,6	21,2	20,6	20,8	21,0	20,7	20,3	20,8	20,4	20,7	20,8
<i>CHCM</i> (g/dl)	38,6	36,7	36,9	37,4	37,9	37,3	37,1	38,8	37,6	37,2	37,1
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	73	699	211	458	780	738	123	116	800	637	646
<i>PL</i> (%)	74,4	76,3	75,1	71,8	61,0	64,6	69,6	76,7	76,4	66,3	55,2
<i>PM</i> (%)	25,6	23,7	24,9	28,2	39,0	35,4	30,4	23,3	23,6	33,7	44,8
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	6,4	6,4	5,9	4,5	2,1	3,0	2,8	3,1	4,8	2,6	1,0
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	2,2	2,0	2,0	1,8	1,4	1,6	1,2	1,0	1,5	1,3	0,8

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice J

**Tabela 10:** Valores hematológicos individuais (animal experimental T 0,5 - 5) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	9,0	13,5	11,1	9,4	6,5	7,0	5,0	6,1	6,1	6,9	3,9
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu l$ )	9,2	8,5	8,2	8,0	7,9	8,0	7,8	8,0	8,4	8,9	9,3
<i>HGB</i> (g/dl)	19,4	17,8	16,6	16,1	15,9	16,2	15,3	15,9	16,8	18,0	18,6
<i>HCT</i> (%)	51,0	49,0	44,9	42,7	42,3	42,7	41,0	43,1	43,6	47,8	51,4
<i>VGM</i> (fl)	55,7	58,0	54,5	53,6	53,5	53,7	52,6	53,7	52,2	53,6	55,6
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	21,2	21,1	20,1	20,2	20,1	20,4	19,6	19,8	20,1	20,2	20,1
<i>CHCM</i> (g/dl)	38,0	36,3	37,0	37,7	37,6	37,9	37,3	36,9	38,5	37,7	36,2
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	652	675	658	461	745	723	151	276	778	261	636
<i>PL</i> (%)	68,0	73,6	74,7	69,3	70,1	68,6	68,6	69,2	69,7	65,2	66,7
<i>PM</i> (%)	32,0	26,4	25,3	30,7	29,9	31,4	31,4	30,8	30,3	34,8	33,3
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	6,1	9,9	8,3	6,5	4,6	4,8	3,4	4,2	4,3	4,5	2,6
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	2,9	3,6	2,8	2,9	1,9	2,2	1,6	1,9	1,8	2,4	1,3

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice K

**Tabela 11:** Valores hematológicos individuais (animal experimental T 5 - 1) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	7,3	5,2	5,1	2,3	4,5	2,3	3,1	3,5	2,9	3,3	1,8
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu l$ )	9,4	7,6	7,9	4,6	7,9	7,0	8,5	9,2	8,4	7,4	7,9
<i>HGB</i> (g/dl)	19,8	15,9	16,3	9,0	15,9	13,9	17,1	18,8	17,3	15,1	16,3
<i>HCT</i> (%)	51,9	44,4	44,5	25,4	43,2	38,4	45,8	49,7	45,0	40,2	45,1
<i>VGM</i> (fl)	55,3	58,7	56,3	55,1	54,7	54,7	54,0	54,0	53,8	54,4	57,0
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	21,1	21,0	20,6	19,5	20,1	19,8	20,2	20,4	20,7	20,4	20,6
<i>CHCM</i> (g/dl)	38,2	35,8	36,6	35,4	36,8	36,2	37,3	37,8	38,4	37,6	36,1
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	702	130	849	128	884	204	877	713	887	289	672
<i>PL</i> (%)	53,2	90,8	59,8	65,2	61,6	64,7	56,9	56,6	56,8	55,0	61,2
<i>PM</i> (%)	46,8	9,2	40,2	34,8	38,4	35,3	43,1	43,4	43,2	45	38,8
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	3,9	4,7	3,2	1,5	2,8	1,5	1,8	2	1,6	1,8	1,1
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	3,4	0,5	2,2	0,8	1,7	0,8	1,3	1,5	1,3	1,5	0,7

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice L

**Tabela 12:** Valores hematológicos individuais (animal experimental T 5 - 2) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	8,2	11,8	8,1	7,8	7,5	5,4	5,8	6,1	7,6	5,9	4,1
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu l$ )	9,3	9,5	8,0	8,3	8,1	8,2	7,8	8,2	7,8	8,3	7,8
<i>HGB</i> (g/dl)	20,4	20,3	16,2	16,7	16,4	16,6	15,7	16,6	15,9	16,6	15,9
<i>HCT</i> (%)	53,1	55,1	45,1	44,9	44,1	44,4	41,6	44,2	41,8	45,1	43,8
<i>VGM</i> (fl)	57,1	57,8	56,1	54,2	54,6	54,3	53,7	53,8	53,8	54,6	56,3
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	21,9	21,3	20,1	20,2	20,3	20,3	20,3	20,2	20,5	20,1	20,4
<i>CHCM</i> (g/dl)	38,4	36,8	35,9	37,2	37,2	37,4	37,7	37,6	38,0	36,8	36,3
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	636	733	846	903	882	928	426	916	666	856	776
<i>PL</i> (%)	69,8	71,3	76,5	71,6	74,8	66,3	66,4	56,5	64,4	68,0	68,7
<i>PM</i> (%)	30,2	28,7	23,5	28,4	25,2	33,7	33,6	43,5	35,6	32,0	31,1
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	5,7	8,4	6,2	5,6	5,6	3,6	3,9	3,4	4,9	4,0	2,8
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	2,5	3,4	1,9	2,2	1,9	1,8	1,9	2,7	2,7	1,9	1,3

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice M

**Tabela 13:** Valores hematológicos individuais (animal experimental T 5 - 3) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	8,6	15,5	4,8	8,3	5,3	4,3	3,9	3,7	4,0	4,2	2,9
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu l$ )	8,0	8,4	8,2	8,2	8,0	8,2	8,3	9,7	8,5	7,8	8,7
<i>HGB</i> (g/dl)	17,5	17,2	16,7	17,0	16,1	16,7	16,9	20,0	17,9	16,5	17,4
<i>HCT</i> (%)	46,0	47,3	46,1	45,9	43,4	45,3	45,3	53,4	46,7	44,1	47,1
<i>VGM</i> (fl)	57,4	56,4	56,4	55,8	54,5	55,5	54,8	55,1	55,2	56,4	54,5
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	21,8	20,5	20,4	20,7	20,2	20,5	20,5	20,6	21,2	21,1	20,1
<i>CHCM</i> (g/dl)	38,0	36,4	36,2	37,0	37,1	36,9	37,3	37,5	38,3	37,4	36,9
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	680	871	76	668	94	346	869	693	942	463	337
<i>PL</i> (%)	71,5	66,1	66,7	65,6	63,2	54,7	69,7	57,5	63,1	62,6	51,3
<i>PM</i> (%)	28,5	33,9	33,3	34,4	36,8	45,3	30,3	42,5	36,9	37,4	48,7
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	6,1	10,0	3,2	5,4	3,3	2,4	2,7	2,1	2,5	2,6	1,5
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	2,5	5,3	1,6	2,9	2,0	1,9	1,2	1,6	1,5	1,6	1,4

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice N

**Tabela 14:** Valores hematológicos individuais (animal experimental T 5 - 4) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	8,7	13,4	9,0	8,7	4,8	5,6	2,9	4,3	4,9	3,5	2,4
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu l$ )	9,4	8,4	8,5	8,6	8,2	8,2	8,8	8,7	8,3	7,3	8,6
<i>HGB</i> (g/dl)	19,5	17,6	16,9	17,4	16,1	16,3	17,3	17,0	16,5	14,5	16,8
<i>HCT</i> (%)	52,2	47,6	47,0	46,3	44,2	44,5	46,6	46,2	43,8	39,1	47,1
<i>VGM</i> (fl)	55,8	56,4	55,1	54,0	54,2	54,4	52,8	53,3	52,9	53,3	54,8
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	20,8	20,9	19,8	20,3	19,8	19,9	19,6	19,6	19,9	19,8	19,5
<i>CHCM</i> (g/dl)	37,4	37,0	36,0	37,6	36,4	36,6	37,1	36,8	37,7	37,1	35,7
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	298	746	808	854	761	240	731	835	787	200	795
<i>PL</i> (%)	71,2	59,1	69,8	66,0	64,3	50,5	67,4	59,0	69,1	64,6	61,7
<i>PM</i> (%)	28,8	40,9	30,2	34,0	35,7	49,5	32,6	41,0	30,9	35,4	38,3
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	6,2	8,0	6,3	5,7	3,1	2,8	2,0	2,5	3,4	2,3	1,5
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	2,5	5,5	2,7	3,0	1,7	2,8	0,9	1,8	1,5	1,2	0,9

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice O

**Tabela 15:** Valores hematológicos individuais (animal experimental T 5 - 5) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D 15</b>	<b>D 30</b>	<b>D 60</b>	<b>D 90</b>	<b>D 120</b>	<b>D 150</b>	<b>D 180</b>	<b>D 210</b>	<b>D 240</b>	<b>D 270</b>	<b>D 300</b>
<i>TCB</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	6,8	6,8	4,7	4,9	4,5	3,1	2,9	4,1	3,3	3,9	2,5
<i>TCV</i> ( $\times 10^6/\mu l$ )	6,8	10,6	8,5	8,1	9,6	8,1	8,3	8,4	7,0	8,5	9,0
<i>HGB</i> (g/dl)	14,2	21,5	16,8	16,0	18,5	16,0	16,2	16,6	13,8	16,5	17,9
<i>HCT</i> (%)	38,4	58,8	46,1	43,3	51,1	42,5	43,3	44,8	36,4	45,1	49,5
<i>VGM</i> (fl)	56,7	55,5	54,4	53,7	53,3	52,5	52,2	53,5	52,2	52,9	54,8
<i>HGM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	21,0	20,3	19,8	19,9	19,3	19,8	19,5	19,8	19,8	19,3	19,8
<i>CHCM</i> (g/dl)	37,0	36,6	36,4	37,0	36,2	37,6	37,4	37,1	37,9	36,6	36,2
<i>PLT</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	341	562	544	210	655	804	27	581	229	892	756
<i>PL</i> (%)	59,6	70,1	67,6	68,5	56,3	59,2	60,9	66,3	58,6	48,5	51,7
<i>PM</i> (%)	40,4	29,9	32,4	31,5	43,7	40,8	39,1	33,7	41,4	51,5	48,3
<i>VAL</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	4,1	4,8	3,2	3,4	2,5	1,8	1,8	2,7	1,9	1,9	1,3
<i>VAM</i> ( $\times 10^3/\mu l$ )	2,7	2,0	1,5	1,5	2,0	1,3	1,1	1,4	1,4	2,0	1,2

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. TCB: número total de células brancas, TCV: número total de células vermelhas, HCT: hematócrito, HGB: hemoglobina, VGM: volume globular médio, HGM: hemoglobina globular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PTL: plaquetas.

## Apêndice P

**Tabela 16:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental C1) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,62	1,44	2,12	0,93	0,54	1,50	0,52	0,77	0,80	0,62	0,01
<i>UREIA (mg/dL)</i>	86	103	73	83	60	21	48	44	46	40	42
<i>ALT (U/L)</i>	82	117	79	96	19	50	14	18	18	35	37
<i>AST (U/L)</i>	194	379	201	235	130	85	62	198	133	145	162
<i>FERRO (µg/dL)</i>	331	406	191	294	434	242	274	292	250	288	198

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice Q

**Tabela 17:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental C2) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,67	0,76	1,02	0,88	0,66	0,50	0,50	0,56	0,71	0,84	0,75
<i>UREIA (mg/dL)</i>	69	98	89	74	39	58	50	50	42	42	23
<i>ALT (U/L)</i>	53	68	173	35	24	21	71	29	29	29	56
<i>AST (U/L)</i>	222	205	364	166	192	84	230	168	138	112	232
<i>FERRO (µg/dL)</i>	-	410	311	249	290	274	254	261	375	382	478

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice R

**Tabela 18:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental C3) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,62	0,77	0,79	0,79	0,54	0,61	0,48	0,71	0,65	0,97	0,13
<i>UREIA (mg/dL)</i>	94	91	80	77	57	40	47	38	42	33	40
<i>ALT (U/L)</i>	126	96	46	93	61	60	64	33	56	55	10
<i>AST (U/L)</i>	323	350	153	257	232	393	173	173	166	195	118
<i>FERRO (µg/dL)</i>	358	420	300	270	229	41	306	320	267	399	336

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice S

**Anexo 19.** Tabela de valores bioquímicos individuais (animal experimental C4) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,70	0,77	0,86	0,83	0,42	0,57	0,57	0,85	0,75	1,10	0,14
<i>UREIA (mg/dL)</i>	88	98	89	89	57	38	63	49	48	40	50
<i>ALT (U/L)</i>	86	78	61	97	48	41	70	45	89	48	40
<i>AST (U/L)</i>	288	173	179	272	133	98	190	217	210	92	221
<i>FERRO (<math>\mu</math>g/dL)</i>	283	420	362	331	222	280	191	250	288	434	329

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice T

**Tabela 20:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental C5) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,63	0,78	0,77	0,86	0,40	0,50	0,61	0,78	0,65	0,57	0,37
<i>UREIA (mg/dL)</i>	74	100	73	77	69	36	50	47	46	44	44
<i>ALT (U/L)</i>	77	106	66	125	80	52	47	56	63	89	71
<i>AST (U/L)</i>	170	269	270	255	243	112	136	112	127	185	228
<i>FERRO (µg/dL)</i>	328	-	379	403	140	218	288	354	254	354	142

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice U

**Tabela 21:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental T0,5 - 1) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,63	0,67	0,78	0,36	0,00	0,49	0,61	0,56	0,81	0,71	0,50
<i>UREIA (mg/dL)</i>	66	61	86	61	41	54	54	49	50	39	28
<i>ALT (U/L)</i>	65	51	84	82	60	61	63	95	55	56	64
<i>AST (U/L)</i>	142	136	143	105	106	136	128	240	123	182	209
<i>FERRO (µg/dL)</i>	389	509	335	273	236	252	295	274	295	338	474

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice V

**Tabela 22:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental T0,5 - 2) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300 *</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,64	0,80	0,77	0,77	0,40	0,59	0,62	0,74	0,73	0,77	
<i>UREIA (mg/dL)</i>	67	87	83	85	70	41	61	53	55	38	
<i>ALT (U/L)</i>	78	125	75	113	136	56	69	58	70	95	
<i>AST (U/L)</i>	124	173	155	227	445	109	136	174	166	165	
<i>FERRO (µg/dL)</i>	352	-	335	304	273	290	223	306	163	181	

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase. \* **Animal eutanasiado no D270.**

## Apêndice W

**Tabela 23:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental T0,5 - 3) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,73	0,79	0,84	0,52	0,56	0,62	0,80	0,65	0,96	0,72	0,43
<i>UREIA (mg/dL)</i>	79	84	75	53	36	51	53	48	39	39	39
<i>ALT (U/L)</i>	68	58	71	58	51	48	64	63	43	43	46
<i>AST (U/L)</i>	139	173	132	124	199	156	157	178	122	122	133
<i>FERRO (µg/dL)</i>	348	-	352	307	253	256	333	309	267	342	370

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice X

**Tabela 24:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental T0,5 - 4) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,75	0,72	0,89	0,92	0,50	0,65	0,61	0,99	1,04	0,90	0,37
<i>UREIA (mg/dL)</i>	75	83	80	84	57	39	57	55	59	45	57
<i>ALT (U/L)</i>	72	52	66	136	55	52	44	63	62	57	65
<i>AST (U/L)</i>	149	372	251	128	134	91	226	304	282	113	260
<i>FERRO (µg/dL)</i>	317	-	396	335	253	239	270	316	226	667	235

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice Y

**Tabela 25:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental T0,5 - 5) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,70	0,47	0,78	0,87	0,43	0,69	0,61	0,78	0,53	0,94	0,58
<i>UREIA (mg/dL)</i>	83	15	78	85	57	45	63	48	61	44	44
<i>ALT (U/L)</i>	90	87	48	59	52	40	53	58	71	57	35
<i>AST (U/L)</i>	174	336	51	131	122	75	174	47	374	156	203
<i>FERRO (µg/dL)</i>	396	130	317	372	167	348	281	337	250	358	295

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice Z

**Tabela 26:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental T5 - 1) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,59	0,93	0,76	0,77	0,52	0,82	0,56	0,73	0,68	0,81	0,06
<i>UREIA (mg/dL)</i>	63	85	74	86	69	-	49	50	46	38	64
<i>ALT (U/L)</i>	73	58	58	108	85	63	51	73	80	42	129
<i>AST (U/L)</i>	141	153	137	266	251	167	164	149	201	94	218
<i>FERRO (µg/dL)</i>	570	357	294	292	259	242	310	274	327	417	243

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice AA

**Tabela 27:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental T5 - 2) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,61	0,82	0,81	0,83	0,56	0,00	0,65	0,73	0,87	0,94	0,85
<i>UREIA (mg/dL)</i>	66	100	75	77	78	36	53	43	44	54	43
<i>ALT (U/L)</i>	62	71	53	78	68	43	61	42	53	60	55
<i>AST (U/L)</i>	119	178	167	173	151	78	167	97	125	156	226
<i>FERRO (µg/dL)</i>	492	349	374	304	266	331	295	302	399	302	220

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice AB

**Tabela 28:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental T5 - 3) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,78	0,79	0,89	1,17	0,58	0,50	0,66	1,03	0,86	0,71	0,89
<i>UREIA (mg/dL)</i>	85	111	81	88	70	56	60	56	44	47	41
<i>ALT (U/L)</i>	65	91	86	83	56	35	51	40	53	98	42
<i>AST (U/L)</i>	178	278	378	236	271	115	266	100	111	249	221
<i>FERRO (µg/dL)</i>	376	-	328	365	239	246	212	254	465	299	309

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice AC

**Tabela 29:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental T5 - 4) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,71	0,66	0,81	0,85	0,52	0,00	0,54	0,58	0,71	1,03	0,36
<i>UREIA (mg/dL)</i>	76	107	84	90	65	68	51	51	45	46	46
<i>ALT (U/L)</i>	107	26	64	105	69	53	66	50	71	61	39
<i>AST (U/L)</i>	109	340	145	197	119	116	167	85	101	151	136
<i>FERRO (µg/dL)</i>	-	430	386	331	270	201	256	316	309	507	542

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

## Apêndice AD

**Tabela 30:** Valores bioquímicos individuais (animal experimental T5 - 5) obtidos ao longo do experimento.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>D15</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>	<b>D150</b>	<b>D180</b>	<b>D210</b>	<b>D240</b>	<b>D270</b>	<b>D300</b>
<i>CREATININA (mg/dL)</i>	0,71	0,79	0,81	0,74	0,46	0,68	0,58	0,79	0,69	0,96	0,40
<i>UREIA (mg/dL)</i>	92	93	85	78	73	51	56	52	59	47	52
<i>ALT (U/L)</i>	76	91	70	68	58	20	49	53	45	54	46
<i>AST (U/L)</i>	167	271	-	162	195	212	116	174	111	109	126
<i>FERRO (µg/dL)</i>	298	376	-	352	239	280	284	347	243	358	205

Células hachuradas em azul indicam tratar-se de valores menores que o padrão mínimo e em vermelho, maiores que o padrão máximo. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.