

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS – GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

LUZIRLANE DOS SANTOS BARBOSA

**ESTUDO DOS PROCESSOS DE MAGNETOHIPERTERMIA E TERAPIA
FOTODINÂMICA MEDIADOS POR MAGNETOLIPOSSOMAS
FOTOSENSIBILIZADOS EM CAMUNDONGOS**

Brasília – DF
2008

LUZIRLANE DOS SANTOS BARBOSA

**ESTUDO DOS PROCESSOS DE MAGNETOHIPERTERMIA E TERAPIA
FOTODINÂMICA MEDIADOS POR MAGNETOLIPOSSOMAS
FOTOSENSIBILIZADOS EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito ao Doutorado em Patologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Brasília – DF

2008

LUZIRLANE DOS SANTOS BARBOSA

**ESTUDO DOS PROCESSOS DE MAGNETOHIPERTERMIA E TERAPIA
FOTODINÂMICA MEDIADOS POR MAGNETOLIPOSSOMAS FURTIVOS EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito ao Doutorado em Patologia Molecular.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr.
Universidade

Prof. Dr.
Universidade

Prof. Dr.
Universidade

Prof. Dr.
Universidade

Brasília, _____ de _____ de 2008.

À *Deus*, pelo dom da vida e pelas grandes conquistas. Obrigada, Pai!

Aos meus pais, **Lourenço** e **Maria da Luz**, pelo amor incondicional.

Ao meu esposo, **Sacha Braun**, pelo amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Zulmira Guerrero Marques Lacava**, pela sua receptividade, acolhida, convívio, amizade e confiança. Obrigada Zu, pela oportunidade de trabalho.

Aos Profs. Dr. **Antônio Cláudio Tedesco** e Dra. **Emília Celma de Oliveira Lima**, por cederem gentilmente as amostras testadas.

Aos Profs. Dr. **Paulo César de Moraes** e Dr. **Ricardo Bentes de Azevedo**, pelo apoio e amizade.

Ao esposo, **Sacha Braun Chaves**, pelo seu empenho e dedicação na conclusão desse trabalho e, principalmente, por participar de mais uma importante etapa da minha vida. Você é um presente de Deus.

Aos professores do Laboratório de Genética, Dra. **Silviene**, Dr. **César** e Dra **Nazaré**, pelo incentivo, convívio e amizade.

Aos meus queridos colegas do grupo da ZU: **Neda, Flávia, Adriana, Danielle, Júlia, Luciana, Camila e Mirian**, pela apoio constante, convívio e valiosa amizade.

Aos colegas do Laboratório de Genética: **Arthur, Cassinha, Penha, Ana Elizabeth, Ana Luísa, Mila, Carol e Eduardo**, pelo carinho e amizade.

À **Elisa**, sempre tão amiga e prestativa, muitíssimo obrigada. Espero continuar contando com você.

Ao **Ornil e Djalma**, pela colaboração e amizade. **Ornil**, meu conterrâneo, obrigada pela mão sempre estendida.

Aos meus irmãos, **Ana Luzia, Cíntia, Luzslaid e Lístenes**, por me amarem tanto e sempre torcerem por mim. Aos meus fofinhos e queridos sobrinhos, **Karlinha, Igor, Abgael, Caio, Arthur, Luan e Chiara**, que mesmo distantes são a minha força revigorante. Amo todos vocês.

Aos demais e não menos queridos familiares que sempre torceram pelo meu sucesso. Obrigada pela constante alegria oferecida em cada encontro.

Aos amigos que mesmo distantes comemoram comigo cada conquista. Vocês sempre estão presentes em minha vida.

Ao MCT/CNPq, CAPES, FINATEC, FAP-DF, Rede de Nanobiomagnetismo e CNANO/IB/UnB, pelo auxílio para a realização desta pesquisa.

E a todos que, de uma forma ou de outra, participaram para que este projeto fosse realizado.

Tem ânimo, e sê forte; não tenhas medo nem temor, porque o Senhor teu Deus está contigo em qualquer parte para onde vás.

Jos 1,9

RESUMO

A Magnetohipertermia (MHT) e a Terapia Fotodinâmica (TFD) são terapias promissoras para o tratamento do câncer pelas possibilidades de redução de efeitos colaterais em relação às terapias convencionais. Ambas podem ser abordadas de forma especial pela Nanotecnologia por meio da produção de materiais nanoestruturados. Dentre estes estão as nanopartículas magnéticas (NPM) que podem ser encapsuladas em lipossomas (L), constituindo os magnetolipossomas (ML). O comportamento magnético das NPM confere interesse especial na utilização do ML no diagnóstico e tratamento do câncer por MHT. Os ML podem conter agentes fotossensibilizantes e assim serem utilizados também na TFD. Buscando conhecer os efeitos biológicos e terapêuticos relacionados à utilização conjunta dessas duas técnicas no tratamento de neoplasias, foi desenvolvido um novo material que se baseia em lipossomas furtivos contendo o fotossensibilizador zinco-ftalocianina (ZnF) e NPM de ferrita de cobalto recobertas com ácido cítrico, o ML_{PEG-ZnF} ($4,8 \times 10^{14}$ partículas/ mL). O trabalho foi desenvolvido em seis etapas. Na primeira foi determinado que o tempo de exposição ao campo magnético (AC, 1 MHz, 40 Oe) em animais tratados com FeCoML (amostra similar ao ML_{PEG-ZnF}, mas sem o ZnF) deve ser de 3 minutos. Nas etapas 2 a 5 foi feita avaliação da biocompatibilidade de ML_{PEG-ZnF} e seus sub-componentes (L_{PEG}, ML_{PEG}, L_{PEG-ZnF}), em animais saudáveis, submetidos ou não ao campo magnético AC (MHT) e/ou laser (TFD). De maneira geral, os testes mostraram atividade inflamatória não severa e temporária (citometria do sangue e do peritônio) aumentada pelo campo magnético, pequena redução da viabilidade celular, ausência total de genotoxicidade (testes do micronúcleo) e processos inflamatórios sobretudo nos pulmões (morfologia do fígado, pulmões e baço). E a sexta etapa visou verificar a possível remissão tumoral em animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) que receberam injeção da amostra ML_{PEG-ZnF} e foram em seguida submetidos ao campo magnético ou ao laser. Foi constatado (testes AgNOR, viabilidade celular, volume e padrão hemorrágico do ascite, citometria, células claras/escuras, peso e sobrevida do animal) que, nas condições experimentais usadas, nenhum dos tratamentos causou remissão total do tumor, mas pode ser observada significativa atividade antiproliferativa, sobretudo quando após o tratamento com ML_{PEG-ZnF}, os animais eram submetidos ao laser, evidenciando mais vantagens do sistema para realização da TFD do que para a MHT. Os resultados sugerem que com ajustes na amostra ou nas condições experimentais, o tratamento mediado por MHT e TFD é viável e poderá resultar em vantagens muito importantes na terapia do câncer.

Palavras-chave: Nanobiotecnologia, Magnetohipertermia, Terapia Fotodinâmica, Magnetolipossoma, Ferrita de Cobalto, Zinco-Ftalocianina, Biocompatibilidade, Remissão tumoral, Tumor Ascítico de Ehrlich.

ABSTRACT

Magnetohyperthermia (MHT) and Photodynamic therapy (TFD) are promising therapies for the cancer treatment due to the possibilities of collateral effects reduction when compared to the conventional therapies. Both therapies may be focused in a special way using the nanostructured materials produced by the nanobiotechnology. Among these materials are the magnetic nanoparticles (NPM). NPM may be encapsulated in liposomes (L) to constitute the magnetoliposomes (ML). The NPM magnetic behavior gives special importance in the ML use for cancer diagnostic and MHT treatment. ML may contain photosensitizers to be used in TFD process. With the aim to better understand the biological and therapeutic effects related to the simultaneous use of both therapies in the treatment of tumors, was developed a new material based in furtive liposomes containing the photosensitizer zinc-phtalocianine (ZnF) and citrate coated cobalt-ferrite NPM, the ML_{PEG}-ZnF ($4,8 \times 10^{14}$ particle/mL). This work was performed in 6 steps. In the first one, it was determined that the time of exposure to the magnetic field (AC, 1 MHz, 40 Oe) in animals with FeCoML (a sample similar to the ML_{PEG}-ZnF, but without ZnF) has to be 3 minutes. In the steps 2 to 5 was done an evaluation of the ML_{PEG}-ZnF sample and its sub-components (L_{PEG}, ML_{PEG}, L_{PEG}-ZnF) biocompatibility in healthy animals submitted or not to the AC magnetic field (MHT) and/or to the laser (TFD). As a rule, tests showed not severe and temporary inflammatory activity (blood and peritoneum cytometry) that was increased by the AC magnetic field, small reduction of cellular viability, absence of genotoxicity (micronucleus test) and inflammatory process in the lungs (morphology analysis of the liver, lungs and spleen). The sixth step had the aim of verifying the possible tumor remission in Erlich Ascitic Tumor (TAE) portable animals after injection of ML_{PEG}-ZnF and subsequent AC field and/or laser submission. It was observed (by AgNOR tests, cellular viability, ascite volume and hemorrhagic pattern, cytometry, clear/dark cells, animal weight and survival) that in the used experimental conditions, no treatment caused the tumor total remission. Nevertheless, it was observed a significant antiproliferative activity, mainly after the ML_{PEG}-ZnF treatment and subsequent laser exposure, evidencing that this system is more adequate to the TFD performance than to the MHT process. The results suggest that after the sample or experimental conditions adjustments, the treatment mediated through MHT and TFD is viable and vantageous to the cancer treatment.

Key words: Nanobiotechnology, Magnetohyperthermia, Photodynamic therapy, Magnetoliposome, Cobalt ferrite, Zinc-Phtalocyanine, Biocompatibility, Tumoral remission, Ehrlich Ascitic Tumor.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Efeitos de diferentes tempos de exposição ao CMCA na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos tratados com FeCoML. As células foram coletadas 24 horas após o tratamento com o campo magnético.....71
- Tabela 2:** Efeitos de amostras magnéticas e /ou fotossensibilizadas na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos.....78
- Tabela 3:** Efeitos da exposição ao CMCA na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos tratados com amostras magnéticas e /ou fotossensibilizadas.....87
- Tabela 4:** Efeitos da exposição ao laser (670 nm) na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos tratados com amostras magnéticas e /ou fotossensibilizadas.....95
- Tabela 5:** Efeitos da exposição ao campo magnético e ao laser (670 nm) na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos tratados com **ML_{PEG-}ZnF**.....103
- Tabela 6** Média dos pontos AgNOR em núcleos de células do tumor ascítico de Ehrlich.....106
- Tabela 7:** Porcentagem de aumento do tempo de sobrevivência (% ILS) de camundongos com tumor de Ehrlich ascítico, tratados com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas, submetidos ou não ao campo magnético e/ou laser.....118

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura de lipossoma unilamelar (FORMARIZ et al., 2004).....28
- Figura 2:** Nanopartículas magnéticas: **a)** Fe₃O₄/PAH (TARTAJ, 2003); **b)** Nanoprism Technologies Inc.....31
- Figura 3:** Representação de magnetolipossoma (FAHMY et al., 2007).....33
- Figura 4:** Diagrama de Jablonski modificado. (A) absorção de um fóton, (S₀) estado fundamental, (S_n) estado excitado singlete, (S₁) primeiro estado excitado singlete, (RV) relaxamento vibracional, (CI) cruzamento interno, (CIS) cruzamento intersistemas, (T_n) estado excitado tripleto.42
- Figura 05:** Representação esquemática de um magnetolipossoma furtivo, com o núcleo (região preta) constituído de uma nanopartícula magnética (NPM) encapsulada pela bicamada fosfolipídica.....45
- Figura 06:** Aparelho gerador de campo eletromagnético alternado (PI 0204433-1).....47
- Figura 07:** Aparelho emissor de laser (670 nm)..... 47
- Figura 8:** Micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromático (ENC)..... 58
- Figura 9:** Amostras citológicas de epitélio cervical uterino corado pela prata. O número de pontos AgNOR corados em marrom café em número crescente conforme a gravidade da lesão (FILIPPIN et al., 2006).61

Figura 10: Esfregaços de células do líquido ascítico do tumor de Ehrlich em camundongos fêmeas: a) células coradas com kit panótico (LEITE et al., 2006) e b) células coradas com Giemsa.....63

Figura 11: Graus de hemorragia. (FUKUMASU, 2007).....64

Figura 12: Efeitos do CMCA sobre a freqüência de leucócitos no sangue de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de FeCoML. (A) Células obtidas 30 minutos e (B) 24 horas após a exposição ao CMCA. ♦ = Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).....69

Figura 13: Efeitos do CMCA sobre a freqüência de leucócitos no peritônio de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de FeCoML. (A) Células obtidas 30 minutos e (B) 24 horas após a exposição ao CMCA. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....70

Figura 14: Efeitos de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas sobre a freqüência de leucócitos no sangue de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a administração IP de cada amostra. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....75

Figura 15: Efeitos de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas sobre a freqüência de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a administração IP de cada amostra. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....76

Figura 16: Efeitos de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas sobre a frequência de células vivas e mortas no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a administração IP de cada amostra. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....77

Figura 17: Camundongos tratados com as amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão (A e B), fígado (C e D) e baço (E e F). Em A, pulmão de animal controle (2 dias) comparado ao grupo tratado (2 dias). Note em B extenso processo inflamatório (I) na parede de vasos sanguíneos (vs) ou bronquíolos (b), sempre associados à presença de partículas (setas). Em D, presença de partículas em células de Kupffer nos sinusóides de fígado de animal tratado (2 dias). O grupo controle não apresentou marcação (C). Em F, baço de animal tratado (2 dias) exibindo partículas na polpa vermelha (pv) do baço. Coloração pelo método de Perls.....79

Figura 18: Efeitos do CMCA sobre a frequência de leucócitos no sangue de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao CMCA. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....84

Figura 19: Efeitos do CMCA sobre a frequência de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao CMCA. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....85

Figura 20: Efeitos do CMCA sobre a frequência de células vivas e mortas no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao CMCA. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....86

Figura 21: Camundongos tratados com as amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas exposto ao campo magnético. Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão (A e B), fígado (C e D) e baço (E e F). Em A, pulmão de animal controle (2 dias) comparado ao grupo $L_{PEG-ZnF}$ (7 dias). Note em B extenso infiltrado inflamatório (I) na parede de vasos sanguíneos (vs) ou bronquíolos (b), sempre associados à presença de partículas (setas). O grupo controle não apresentou marcação (C). Em F, baço de animal.....88

Figura 22: Efeitos do laser sobre a frequência de leucócitos no sangue de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao laser (670 nm). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....92

Figura 23: Efeitos do laser sobre a frequência de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao laser (670 nm). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....93

Figura 24: Efeitos de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas sobre a frequência de células vivas e mortas no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B)

6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a administração IP de cada amostra. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....94

Figura 25: Camundongos tratados com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas expostos ao laser. Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão (A), fígado (B) e baço (C). Em A, pulmão de animal tratado com $L_{PEG-ZnF}$ (7 dias), com a parede de vasos sanguíneos (vs) e bronquíolos (b) sem infiltrados inflamatórios. Em B ($L_{PEG-ZnF}$, 7 dias), parênquima hepático demonstrando ausência de infiltrado inflamatório. Em C, baço de animal tratado com $L_{PEG-ZnF}$ (7 dias), sem apresentar alterações na polpa branca (pb) e vermelha (pv). Coloração por H&E em A e pelo método de Pells em B e C.

Figura 26: Efeitos do CMCA e laser (670 nm) sobre a frequência de leucócitos no sangue de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de $ML_{PEG-ZnF}$. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao CMCA e ao laser (670 nm). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....100

Figura 27: Efeitos do CMCA e laser (670 nm) sobre a frequência de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de $ML_{PEG-ZnF}$. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao CMCA e ao laser (670 nm). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....101

Figura 28: Efeitos do CMCA e laser (670 nm) sobre a frequência de células vivas e mortas no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de $ML_{PEG-ZnF}$. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao CMCA e ao laser (670 nm). Letras

diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). 104

Figura 29: Camundongos tratados com as amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas exposto ao CMCA e laser. Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão (A e B), fígado (C e D) e baço (E e F) de camundongos. Em A e B, pulmão de animal tratado $ML_{PEG-ZnF}$. Note extenso infiltrado inflamatório (I) na parede de vasos sanguíneos (vs) ou bronquíolos (b), sempre associados à presença de partículas (setas). Fígado de animais tratados (D) apresentam alguns poucos infiltrados inflamatórios (I), quando comparados ao grupo controle (C). Em F, baço de animal tratado $ML_{PEG-ZnF}$ (7 dias) exibindo marcação na polpa vermelha (PV) e branca (PB) do baço, padrão diferente ao apresentado no controle (E). Coloração por H&E em B, e pelo método de Pelrs em A, C, D, E e F..... 100

Figura 30: Amostras citológicas de líquido ascítico de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, corado pela prata. Os pontos AgNOR estão corados em marrom-café. A) TAE; B) $ML_{PEG-ZnF}$; C) $ML_{PEG-ZnF}$, submetido ao CMCA; D) $ML_{PEG-ZnF}$, submetidos ao laser (670 nm); E) e F) $ML_{PEG-ZnF}$, submetido ao CMCA e ao laser (670 nm)..... 107

Figura 31: Viabilidade das células do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, tratados com $ML_{PEG-ZnF}$, submetidos ou não ao CMCA e/ou laser. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)..... 108

Figura 32: Porcentagem de células inflamatórias no líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, tratados com $ML_{PEG-ZnF}$, submetidos ou não ao CMCA e/ou laser. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)..... 109

Figura 33: Número de células claras e escuras em 200 células do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, tratados com $ML_{PEG-ZnF}$, submetidos ou não ao CMCA e/ou laser. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....110

Figura 34: Esfregaços de células do líquido ascítico de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, corados com Giemsa. A) e B) TAE; C) e D) $ML_{PEG-ZnF}$; E) e F) $ML_{PEG-ZnF}$, submetido ao CMCA; C = célula clara; E = célula escura; CI = Células inflamatórias; As setas indicam aglomerados de nanopartículas magnéticas.111

Figura 35: Esfregaços de células do líquido ascítico de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, corados com Giemsa. A) e B) $ML_{PEG-ZnF}$, submetidos ao laser (670 nm); C), D, E) e F) $ML_{PEG-ZnF}$, submetido ao CMCA e ao laser (670 nm). C = célula clara; E = célula escura; CI = Células inflamatórias; As setas indicam aglomerados de nanopartículas magnéticas.....112

Figura 36: Peso corporal de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, tratados com $ML_{PEG-ZnF}$, submetidos ou não ao CMCA e/ou laser, ao longo do período experimental. A) Porcentagem do peso e B) Porcentagem do ganho de peso. 1º = pesagem realizada no dia da implantação do TAE; 2º, 3º e 4º = pesagem realizada antes do primeiro, segundo e terceiro tratamentos com a amostra ($ML_{PEG-ZnF}$) e subsequentes terapias (MHT e/ou TFD). Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).....115

Figura 37: Volume do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, tratados com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas, submetidos ou não ao CMCA e/ou laser. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).....115

Figura 38: Sobrevida de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico, tratados com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas, submetidos ou não ao CMCA e/ou laser. Grupos: 1 = controle TAE; 2 = ML_{PEG}-ZnF , 3 = ML_{PEG}-ZnF submetido ao CMCA, 4 = ML_{PEG}-ZnF submetido ao laser e 5 = ML_{PEG}-ZnF submetido ao CMCA e laser. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).....117

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- CMCA – Campo magnético de corrente alternada
- AcM – Anticorpo monoclonal
- ADN – Ácido desoxirribonucléico
- ARN – Ácido ribonucléico
- CF – Ciclofosfamida
- DMSA – Ácido dimercapto - succínico
- DL50 – Dose Letal 50 – quantidade de amostra necessária para causar a morte de uma determinada população em estudo.
- EPC – Eritrócitos policromáticos
- ENC – Eritrócitos normocromáticos
- %EPC – Percentagem de eritrócitos policromáticos
- FM – Fluido magnético
- FS – Fotossensibilizadores
- HT – Hipertermia
- H&E – Hematoxilina e eosina
- IP – Injeção intraperitoneal
- L_{PEG}-ZnF – Lipossoma associado a zinco-ftalocianina
- L_{PEG} – Lipossoma recoberto com polietilenoglicol
- MET – Microscopia eletrônica de transmissão
- MHT – Magnetohipertermia
- ML_{PEG} – Magnetolipossoma
- ML_{PEG}-ZnF – Magnetolipossoma associado a zinco-ftalocianina
- MN – Micronúcleo
- NPM – Nanopartículas magnéticas
- PBS – Solução de cloreto de sódio tamponada com fosfato
- PEG – Polietilenoglicol
- SFB – Soro fetal bovino
- SMF – Sistema mononuclear fagocítico
- TAE – Tumor ascítico de Ehrlich

TFD – Terapia fotodinâmica

ZnF – Zinco-ftalocianina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanociência e nanotecnologia.....	24
1.2 Materiais nanoestruturados.....	26
1.2.1 Lipossomas.....	27
1.2.2 Nanopartículas magnéticas.....	30
1.2.3 Magnetolipossoma.....	33
1.3 Aplicações biomédicas.....	34
1.3.1 Câncer.....	34
1.3.1 Magnetohipertermia.....	37
1.3.1 Terapia fotodinâmica.....	40

2 OBJETIVOS.....44

2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44

3 MATERIAL E MÉTODOS.....45

3.1 Material.....	45
3.1.1 Amostras.....	45
3.1.2 Equipamentos.....	46
3.1.2.1 Eletromagnético.....	46
3.1.2.2 Laser.....	47
3.1.3 Animais.....	48
3.1.4 Tumor ascítico de Ehrlich (TAE)	48
3.1.4.1 Obtenção e transplante das células do TAE.....	48
3.2 Delineamento experimental.....	49
3.3 Metodologia.....	51
3.3.1 Tratamentos.....	51

3.3.1.1	Determinação do tempo de exposição ao campo magnético (CMCA).....	51
3.3.1.2	Tratamento com amostras.....	51
3.3.1.3	Tratamento por exposição ao CMCA.....	52
3.3.1.4	Tratamento por exposição ao laser.....	52
3.3.1.5	Exposição ao CMCA e ao laser.....	53
3.4	Estudos “ <i>in vivo</i> ”	53
3.4.1	Análise citométrica.....	53
3.4.1.1	Contagem global de leucócitos.....	54
3.4.1.2	Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico.....	54
3.4.2	Viabilidade celular.....	55
3.4.2.1	Viabilidade de células peritoneais.....	55
3.4.2.2	Viabilidade de células do fluido ascítico.....	56
3.4.2.3	Cálculo da viabilidade celular.....	57
3.4.3	Análise genotóxica e citotóxica.....	57
3.4.4	Análise histológica.....	59
3.4.5	Regiões organizadoras de nucléolo argentafins (AgNOR).....	60
3.4.6	Avaliação das células claras e células escuras.....	62
3.4.7	Qualidade do líquido ascítico no tumor de Ehrlich.....	64
3.4.8	Peso dos animais portadores do TAE.....	64
3.4.9	Volume do líquido ascítico dos animais portadores do TAE.....	65
3.4.10	Análise do tempo de vida.....	65
3.4.11	Análise estatística.....	66
4	RESULTADOS	67
4.1	Etapa 1 - Determinação do tempo de exposição ao CMCA em animais expostos a amostra de magnetolipossomas (FeCoML)	67
4.1.1	Análise citométrica.....	67
4.1.1.1	Análise citométrica do sangue periférico.....	67
4.1.1.2	Análise citométrica do fluido peritoneal.....	68

4.1.2	Análise genotóxica e citotóxica.....	68
4.2	Etapa 2 - Tratamento com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas.....	72
4.2.1	Análise citométrica.....	72
4.2.1.1	Análise citométrica do sangue periférico.....	72
4.2.1.2	Análise citométrica do fluido peritoneal.....	73
4.2.2	Viabilidade de células peritoneais.....	73
4.2.3	Análise genotóxica e citotóxica.....	74
4.2.4	Análise histológica.....	74
4.3	Etapa 3 - Tratamento com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas submetidas ao CMCA	80
4.3.1	Análise citométrica.....	80
4.3.1.1	Análise citométrica do sangue periférico.....	80
4.3.1.2	Análise citométrica do fluido peritoneal.....	81
4.3.2	Viabilidade de células peritoneais.....	82
4.3.3	Análise genotóxica e citotóxica.....	82
4.3.4	Análise histológica.....	82
4.4	Etapa 4 - Tratamento com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas submetidas ao laser.....	89
4.4.1	Análise citométrica..	89
4.4.1.1	Análise citométrica do sangue periférico.....	89
4.4.1.2	Análise citométrica do fluido peritoneal.....	90
4.4.2	Viabilidade de células peritoneais.....	90
4.4.3	Análise genotóxica e citotóxica.....	90
4.4.4	Análise histológica.....	91
4.5	Etapa 5 - Tratamento com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas submetidas ao CMCA e laser.....	97
4.5.1	Análise citométrica.....	97
4.5.1.1	Análise citométrica do sangue periférico.....	97
4.5.1.2	Análise citométrica do fluido peritoneal.....	97
4.5.2	Viabilidade de células peritoneais.....	98
4.5.3	Análise genotóxica e citotóxica.....	98

4.5.4 Análise histológica.....	98
4.6 Etapa 6 – Magnetohipertermia (MHT) e/ou Terapia Fotodinâmica (TDF) em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich.....	105
4.6.1 Regiões organizadoras de nucléolo argentafins (AgNOR)	105
4.6.2 Viabilidade das células do líquido ascítico.....	108
4.6.3 Contagem diferencial de leucócitos do líquido ascítico.....	109
4.6.4 Avaliação das células claras e células escuras.....	110
4.6.5 Peso dos animais portadores do TAE.....	113
4.6.6 Volume do líquido ascítico dos animais portadores do TAE.....	115
4.6.7 Qualidade do líquido ascítico no tumor de Ehrlich.....	116
4.6.8 Análise do tempo de vida.....	116
5 DISCUSSÃO.....	119
5.1 Considerações gerais sobre os testes biológicos.....	119
5.2 Considerações sobre a determinação do tempo de exposição ao CMCA em animais expostos a amostra de magnetolipossomas (FeCoML)	123
5.3 Considerações sobre as amostras investigadas.....	125
5.4 Considerações sobre o tratamento com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas e exposição ou não ao CMCA e ao laser (etapas 2 a 5)	128
5.4.1 Considerações sobre a análise citométrica em animais não portadores de tumor ascítico de Ehrlich (sadios)	128
5.4.2 Considerações sobre a análise genotóxica e citotóxica em animais não portadores de tumor ascítico de Ehrlich (sadios)	131
5.4.3 Considerações sobre a viabilidade de células peritoneais em animais não portadores de tumor ascítico de Ehrlich (sadios)	131
5.4.4 Considerações sobre a análise histológica em animais não portadores de tumor ascítico de Ehrlich (sadios)	132
5.5 Considerações sobre os testes em animais com o tumor ascítico de Ehrlich (etapa 6)	133
5.5.1 Considerações sobre o tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	133
5.5.2 Considerações gerais sobre os testes em tumores.....	134

5.5.3	Considerações sobre a análise das regiões organizadoras de nucléolo argentafins (AgNOR) em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich.....	136
5.5.4	Considerações sobre a viabilidade das células do líquido ascítico em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich.....	137
5.5.5	Considerações sobre a contagem diferencial de leucócitos do líquido ascítico em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich.....	138
5.5.6	Considerações sobre o teste de células claras/células escuras e do volume do líquido ascítico.....	138
5.5.7	Considerações sobre o peso dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich.....	140
5.5.8	Considerações sobre o volume dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich.....	140
5.5.9	Considerações sobre o grau de hemorragia da ascite nos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich.....	141
5.5.10	Considerações sobre a sobrevivência dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich.....	142
5.5.11	Considerações sobre a magnetohipertemia e terapia fotodinâmica.....	143
6	CONCLUSÃO.....	145
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
	ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanociência e Nanotecnologia

A Nanociência e a Nanotecnologia se referem ao estudo e às aplicações tecnológicas de materiais que, além de apresentarem, pelo menos em uma de suas dimensões, tamanho na ordem de nanômetros, possam ser manipulados por meio de processos que permitam o controle sobre seus atributos químicos e físicos, com habilidade e precisão (TOMA, 2004; MELO; PIMENTA, 2004).

Em uma palestra proferida em 1959, no Instituto de Tecnologia da Califórnia, o físico Richard Feynman introduziu a fundamentação da nanotecnologia, ao sugerir que, desde que as leis da natureza fossem mantidas, os átomos poderiam ser organizados de modo que se criassem materiais com propriedades inteiramente novas, gerando produtos inovadores. Esta palestra, intitulada "There's plenty of room at the bottom" ("Há muito espaço lá embaixo") é, hoje, considerada o ponto inicial da Nanotecnologia. Segundo Feynman, a manipulação em escala reduzida possibilitaria a fabricação de dispositivos em escala nanométrica aplicáveis a várias áreas do conhecimento, conforme relatado por TEDESCO, SIMIONI e PRIMO (2007).

No entanto, foi somente em 1974, na Universidade de Tóquio, que o professor Norio Taniguchi criou o termo NANOTECNOLOGIA e define o seu conceito, afirmando que consiste principalmente no processo de separação, consolidação e deformação dos materiais por um átomo ou uma molécula (STEINMETZ, 2006).

A implementação desta idéia pioneira precisou aguardar o desenvolvimento de novas tecnologias que permitissem acesso às escalas submilimétricas, tais como os avanços na área da microscopia, com o desenvolvimento dos microscópios de força atômica e de varredura.

Conceitualmente, a nanoescala abrange os tamanhos entre 0,1 e 100 nanômetros (nm), faixa em que as propriedades dos materiais são determinadas e podem ser controladas (MEDEIROS; PATERNO; MATTOSO, 2006) e manipuladas nas dimensões atômica, molecular e supramolecular, com o propósito de criar, usar e

entender sistemas com novas propriedades e funções (HUSSAIN et al., 2005; QIN; KIM; LEE, 1999).

O interesse crescente por esta área decorre sobretudo do fato de que materiais em escala nanométrica apresentam características peculiares que possibilitam inúmeras aplicações (LIU; WEBSTER, 2007; SCHEU et al., 2006; FORTINA et al., 2005). Essas novas propriedades dos nanomateriais devem-se a dois fatores principais: o efeito quântico e o efeito de superfície. O efeito quântico determina o comportamento dos átomos e dos elétrons e, em dimensões nanométricas, manifesta-se de maneira mais evidente. Quanto menor for o tamanho do material, mais importantes são os efeitos de superfície, devido ao aumento da razão entre o número de átomos que estão em sua superfície em relação àqueles dispersos por seu volume, o que provoca um aumento significativo na sua reatividade (THURMAN, 2006; PISON et al., 2006; MELO; PIMENTA, 2004).

A Nanotecnologia busca empregar essas novas propriedades que surgem nos materiais nanométricos na elaboração de novos dispositivos tecnológicos com aplicação nas mais diferentes áreas do conhecimento, tais como Informática, Engenharia, Física, Química e Biologia, entre outras (MELO; PIMENTA, 2004).

Quando os princípios da nanoescala e técnicas associadas são empregados para entender e transformar biosistemas, recebem a designação de Nanobiotecnologia (NASCHIE, 2006; TOMA, 2004; ALINGTON, 2003). Esta área permite inúmeras aplicações na área biomédica, como os sistemas de entrega de droga que promovem direcionamento específico a uma determinada célula, diagnóstico e tratamento de doenças (LEE; WANG, 2006; GOULD, 2006; JAIN, 2005). A Nanobiotecnologia converge para a Nanomedicina (HERR, 2006; YUN, 2007), quando procura desenvolver dispositivos a serem utilizados em procedimentos inovadores de tratamento e diagnóstico precoce e/ou mais preciso de doenças, a fim de preservar e melhorar a saúde humana.

Nesta perspectiva, o impulso da Nanotecnologia é expressivo em diversas áreas da saúde, tais como: engenharia genética, biologia celular, clonagem, medicina física, neurologia, medicina dentária, criogenia e dermatologia (STEINMETZ, 2006).

1.2 Materiais Nanoestruturados

Nos últimos anos tem ocorrido um enorme avanço na geração e na elaboração de novos materiais. Dentre eles, destacam-se os materiais nanoestruturados que apresentam novas e distintas propriedades e processabilidades (FURTADO et al., 2005).

Nanomateriais podem ser produzidos de inúmeras maneiras: (1) nanomateriais que possuem uma só dimensão como os filmes finos, monocamadas e superfícies utilizados no desenvolvimento de micro-reatores para produção de produtos químicos e farmacêuticos, bem como para aplicações de *lab-on-a-chip*; (2) nanomateriais de duas dimensões, como os nanotubos e os nanofios, dos quais merecem destaque os nanotubos de carbono que, devido à elevada condutividade elétrica, apresentam propriedades mecânicas e elétricas admiráveis e os nanofios de silício que exibem propriedades ópticas, elétricas e magnéticas de enorme interesse para aplicações em nanoeletrônica. Além desses, os biopolímeros, como os de DNA e proteínas, que apresentam enorme interesse devido à variabilidade e controlabilidade da sua estrutura e (3) nanomateriais tridimensionais, como as nanopartículas, as quais apresentam propriedades mecânicas, ópticas e eletrônicas diferentes das partículas com dimensões superiores, devido a efeitos de superfície e efeitos quânticos, sendo geralmente utilizadas na formulação de outros produtos finais (CONDE, 2006). Além disso, essas nanoestruturas baseiam-se nos mais diversificados tipos de materiais, como polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais (MEDEIROS; PATERNO E MATTOSO, 2006).

Os biomateriais constituem componentes produzidos para interagir com sistemas biológicos (ROACH et al., 2007) e podem ser estruturados em escala nanométrica (ANDERSON et al., 2004; TARTAJ, 2005). Recentemente, grande esforço tem sido feito para desenvolver nanobiomateriais, tais como nanocompósitos, nanotubos, nanofibras, nanocápsulas, nanoesferas e nanopartículas (MELO; PIMENTA, 2004; BIANCO; KOSTARELOS; PRATO, 2005; GUZ et al., 2007).

Benefícios potenciais na utilização dos nanobiomateriais são vislumbrados na clínica e na farmacêutica, incluindo a especificidade de ação, sistema de entrega de

agentes terapêuticos, entre outras múltiplas funções. Convém lembrar, no entanto, para que se possam compreender os mecanismos de ação dos nanobiomateriais, e posteriormente empregá-los, é de suma importância que estudos de toxicidade e biocompatibilidade sejam realizados (LACAVA; MORAIS, 2004; MAYNARD, 2006).

Entre os biomateriais nanoparticulados de grande interesse na área biomédica estão as vesículas lipossomais, as nanopartículas magnéticas e seus conjugados, como os magnetolipossomas.

1.2.1 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas com uma fase aquosa totalmente cercada por uma ou mais bicamadas de fosfolipídeos (GREGORIADIS, 1984; OLIVEIRA, 2006). Podem ser preparados a partir de misturas lipídicas naturais extraídas e purificadas, ou a partir de lipídios sintéticos, disponíveis comercialmente (SANTOS; CASTANHO, 2002). Essas vesículas podem apresentar tamanhos que variam de 20 nm a dezenas de micrômetros. De acordo com o tamanho e a quantidade de bicamadas, os lipossomas são classificados em SUV (*small unilamellar vesicle*) quando possuem somente uma bicamada com tamanhos entre 0,02 – 0,05 μm , LUV (*larger unilamellar vesicle*) quando possuem somente uma bicamada com tamanhos entre 0,06 – 0,1 μm e MLV (*multilamellar vesicles*), constituídas por várias bicamadas lipídicas concêntricas, com diâmetros variando entre 0,1 a 5 μm (NEW, 1995; OLIVEIRA, 2006) (Figura 1).

Essas vesículas lipossomais são amplamente utilizadas como modelos de membranas celulares e como transportadores de cosméticos, de aditivos alimentares e de drogas. Neste último caso, permitem o encapsulamento de substâncias ativas hidrofílicas e lipofílicas, de modo que funcionam como um sistema de liberação de fármacos (LIU; WEBSTER, 2007; RACUCIU et al., 2007). A possibilidade de realizar este encapsulamento é muito importante, pois a utilização da grande maioria dos fármacos tem sido sempre limitada pela impossibilidade de aumento da sua dosagem devido ao fato de que a retenção ou degradação do agente terapêutico, sua baixa

solubilidade e efeitos colaterais, inviabilizam a utilização da dosagem necessária para que se alcance o efeito terapêutico (SANTOS; CASTANHO, 2002).

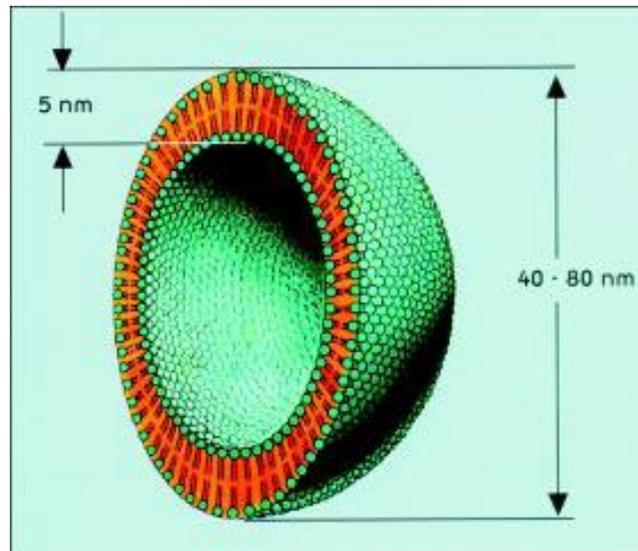


Figura 1: Estrutura de Lipossoma unilamelar (FORMARIZ et al., 2004).

Uma grande vantagem dos lipossomas como sistemas carreadores de drogas é sua elevada biocompatibilidade, sobretudo por apresentar alta biodegradabilidade e baixa toxicidade (LIU et al., 2000), especialmente quando sua composição é de lipídios naturais. São sistemas versáteis cujas características podem ser manipuladas em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos. Substâncias farmacologicamente ativas podem ser incorporadas no compartimento aquoso interno, como é o caso das hidrofílicas, ou nas membranas, no caso de substâncias lipofílicas ou anfifílicas (ROSSI-BERGMANN; FRÉZARD, 2007), o que possibilita a utilização de doses elevadas de um fármaco com baixo efeito sistêmico, o direcionamento ao sítio-alvo e o controle da velocidade de liberação do mesmo (HOEBEKE, 1995; LIU et al., 2000).

Vários mecanismos podem contribuir para a liberação da substância encapsulada em lipossomas no meio biológico. Um deles está relacionado com a forma de interação da substância com a membrana lipossomal: no caso das substâncias lipofílicas, a quantidade liberada depende do coeficiente de partição da substância entre

a membrana e a fase aquosa, enquanto no caso das substâncias hidrofílicas, depende da criação de um gradiente de concentração da substância, de modo que a membrana atue como barreira, limitando a velocidade de difusão para o meio externo. Um outro mecanismo depende das interações dos lipossomas com componentes dos fluidos biológicos, como as lipoproteínas plasmáticas, que podem contribuir para a redução na velocidade de liberação, pois lipídios da membrana lipossomal podem ser transferidos para as lipoproteínas, bem como os componentes dessas podem ser transferidos para as membranas lipossomais (ROSSI-BERGMANN; FRÉZARD, 2007).

Lipossomas convencionais formados por fosfatidilcolina e colesterol são facilmente interiorizados por células do sistema mononuclear fagocítico (SMF), sendo sua fagocitose facilitada pela opsonização que ocorre assim que as vesículas entram em contato com componentes do sangue (PAPAHADJOPOULOS et al., 1991; MOGHIMI; PATEL, 1989a,b). As opsoninas são elementos do soro sanguíneo que se ligam às partículas antigênicas e promovem a fagocitose. O tempo de circulação depende ainda do tamanho da partícula e das características superficiais do veículo, tais como hidrofobicidade, carga e fluidez (ALLEN et al., 1991; MOGHIMI; PATEL, 1989a,b). A fagocitose precoce pode interferir no propósito dos sistemas liberadores de drogas de direcionar e liberar a droga em um sítio específico, o que limita consideravelmente a aplicação dos lipossomas para fins terapêuticos (OLIVEIRA, 2006).

Sabendo que os lipossomas preparados por formulações convencionais são facilmente reconhecidos e endocitados (MOGHIMI; PATEL, 1989), novas formulações têm sido propostas com o objetivo de aumentar o tempo de circulações dos lipossomas, promovendo maior acúmulo da droga de interesse no sítio-alvo.

Os lipossomas atingiram o estágio clínico quando pesquisas revelaram que a presença de ligantes na superfície dos lipossomas, como monosialogangliosídeos (GABIZON; PAPAHADJOPOULOS, 1992), fosfatidilinositol (ALLEN; HANSEN; RUTLEDGE, 1989.) ou polioxietileno (BLUME; CEVE, 1990; MARUYAMA et al., 1991) diminuía o tempo de remoção dos mesmos, prevenindo a captura pelos macrófagos no fígado e no baço, quando eram injetados via intravenosa (GABIZON; PAPAHADJOPOULOS, 1992; KLIBANOV et al., 1990), razão pela qual foram

denominados lipossomas de longo tempo de circulação (LLC), também conhecidos como lipossomas furtivos (*stealth*). Segundo PAPAHADJOPOULOS et al. (1991), estes lipossomas são estericamente estabilizados pela presença de grupos ativos em sua superfície (LASIC; WOODLE; PAPAHADJOPOULOS, 1992).

A necessidade de se obter LLC mais seguros e econômicos levou vários grupos a buscarem novas alternativas. Lipossomas estericamente estabilizados pelo polietilenoglicol (PEG), polímero flexível e hidrofílico, capaz de minimizar ainda mais o reconhecimento e captação de nanopartículas magnéticas (NPM) pelo SMF (DONG; FENG, 2007), também apresentam prolongado tempo de circulação. A captura reduzida de lipossomas contendo cadeias de polietilenoglicol na superfície é devida à redução, tanto da opsonização das estruturas pelas proteínas plasmáticas (SENOIR et al., 1991; ALLEN, 1994), quanto da agregação dos lipossomas furtivos no sangue (IGA et al., 1994; AHL et al., 1997), tornando possível seu escape do reconhecimento pelo SMF, o que em consequência proporciona maior tempo de circulação.

As modificações na superfície de LLC carreadores de drogas melhoram sua seletividade aos sítios específicos, o que constitui vantagem como sistema de liberação de fármacos, uma vez que outros sistemas, como os das nanopartículas e microemulsões, não são facilmente modificados (OLIVEIRA, 2006).

1.2.2 Nanopartículas Magnéticas

Dentre os tipos de biomateriais nanoestruturados encontram-se também as nanopartículas magnéticas (NPM) (TARTAJ et al., 2005; MASASHIGE, 2002), as quais constituem monodomínios magnéticos com diâmetro em torno de 4 a 12 nm, e que podem ser sintetizadas a partir de diferentes tipos de ferritas ($M^{+2}Fe_2O_4$, onde M^{+2} simboliza um metal), tais como as ferritas de cobalto, manganês ou zinco. As NPM utilizadas com maior frequência na área biomédica são as compostas de magnetita (Fe_3O_4) ou de maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) (GUPTA; GUPTA, 2005; SAIYED; TELANG; RAMCHAND, 2003; BERRY; CURTIS, 2003; HALBREICH et al., 1998) (Figura 2).

Os sistemas magnéticos dispersos em fase líquida são de grande interesse para diversas aplicações. São constituídos por NPM dispersas em um meio líquido constituindo o chamado Fluido Magnético (FM), onde o dispersante pode ser tanto um solvente orgânico, como um inorgânico (ROSENSWEIG, 1985; SILVEIRA, 2006).

A capacidade das NPM permanecerem em suspensão nesse solvente, na forma de entidades isoladas, confere ao FM uma das suas mais marcantes características, a estabilidade (MORAIS et al., 2001). Tal comportamento deve-se ao equilíbrio das interações atrativas e repulsivas entre as nanopartículas, evitando sua aglomeração e subsequente precipitação (PEREIRA, 2000).

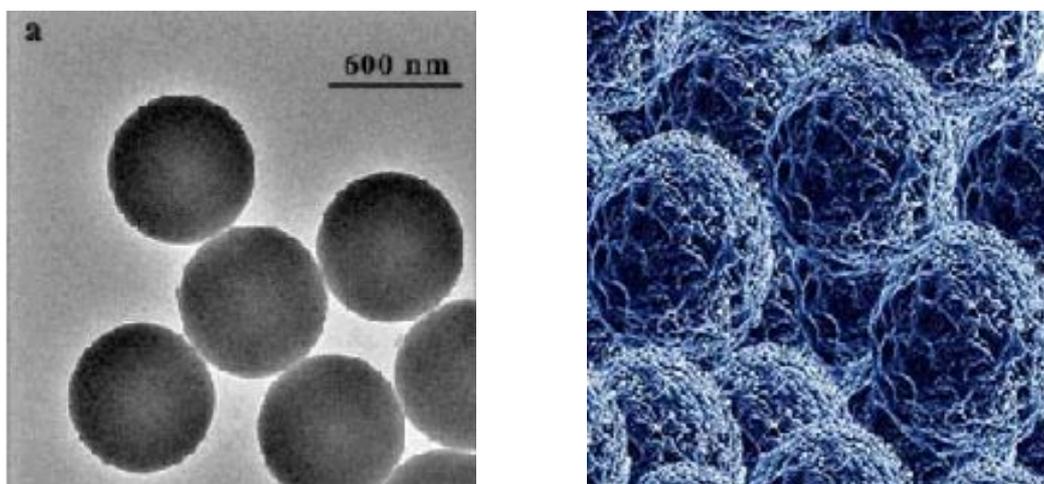


Figura 2: Nanopartículas Magnéticas: **a)** $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PAH}$ (TARTAJ, 2003); **b)** Nanoprism Technologies Inc.

A estabilidade coloidal dos FM pode ser alcançada por dois mecanismos principais, a repulsão eletrostática e a repulsão estérica. A estabilização por repulsão eletrostática ocorre devido às duplas camadas elétricas em torno das partículas em suspensão. Se ambas possuírem cargas e potenciais de superfície de mesmo sinal e magnitude, as interações conduzirão à repulsão entre as partículas, prevenindo a agregação. E a estabilização por repulsão estérica ocorre quando as partículas suspensas carregam em suas superfícies, moléculas com alta afinidade pelo líquido

dispersos, de forma que geram repulsão entre as cadeias e, conseqüentemente, entre as partículas (MORAIS; LIMA, 2006).

No fluido magnético, as NPM em suspensão transferem suas propriedades magnéticas para todo o líquido de modo que, sob a ação de um gradiente de campo magnético, as NPM arrastam o líquido dispersor, e o sistema comporta-se macroscopicamente como se fosse uma única fase líquida e magnética, característica que explica o interesse que os FM têm despertado no meio científico para aplicações industriais e biomédicas (PANKHURST et al., 2003; FREITAS et al., 2002).

O emprego do FM em aplicações clínicas e em biotecnologia depende de aspectos fundamentais, como estabilidade e biocompatibilidade (LACAVA; MORAIS, 2004). Essas características podem ser alcançadas por meio do recobrimento adequado da superfície das NPM com material biologicamente ativo, de natureza orgânica ou inorgânica, sem que altere suas propriedades magnéticas (MORAIS et al., 2001). As nanopartículas modificadas com a camada estabilizante devem ser biodegradáveis, hemocompatíveis e atóxicas ao organismo, com o propósito de impedir que efeitos biológicos indesejáveis ocorram (FREITAS et al., 2002), além de serem capazes de atravessar a barreira endotelial, adiarem o reconhecimento das mesmas pelo sistema monocítico fagocitário (SMF) e proverem o acúmulo específico no tecido-alvo (LACAVA et al., 1999). O recobrimento permite que outros agentes sejam associados às NPM, tais como anticorpos, proteínas, ligantes-alvo e fármacos; de modo que potencializem o direcionamento específico (DA SILVA et al., 1997; SHINKAI et al., 1999; KELLAR et al., 1999). As NPMs apresentam a vantagem de poderem ser utilizadas tanto no diagnóstico, como no tratamento de doenças.

Uma alternativa que torna as NPM mais estáveis em meio fisiológico e mais biocompatíveis, além de permitir maior eficiência e seletividade na incorporação no tecido-alvo é obtida por sua encapsulação em lipossomas (YANASE et al., 1997; DE CUYPER, 1988; GARCIA et al., 2002; LACAVA et al., 2004).

1.2.3 Magnetolipossoma

O sistema composto pela encapsulamento de nanopartículas magnéticas em lipossomas é conhecido por lipossomas magnéticos ou magnetolipossomas (ML) (BULTE et al., 1999; DE CUYPER; JONIAU, 1991; BOGDANOV et al., 1994). São estruturas fisiologicamente estáveis e biocompatíveis e oferecem muitas vantagens no campo da biotecnologia moderna e da biomedicina (SOLER et al., 2003; MULLER; KECK, 2004; KONERACKÁ et al., 2005) (Figura 3).

Quando o complexo é formado por NPM encapsuladas em vesículas lipossomais de longo tempo de circulação (conjugadas ao PEG) (HODENIUS et al., 2002), a fagocitose imediata das NPM pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) é evitada, de modo que permaneçam na circulação tempo suficiente para exercerem a sua função.

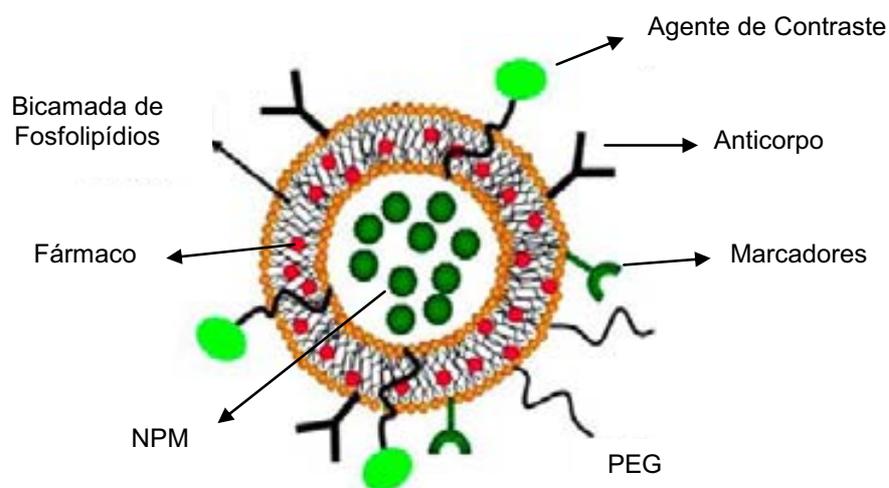


Figura 3: Representação de Magnetolipossoma (FAHMY et al., 2007).

As NPM, tanto as dispersas em FM, quanto as encapsuladas em lipossomas, têm recebido atenção especial por poderem ser direcionadas ou localizadas em sítios específicos por um campo magnético externo (LÜBBE; ALEXIOU; BERGEMANN, 2001; LACAVA et al., 1999). Esta localização em um sítio preferencial por gradientes de

campo magnético sugere que ML e FM, entre outros sistemas magnéticos, tornam-se carreadores efetivos de drogas com sítio especificidade e facilita o controle da liberação de agentes quimioterápicos. Dados científicos reportam que as aplicações biomédicas dos sistemas magnéticos excedem a atividade de carreadores de drogas, podendo também ser utilizados como agentes de contraste de fase em imagem de ressonância magnética nuclear (RMN) (WEISSLEDER et al., 1990; CLEMENT et al., 1991; LACAVA, 2006), separação magnética de células ou moléculas biológicas diversas (SAFARIKOVA; SAFARIK, 2001), marcadores celulares (GOETZE et al., 2002; BERRY; CURTIS, 2003; MORAIS et al., 2004), terapia gênica (FOULTIER et al., 2005; ITO; FUKUSAKI, 2004) e tratamento de várias doenças, tais como câncer (JORDAN et al., 1996; BACRI et al., 1997; FORMARIZ et al., 2004; PRADHAN, 2007), tuberculose (GELPERINA et al., 2005; SILVA; FACCIOLI, 2007), Paracoccidiodomicose (FUKUI et al., 2003), Leishmaniose (ROSSI-BERGMANN; FRÉZARD, 2007), *Diabetes Mellitus* (LISBÔA et al., 2007), entre outras.

1.3 Aplicações Biomédicas

Vários estudos têm sido realizados acerca das aplicações biomédicas dos materiais magnéticos nanoestruturados (SAFARIKOVA; SAFARIK, 2001; SAFARIK; SAFARIKOVA, 2002; TARTAJ, 2003). As propriedades e aplicações dos FM biocompatíveis (LACAVA et al., 1999; BERRY; CURTIS, 2003) e lipossomas magnéticos (DE CUYPER, 1996) representam importante foco de interesse nesta área. Muitos desses estudos visam o diagnóstico e a terapia de diversas patologias, com particular interesse no câncer (citados em LACAVA et al., 1999; HERGT et al., 2006).

1.3.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de várias doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que ainda podem invadir tecidos e órgãos,

espalhando-se para outras regiões do corpo. Tal enfermidade permanece como uma das mais importantes doenças crônico-degenerativas pela sua incidência e mortalidade (Nacional Cancer Institute - US). A cada ano se configura e se consolida como um problema de saúde pública de dimensões mundiais. De acordo com a Agência Internacional para Pesquisas em Câncer (IARC, 2003), anualmente seis milhões de pessoas morrem de câncer no mundo e cerca de dez milhões de novos casos são diagnosticados, enquanto que segundo estimativas apresentadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2007), sete milhões de pessoas morrem por ano, e estima-se que em 2020 este índice alcance quinze milhões de casos novos no mundo. No Brasil foram previstos 466 mil casos novos para o ano de 2008 (INCA, 2007).

O tratamento do câncer pode ser feito por meio de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar essas modalidades. Sabe-se que as terapias antineoplásicas convencionais são de significativa importância no aumento da expectativa de vida do paciente, mas podem, também, comprometer sua sobrevivência.

A cirurgia é uma das principais modalidades terapêuticas no tratamento do câncer, desde que o tumor apresente localização anatômica favorável e seja diagnosticado antes da ocorrência de um processo metastático (PAGE, 1991; RANG et al., 2004). Pode ser curativa quando o tratamento compreende a remoção total da massa neoplásica e é diagnosticada antes de gerar metástases, e paliativa quando a incisão reduz o tumor e retarda a evolução da doença. A cirurgia pode ser exclusiva ou combinada a outros métodos de tratamento, como radioterapia e/ou quimioterapia. Em muitos casos, porém, ocorrem complicações pós-operatórias que podem gerar seqüelas físicas e funcionais (ITC, 2008), ou mesmo, em casos extremos, levar o paciente a óbito (SAWADA et al., 1998).

A radioterapia é uma modalidade utilizada quando a neoplasia está localizada em regiões que inviabilizam intervenção cirúrgica ou em casos de reincidência após cirurgia (MARKS; MOHIUDDIN; EITAN, 1991). Baseia-se na destruição de células por meio da absorção da energia incidente. A radiação danifica a estrutura química interna das células cancerígenas que as impedem de multiplicar, efeitos que levam à morte da célula por apoptose, processo de suicídio programado da célula, ou por necrose,

processo passivo desencadeado por aberrações cromossômicas letais que são geradas pela radiação durante a mitose (COHEN-JONATHAN *et al.*, 1999). Os danos provocados pela radiação ionizante são causados por uma interação direta com a molécula alvo ou, indiretamente, pela formação de radicais livres. A radioterapia é geralmente usada em tumores sólidos localizados e em cânceres que afetam a circulação sangüínea, como leucemia e linfoma. É freqüentemente usada em combinação com outras modalidades terapêuticas, e quando utilizada antes ou durante um outro procedimento, age como neoadjuvante, reduzindo o tumor para a realização de uma cirurgia ou quimioterapia mais efetiva; e quando utilizada posteriormente, atua como tratamento adjuvante, de forma que destrói qualquer célula de câncer que possa ter permanecido (ITC, 2008). No entanto, por meio dos seus efeitos secundários, a radioterapia pode provocar alterações genéticas em células normais que resultam em um novo processo neoplásico (ENGELS *et al.*, 1998).

Por sua vez, a quimioterapia representa uma importante ferramenta (CLETON, 1995) que pode ser usada como tratamento principal ou adjuvante após procedimentos cirúrgicos ou radioterápicos (OKUNO *et al.*, 1986) para ter certeza de que todas as células do câncer foram eliminadas (ITC, 2008). A quimioterapia pode envolver uma única droga ou a combinação de duas ou mais drogas (dependendo do tipo de câncer e sua taxa de progressão) que agem de forma sistêmica devido à ação não específica dos agentes quimioterápicos, a fim de destruir e controlar o crescimento de células cancerígenas e também aliviar os sintomas da dor. Uma das maiores limitações das drogas antineoplásicas é o seu baixo índice terapêutico porque a dose requerida para produzir efeitos antitumorais é também tóxica aos tecidos normais, pela similaridade bioquímica existente entre os dois tipos celulares (ALEXIOU, 2000).

O transplante de medula óssea, procedimento terapêutico onde é feita a infusão venosa de células do tecido hematopoiético, tem a finalidade de restabelecimento da hematopoiese após a aplasia medular, seja ela de causa benigna primária, como no caso da anemia aplásica, seja na neoplasia maligna, como leucemias e linfomas; ou ainda relacionada ao tratamento (radioterapia e/ou quimioterapia) realizado para estas neoplasias (GENGOZIAN *et al.*, 1958; LUDWIG *et al.*, 1977; MARTÍ *et al.*, 1999; WASELENKO *et al.*, 2004; JEFFREY *et al.*, 2006). O transplante pode ser autogênico,

quando a medula ou as células precursoras de medula óssea provêm do próprio indivíduo transplantado; ou é dito alogênico, quando provêm de um outro indivíduo. Pode também ser feito a partir de células precursoras de medula óssea obtidas do sangue circulante de um doador ou do sangue de cordão umbilical. A limitação desta modalidade terapêutica está na necessidade de se obter compatibilidade imunitária entre as medulas do doador e do receptor e a chance de encontrar uma medula compatível é 1:100.000 (CEMO/INCA).

As limitações apresentadas pelas terapias convencionais suscitam o desenvolvimento de metodologias com novos mecanismos de ação para o tratamento do câncer (SCOTT; WELT, 1997; ROTHENBERG, CARBONE; JOHNSON, 2003; MORALES, 2007). Essas novas alternativas devem alcançar melhores resultados em relação às terapias convencionais e ainda reduzir os efeitos colaterais.

Buscando alcançar este mérito, várias terapias têm sido investigadas, entre as quais têm destaque aquelas que utilizam nanobiomateriais, como a magnetohipertermia (JORDAN et al., 1999; WUST et al., 2002; BRIGGER et al., 2002; GUEDES, 2005) e a Terapia Fotodinâmica (BONNET; BERENBAUM, 1989; BROWN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

1.3.1 Magnetohipertermia

Hipertermia (HT) é uma terapia que eleva artificialmente a temperatura dos tecidos com a finalidade de obter benefícios terapêuticos. Estudos em culturas de células e em animais experimentais demonstraram que a morte celular ocorre a partir de temperaturas de 41°C-42°C (MINAMIMURA et al., 2000; WUST et al., 2002; BRUSENTOV et al., 2004). O uso desse procedimento pode apresentar grandes vantagens para tratamento do câncer, pois partindo do pressuposto de que as células tumorais são menos resistentes ao aumento brusco de temperatura do que as células normais circunvizinhas, a terapia hipertérmica causaria a lise exclusivamente de células neoplásicas (VAN DER ZEE et al., 2000, YAN et al., 2005). A maior sensibilidade das células tumorais à temperatura elevada se deve à desorganização angiogênica da

massa tumoral que inviabiliza a dissipação do calor (JORDAN et al., 1999), ao baixo pH, à hipóxia e à falta de nutrientes, como a glicose (MOROZ et al., 2002; AKTAS et al., 2006).

Para promover esse aumento da temperatura, laser, radiofrequência, microondas, inserção local de agulhas ferromagnéticas (YANASE et al., 1997) ou administração de substância indutora de febre (pirogênio) têm sido utilizados (BLASIAK, 2003). Embora essas técnicas sejam capazes de elevar a temperatura celular (42°C-45°C), apresentam efeitos colaterais indesejados, como a falta de seletividade que termina por afetar tecidos saudáveis do organismo e o fato de não permitir aquecimento uniforme do tumor, dificultando a total erradicação do mesmo, o que torna a terapia menos efetiva (SHINKAI et al., 1999; SUZUKI et al., 1999).

Uma proposta para solucionar as deficiências desta técnica oncológica que apresenta grande potencial tecnológico, envolve a utilização de materiais magnéticos (BACRI et al., 1997; GORDON, 1998; RAU et al., 1998) para promover a hipertermia em um processo conhecido como Magnetohipertermia (MHT). Graças ao recente desenvolvimento de métodos precisos de síntese de NPM, esta aplicação tem superado sua condição de especulação teórica para tornar-se um projeto já em andamento em alguns centros de excelência no mundo inteiro (PANKHURST et al., 2003). Várias pesquisas relacionadas à utilização de NPM como mediadores no aquecimento e lise de células tumorais têm sido realizados com magnetolipossomas ou fluidos magnéticos (BOUHON et al., 1999 apud LACAVA et al., 1999).

A MHT visa a citólise dos tecidos tumorais por meio do aumento localizado da temperatura. O aquecimento sítio-específico é alcançado mediante a utilização de FM contendo NPM biocompatíveis e associadas, por exemplo, a anticorpos monoclonais (AcM) que sejam específicos para proteínas da membrana de células neoplásicas. Esta associação direciona as NPM às células-alvo, restringindo o aquecimento ao tecido tumoral, minimizando, deste modo, danos aos tecidos normais (SCHÜTT et al., 1997). As NPM podem ser atraídas e retidas na região do tumor pelo uso de um campo magnético estático ou ainda serem injetadas diretamente no tumor (YANASE et al., 1998). Uma vez que as células-alvo tenham endocitado as NPM, é aplicado um campo magnético de corrente alternada (AC) que possibilita a elevação da temperatura local

em até 8° C (BACRI et al., 1997; WUST et al., 2002). As NPM aumentam a temperatura local por transformar a energia absorvida devido à exposição ao campo magnético alternado em calor por meio de diversos mecanismos físicos (NEILSEN, HORSMAN E OVERGAARD, 2001; MA et al., 2004; WANG; GU; YANG, 2005). O aquecimento ainda depende da frequência e amplitude do campo e das características das nanopartículas, como diâmetro e susceptibilidade magnética (BRUSENTOV, 2004).

A MHT tem sido considerada uma técnica promissora para tratamento de diversos cânceres (WUST et al., 2002) e sua aplicabilidade tem sido avaliada recentemente em testes clínicos, nos quais são incluídos estudos controlados e altamente monitorados, conduzidos de forma a obter dados preliminares da eficácia da técnica (HILDEBRANDT, 2002). HAUFF et al. (2006) demonstraram em testes clínicos em humanos que a magnetohipertermia usando NPM pode ser aplicada com segurança no tratamento de tumores de cérebro e que as temperaturas alcançadas tiveram o papel terapêutico desejado. Em um estudo clínico de fase I, LÜBBE, ALEXIOU E BERGMANN (1998) utilizaram epirrubicina, tanto em formulação livre, como ligada a NPM, em pacientes com tumores superficiais, alcançando sucesso no direcionamento da droga ligada à NPM para a massa tumoral com a ajuda de magnetos externos. Observaram por meio de exames de imagem por RMN acúmulo da droga no local-alvo e testes histológicos revelaram regressão tumoral. A tolerância dos pacientes ao tratamento e ausência de efeitos colaterais foi considerada satisfatória. Os testes pré-clínicos deste grupo realizados em ratos mostraram que a epirrubicina associada à NPM levou a redução tumoral dez dias após tratamento.

A MHT pode ser administrada simultaneamente com outras modalidades terapêuticas, sobretudo para melhorar a eficácia dos fármacos antineoplásicos, sem aumentar o seu potencial citotóxico, sendo favorável também ao aumentar a resposta clínica na radioterapia (DAHL et al., 1999; JORDAN et al., 1999, HILDEBRANDT, 2002; LACAVA, 2006).

1.3.1 Terapia Fotodinâmica

Outra terapia alternativa que tem sido investigada nos últimos anos, a Terapia Fotodinâmica (TFD), é baseada na utilização de fármacos fotossensibilizadores como agentes no tratamento de tecido tumoral (OLIVEIRA, 2006; RIBEIRO et al., 2007). A utilização da luz como alternativa terapêutica para diversas doenças já ocorre há muitos anos (ACKROYD et al., 2001), mas foi nos últimos anos que a TFD despertou maior interesse, tendo sido inclusive reconhecida como uma alternativa para o tratamento de câncer (MACHADO, 2006). A Terapia Fotodinâmica pode ser utilizada de forma isolada ou em combinação com as terapias antineoplásicas convencionais, e ainda com novas estratégias terapêuticas, como a terapia anti-angiogênica (FERRARIO et al., 2000) e a Magnetohipertermia, para combater o câncer (TEDESCO; ROTTA; LUNARDI, 2003 ;TEDESCO et al., 2004).

A TFD se refere ao emprego terapêutico de reações fotoquímicas, que têm como principal aplicação o tratamento do câncer, mas também tem sido estudada para tratar outras doenças não oncológicas, como a degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide crônica, micoses, infecções bacterianas, verrugas, aterosclerose, vírus e pragas agrícolas (NYMAN; HYNINEN, 2004; DICKSON; GOYAN; POTTIER, 2003; MAC DONALD; DOUGHERT, 2001; CALIN; PARASCA, 2006). Esta terapia utiliza um composto fotossensível, geralmente um corante, que tem ação apenas quando irradiado com uma luz laser. A absorção da luz por esse corante gera uma série de processos no sistema biológico que levam à apoptose ou necrose das células do tecido-alvo, sendo a morte celular induzida pelos radicais livres gerados no procedimento (TEDESCO, 2003 ;TEDESCO et al., 2004; MACHADO, 2006).

Como terapia para tratamento do câncer, a TFD possui características intermediárias entre a quimioterapia e a radioterapia, apresentando efeitos colaterais mínimos, pois apresenta maior seletividade e baixa invasividade. A maior seletividade decorre do fato da substância fotossensível se acumular preferencialmente nos tecidos doentes (OLIVEIRA, 2006), devido à formação de complexos intravasculares com lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Como ocorre maior concentração de receptores para esta lipoproteína na superfície das células neoplásicas, em

comparação com as células normais, há deposição preferencial dos fármacos fotossensibilizadores sobre este tecido (MICHELS; SCHMIDT-ERFURTH, 2003; RIBEIRO et al., 2007), de modo que a seletividade tumoral aumenta com o caráter lipofílico do agente fotossensibilizador (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; VIA; MAGNO, 2001). Por sua vez, a reduzida invasividade permite que o tratamento possa ser realizado diversas vezes no mesmo local.

O tratamento fotodinâmico tem início a partir da administração local ou endovenosa dos fármacos fotossensibilizadores que, após tempo pré-determinado, irá se acumular no tecido tumoral. Em seguida, o local é irradiado utilizando-se luz visível monocromática com o comprimento de onda adequado, geralmente na região do vermelho (OLIVEIRA, 2006) ou infravermelho próximo (RIBEIRO et al., 2007), a fim de que a radiação penetre efetivamente no tecido-alvo e ative a substância fotossensível (DE ROSA; CRUTCHLEY, 2002). Assim que o fármaco fotossensibilizador absorve a luz, vários processos fotofísicos ocorrem, de modo que o fotossensibilizador pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio localizadas próximas à região irradiada, gerando espécies reativas que oxidam biomoléculas e danificam o tecido irradiado (GORMAN et al., 2004; OLEINICK; VAN NOSTRUM, 2004; MORRIS, 2002), por meio de processos inflamatório e necrótico. Gerações novas de fármacos fotossensibilizadores agem por processo apoptótico (OLIVEIRA, 2006).

Os mecanismos de ação fotoquímicos e fotofísicos ocorrem devido à excitação do fotossensibilizador provocada pela irradiação luminosa, a partir do estado fundamental (S_0) para um estado eletrônico de maior energia, estado eletrônico singleto excitado (S_n), do qual pode retornar ao estado fundamental via processos radioativos ou não radioativos, ao estado singleto de menor energia (S_1). Em seguida, o fotossensibilizador no estado eletrônico singleto de menor energia (S_1) sofre uma transição para o estado tripleto excitado de menor energia (T_1) (FOOTE, 1991; MORRIS, 2002; GORMAN et al., 2004; OLEINICK; VAN NOSTRUM, 2004). O fotossensibilizador no estado tripleto excitado apresenta um tempo de vida maior do que no estado singleto excitado, em razão da transição $T_1 \rightarrow S_0$ (RIBEIRO et al., 2007) (Figura 4).

A TDF tem apresentado sucesso no tratamento de câncer de pele, tanto no estudo clínico coordenado por pesquisadores da Rede de Nanobiomagnetismo (MCT/CNPq) e do Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia (CNANO) da Universidade de Brasília no Hospital Regional da Asa Norte (HRAN) em Brasília (Lacava, informação pessoal), quanto fazendo parte da rotina clínica em alguns hospitais (ACKROYD et al., 2001; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Muitos agentes de uso tópico já são empregados na prática clínica e o desafio atual é criar novas formulações para que a TFD possa tratar tumores mais profundos (BOWN et al., 2004). Em acordo com este desafio, a associação de nanopartículas a agentes fotossensíveis tem demonstrado enorme potencial até mesmo contra cânceres cerebrais, que são agressivos e difíceis de tratar (GAO et al., 2006). Segundo DOLMANS, FUKUMURA e JAIN (2003), o agente pode continuar ligado de maneira estável à NPM durante a TFD, sem a necessidade de liberação local.

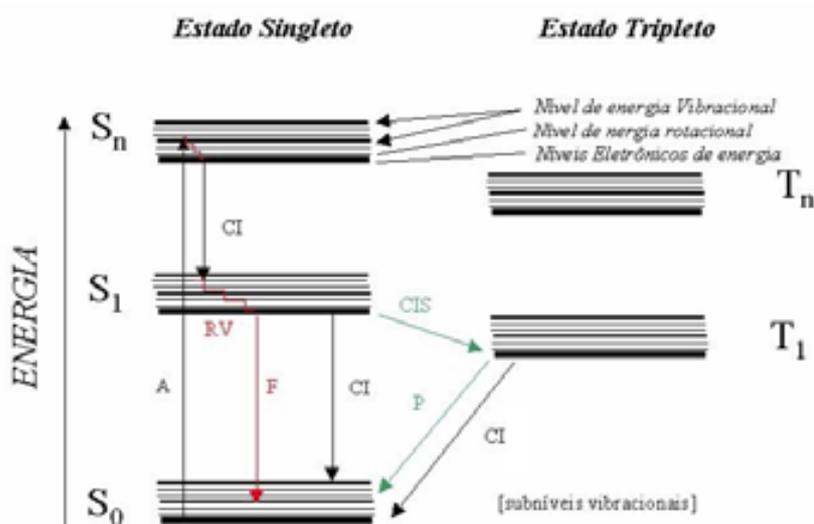


Figura 4: Diagrama de Jablonski modificado. (A) absorção de um fóton, (S₀) estado fundamental, (S_n) estado excitado singlete, (S₁) primeiro estado excitado singlete, (RV) relaxamento vibracional, (CI) cruzamento interno, (CIS) cruzamento intersistemas, (T_n) estado excitado tripleto.

A magnetohipertermia e a terapia fotodinâmica representam terapias promissoras no combate ao câncer (JORDAN, A. *et al.*, 1999; WUST *et al.*, 2002; TEDESCO, 2003 ;TEDESCO *et al.*, 2004), principalmente porque apresentam efeitos colaterais reduzidos em relação às terapias convencionais. A ação individualizada desses dois procedimentos com outras terapias oncológicas (DEGER *et al.*, 2002) tem sido pesquisada intensamente nos últimos anos. No entanto, poucos estudos têm sido realizados para avaliar a ação simultânea da TFD e da MHT.

Buscando conhecer os efeitos biológicos e terapêuticos relacionados à utilização conjunta da TFD e da MHT no tratamento de neoplasias, foi desenvolvido um novo material que se baseia em lipossomas de longo tempo de circulação (furtivos) contendo o fármaco fotossensibilizador zinco-ftalocianina e NPM de ferrita de cobalto recobertas com ácido cítrico. A escolha da ferrita de cobalto para compor esse conjugado ocorreu devido aos resultados de biodistribuição e biocompatibilidade favoráveis encontrados previamente (KÜCKELHAUS, 2003). Os testes biológicos serão realizados em camundongos saudáveis e em portadores de carcinoma ascítico de Erlich.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho visa investigar efeitos biológicos da administração da amostra de magnetolipossomas fotossensibilizados com zinco-ftalocianina ($ML_{PEG-ZnF}$) e sua eficiência nos processos de Magnetohipertermia (MHT) e Terapia Fotodinâmica (TFD) em camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar, por meio de testes biológicos (teste de micronúcleo, análise citométrica no sangue e peritônio, análise histológica de fígado, baço e pulmões e viabilidade de fagócitos peritoneais), os efeitos induzidos por $ML_{PEG-ZnF}$ e, como controle, de vários sistemas formados por seus constituintes: ML_{PEG} (magnetolipossomas furtivos), $L_{PEG-ZnF}$ (lipossomas furtivos associados ao ZnF) L_{PEG} (lipossomas furtivos);
- b) Avaliar, por meio de testes biológicos (teste de micronúcleo, análise citométrica no sangue e peritônio, análise histológica de fígado, baço e pulmões e viabilidade de fagócitos peritoneais), os efeitos induzidos por $ML_{PEG-ZnF}$, após submissão ao campo eletromagnético alternado (MHT) e/ou laser (TFD);
- c) Avaliar possível remissão tumoral em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich tratados com a amostra $ML_{PEG-ZnF}$, via intraperitoneal, e subsequentemente submetidos à MHT e/ou TFD.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Amostras

As amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas utilizadas neste trabalho foram: 1) FeCoML, lipossomas furtivos associados a nanopartículas magnéticas (NPM), constituindo os magnetolipossomas (Figura 05) utilizados para padronizar as condições de uso do equipamento gerador de campo magnético alternado (AC), 2) $ML_{PEG-ZnF}$, lipossomas furtivos associados a nanopartículas magnéticas e associados ao fotossensibilizador zinco-ftalocianina (ZnF); 3) ML_{PEG} , magnetolipossomas furtivos; 4) $L_{PEG-ZnF}$, lipossomas furtivos associados ao ZnF; e 5) L_{PEG} , lipossomas furtivos.

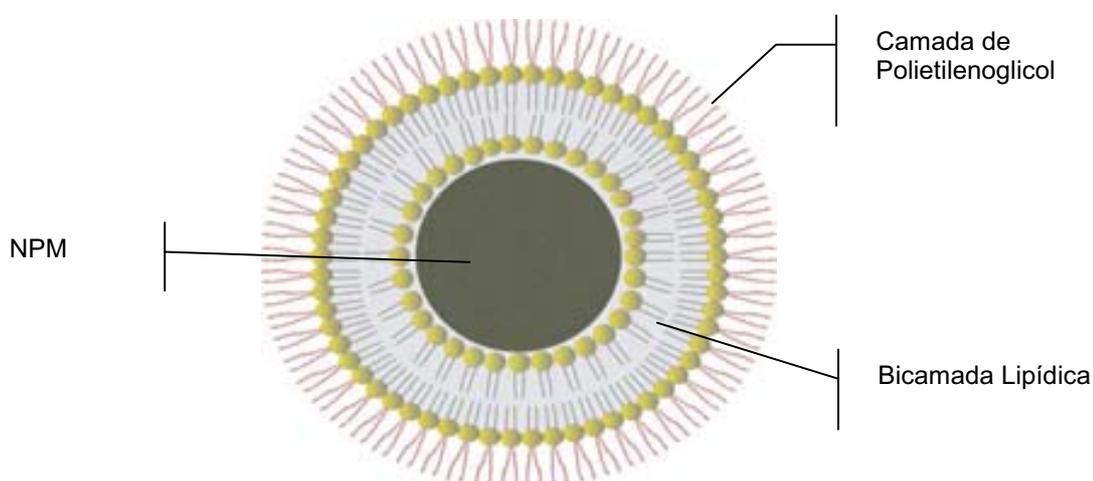


Figura 05: Representação esquemática de um magnetolipossoma furtivo, com o núcleo (região escura) constituído de uma nanopartícula magnética (NPM) encapsulada pela bicamada fosfolipídica.

As NPM utilizadas nas amostras magnéticas ($FeCoML$, $ML_{PEG-ZnF}$ e ML_{PEG}) foram sintetizadas no Instituto de Química da Universidade Federal do Goiás, UFG. As NPM são à base de ferrita de cobalto ($CoFe_2O_4$) obtidas por precipitação em solução

alcalina e estabilizadas pelo recobrimento com ácido cítrico, segundo técnica padrão de co-precipitação (GOETZE; GANSAU; BUSKE, 2002; TRONCONIA et al., 2004). As amostras lipossomais, associadas ou não às NPM e/ou ao ZnF foram produzidas no Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP (TEDESCO et al., 2004). Os lipossomas foram sintetizados a partir de L- α -dipalmitoil fosfatidil-colina (DPPC) e colesterol, associados moléculas de polietilenoglicol (PEG), semelhantemente ao processo de síntese já descrito na literatura (OLIVEIRA et al., 2006). Resumidamente, os magnetolipossomas foram preparados por um método que consiste na injeção (por uma bomba peristáltica de adição controlada) de uma solução etanólica de lipídio em volume adequado de fluido magnético (em meio orgânico) em tampão fosfato pH 7,4, contida em uma jaqueta termostaticada e com agitação magnética constante, com a finalidade de se obter a concentração final de partículas/ mL desejada. Os lipossomas contendo o fluido magnético ou o fluido magnético mais algum fármaco (p.ex.: agente fotossensibilizador; quimioterápico) são preparados por meio deste procedimento.

A concentração final de NPM na amostra FeCoML foi de $2,4 \times 10^{16}$ partículas / mL, e nas demais amostras, ML_{PEG}-ZnF e ML_{PEG}, utilizadas neste estudo foi de $4,8 \times 10^{14}$ partículas/mL.

3.1.2 Equipamentos

3.1.2.1 Eletromagnético

Para os testes biológicos com aplicação de AC foi utilizado equipamento gerador de campo eletromagnético de frequência alternada que opera com radiofrequência em 1 MHz, amplitude de campo de 40 Oe e intensidade de corrente elétrica de 1 A/m. O gerador do AC está acoplado a uma haste móvel com solenóide (Figura 6) (GUEDES et al., 2004).

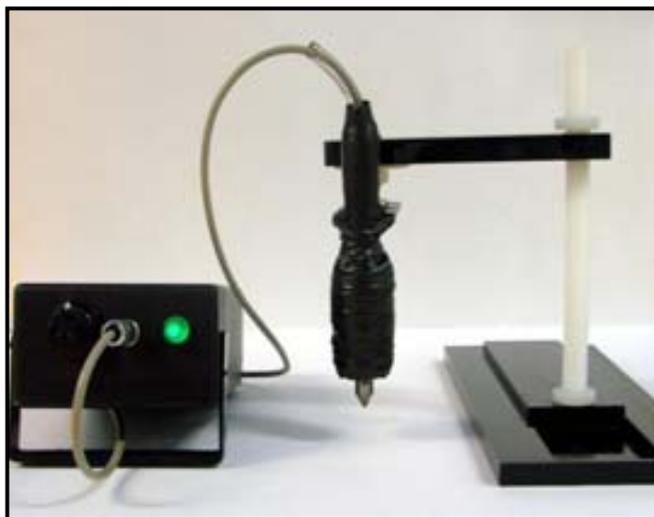


Figura 06: Aparelho gerador de campo eletromagnético alternado (PI 0204433-1).

3.1.2.2 Laser

Para os testes biológicos com exposição à luz foi utilizado sistema Laser Diodo da marca *BWF Light Source-Tech in*, com o comprimento de onda de 670 nm, acoplado a uma fibra ótica, operando a 80 mW de potência (Figura 7). Para experimentos *in vivo* foi utilizada uma energia total de $480 \text{ J/ cm}^2 / \text{ animal}$.

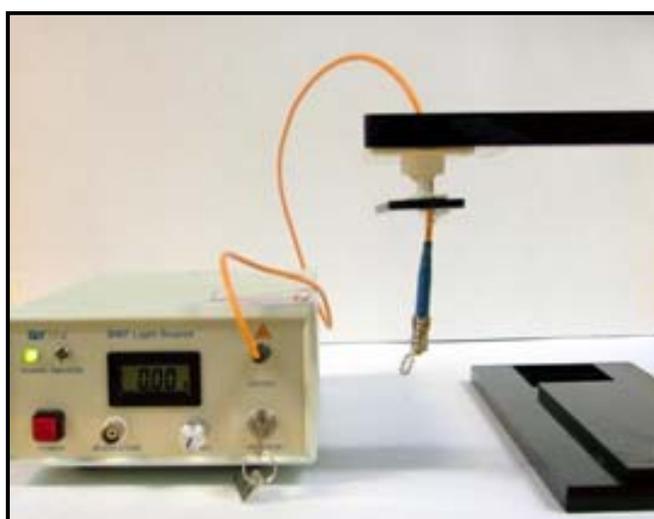


Figura 07: Aparelho emissor de *laser* (670 nm).

3.1.3 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss, não isogênicos, com idade aproximada de 60 dias e peso médio de 24-26 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Genética, UnB, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, em gaiola de plástico contendo serragem autoclavada, ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a um período de 10 dias de adaptação antes do início do experimento.

As normas para a prática científica da vivisseção de animais previstas pela Lei 6.638, de 08 de maio de 1979, e os princípios éticos no uso de animais de laboratório, determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) em 1991, foram cuidadosamente atendidos no desenvolvimento desta tese. O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

3.1.4 Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

3.1.4.1 Obtenção e transplante das células do TAE

As células TAE utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela profa. Rosane Nassar M. Guerra, do Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão.

Para manutenção das células no laboratório, 200 μ L contendo 2×10^6 células/mL, foram inoculadas, via IP, com auxílio de seringas de insulina em animais saudáveis. Esse procedimento foi repetido a cada 8 dias, por 60 dias.

As células tumorais utilizadas nesta fase experimental foram obtidas a partir de camundongos portadores do tumor que sofreram eutanásia por inalação, em câmara mortífera, de uma superdosagem de Éter Etílico P.A. (Dietílico), e em seguida foram

submersos em álcool 70% por cinco minutos. A seguir, sob condições estéreis, em capela de fluxo laminar, 5 mL do líquido ascítico foram retirados da cavidade abdominal e transferidos para um tubo Falcon de 15 mL contendo o mesmo volume de PBS pH 7,4. Após homogeneizar com auxílio de pipeta Pasteur descartável, o material foi centrifugado a 1000 rpm, por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em novos tubos Falcon estéreis contendo PBS, procedimentos estes repetidos mais duas vezes.

As células TAE foram contadas em hemocitômetro de Neubauer (Bright-Line Hemacytometer Sigma), utilizando-se os quadrantes laterais, e o desejado índice de 90% de viabilidade foi verificado pelo método de exclusão por azul de tripan a 0,4%, na proporção 1:1. As células que apresentaram coloração azul foram consideradas inviáveis. Após os testes de viabilidade e de contagem celular, as células tumorais de cada animal foram preparadas em PBS pH 7,4 de modo que tivessem concentração final de 2×10^6 células viáveis/mL. O volume de 0,3 mL da suspensão foi inoculado, via IP, para o desenvolvimento da forma ascítica e após 6 dias foram iniciados os tratamentos experimentais (DAGLI *et al.*, 1992; NASCIMENTO *et al.*, 2006).

3.2 Delineamento Experimental

A primeira etapa do estudo compreendeu a determinação das condições de funcionamento do equipamento gerador de AC, por meio do teste do micronúcleo (MN) e análise citométrica de sangue e do peritônio. Animais saudáveis foram inicialmente tratados com uma amostra de magnetolipossomas (FeCoML) previamente estudada (KÜCKELHAUS, 2003) e expostos ao campo durante 3, 5 ou 10 minutos. A coleta das amostras foi feita 30 minutos ou 24 horas após a exposição ao campo. O grupo controle não recebeu qualquer tratamento.

A segunda etapa teve como objetivo a avaliação da toxicidade das amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas em animais saudáveis, por meio do teste de MN, análise citométrica de sangue e peritônio, análise histológica de fígado, baço e pulmões e avaliação da viabilidade de fagócitos peritoneais. Os animais foram distribuídos em

três grupos com tratamento por: 1) $ML_{PEG-ZnF}$, 2) ML_{PEG} , e 3) L_{PEG} , e em dois grupos controles, sendo que em um deles os animais receberam tampão fosfato pH 7,4 e no outro não receberam qualquer tratamento.

A terceira etapa teve como objetivo a avaliação da toxicidade de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas em animais saudáveis submetidos ao AC (com as condições de uso determinadas na primeira etapa), por meio do teste de MN, análise citométrica de sangue e peritônio, análise histológica de fígado, baço e pulmões e avaliação da viabilidade de fagócitos peritoneais. Os animais foram distribuídos em três grupos com tratamento por: 1) $ML_{PEG-ZnF}$, 2) ML_{PEG} , e 3) L_{PEG} , e em dois grupos controles, tampão fosfato pH 7,4 e sem tratamento.

A quarta etapa teve como objetivo a avaliação da toxicidade de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas em animais saudáveis submetidos ao laser, por meio do teste de MN, análise citométrica de sangue e peritônio, análise histológica de fígado, baço e pulmões e avaliação da viabilidade de fagócitos peritoneais. Os animais foram distribuídos em três grupos com tratamento: 1) $ML_{PEG-ZnF}$, 2) $L_{PEG-ZnF}$, e 3) L_{PEG} e em dois grupos controles, tampão fosfato pH 7,4 e sem tratamento.

A quinta etapa teve como objetivo a avaliação da toxicidade da amostra $ML_{PEG-ZnF}$ em animais saudáveis submetidos ao AC e ao laser, por meio do teste de MN, análise citométrica de sangue e peritônio, análise histológica de fígado, baço e pulmões e avaliação da viabilidade de fagócitos peritoneais. Os animais foram distribuídos em grupo experimental ($ML_{PEG-ZnF}$) e grupo controle (Tampão Fosfato pH 7,4).

Para realizar os testes das etapas 2 a 5, as amostras biológicas foram coletadas em cinco diferentes tempos após os respectivos tratamentos: 30 minutos, 6 horas, 1, 2 e 7 dias, exceto para o teste do micronúcleo, para o qual os tempos de análise foram 1, 2 e 7 dias após tratamentos.

Nas etapas de 1 a 5, os grupos foram constituídos por cinco animais ($n = 5$), exceto para a análise histológica, com três animais ($n=3$).

A sexta etapa visou verificar a possível remissão tumoral em animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich que receberam injeção da amostra de $ML_{PEG-ZnF}$ e foram em seguida submetidos à MHT e/ou TFD, por meio da avaliação de viabilidade celular, contagem de células claras e escuras, contagem diferencial de leucócitos, avaliação

das regiões organizadoras de nucléolos (AgNORs), peso corpóreo, volume ascítico e sobrevida. Os animais foram distribuídos em um grupo de tratamento com $ML_{PEG-ZnF}$ e um grupo controle (tampão fosfato pH 7,4). Para a maioria dos testes desta etapa, cada grupo experimental possuía sete animais ($n = 7$). Mas, para a análise da sobrevida e da avaliação do peso corporal, o tamanho amostral foi de dez animais ($n=10$).

3.3 Metodologia

3.3.1 Tratamentos

3.3.1.1 Determinação do tempo de exposição ao campo magnético (AC)

Animais foram tratados com dose única de $100\mu\text{L}$ ($2,4 \times 10^{16}$ partículas / mL) de FeCoML (KÜCKELHAUS, 2003), via intraperitoneal (IP). A dose administrada foi definida por meio da DL50. Após serem devidamente anestesiados com éter etílico P.A. (Dietílico), os camundongos foram submetidos ao AC por 3, 5 ou 10 minutos (GUEDES, 2005). O grupo controle não foi submetido a qualquer tratamento. As análises foram realizadas 30 minutos e 24 horas após submissão ao AC.

3.3.1.2 Tratamento com amostras

Para os estudos das fases 2 a 5, os animais foram tratados, via IP, com $100\mu\text{L}$ ($4,8 \times 10^{14}$ partículas / mL) em dose única de $ML_{PEG-ZnF}$, ML_{PEG} , $L_{PEG-ZnF}$ ou L_{PEG} . A dose administrada foi definida por meio da DL50 em teste piloto. Foram também analisados dois grupos controle: (1) animais que receberam dose única ($100\mu\text{L}$) de Tampão Fosfato (pH 7,4) e (2) animais que não receberam qualquer tratamento (controle negativo). As análises foram realizadas em tempos variados após a administração da amostra, de acordo com cada teste realizado.

Para estudo da fase 6, os animais portadores de TAE receberam, via IP, três doses de ML_{PEG}-ZnF, contendo 100µL de amostra por dose, com intervalos de 48 horas entre as injeções. A coleta de material para análise foi obtida uma hora após o último tratamento realizado.

3.3.1.3 Tratamento por exposição ao AC

Para aplicação de AC, os animais tratados com suas respectivas amostras, foram sedados com éter etílico P.A. (Dietílico) nas duas primeiras fases do estudo (ver item 3.4) ou com anestesia dissociativa, via subcutânea, de quetamina / xilazina, em doses de 15mg/kg e 5mg/kg, respectivamente, na terceira e quarta fases experimentais (ver item 3.4). A exposição ao campo foi realizada com os animais posicionados em decúbito dorsal, sem necessidade de abertura abdominal. A bobina, que é o ponto de concentração do campo eletromagnético, foi colocada junto à pele do abdômen do animal. O tempo de exposição ao campo foi de três minutos.

3.3.1.4 Tratamento por exposição ao laser

Para aplicação do laser, os animais, tratados com suas respectivas amostras na quarta e quinta etapas experimentais (ver item 3.4), foram sedados com anestesia dissociativa, via subcutânea, de quetamina / xilazina, em doses de 15mg/kg e 5mg/kg, respectivamente, e foram tricotomizados na região abdominal com a finalidade de reduzir barreiras à penetração da luz. A irradiação foi realizada com os animais posicionados em decúbito dorsal, sem abertura abdominal. A extremidade da fibra ótica foi colocada junto à pele do abdômen do animal em quatro pontos distintos, de modo a formar um quadrante. O tempo de submissão ao laser em cada vértice do quadrante foi de 5 minutos, totalizando 20 minutos de exposição. A intensidade de irradiação foi de 24 J/cm³ por minuto.

3.3.1.5 Exposição ao campo magnético e ao laser

Grupos pré-definidos das etapas 2 e 3, 30 minutos após terem recebido a administração das amostras, foram submetidos ao AC (3 minutos) e, logo em seguida, ao laser (20 minutos), com intervalo aproximado de um minuto entre os dois tratamentos. Os animais receberam anestesia dissociativa, em doses de 15mg/kg e 5mg/kg, respectivamente, via subcutânea, e também foram tricotomizados na região abdominal.

Os animais portadores de TAE da fase 6, que foram submetidos ao tratamento de magnetohipertermia (MHT) e terapia fotodinâmica (TFD), receberam 100µL de ML_{PEG}-ZnF, via IP, e 30 minutos após a aplicação foram submetidos ao AC (3 minutos) e ao laser (20 minutos), com intervalo de aproximadamente um minuto entre as exposições. Como este grupo recebeu três aplicações da amostra, após cada injeção os animais eram novamente submetidos aos procedimentos de MHT e TDF.

3.4 Estudos *in vivo*

3.4.1 Análise Citométrica

A análise citométrica é um teste rápido e não dispendioso que permite a análise das populações de células responsáveis pela defesa do organismo, permitindo verificar a indução e a severidade de eventuais processos inflamatórios provocados em diferentes situações.

A análise citométrica de células leucocitárias do sangue periférico envolveu contagem global e diferencial, e a do fluido peritoneal, apenas a contagem diferencial.

Para a efetivação destas contagens foram retirados, por meio de punção cardíaca, 400 µL de sangue de cada animal devidamente anestesiado com éter etílico P.A. (Dietílico). O sangue obtido foi misturado a 10 µL do anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético bipotássico) a 10% em tubos Ependorff. Posteriormente, os animais foram eutanizados por deslocamento cervical.

3.4.1.1 Contagem global de leucócitos

Para a realização da contagem global de leucócitos, 20 µL de sangue periférico foram colocados em tubos Ependorff contendo 400 µL de líquido diluidor, o líquido de Turk (composto por 2 mL de ácido acético glacial, 1 mL da solução de azul de metileno 1% e 97 mL de água destilada), obtendo-se uma diluição de 1:21, segundo metodologia de LIMA et al. (1987) modificada. O material foi homogeneizado lentamente por inversão durante dois minutos. Posteriormente, 10 µL do homogeneizado foram colocados em hemocitômetro de Neubauer espelhado (Bright-Line Hemacytometer Sigma). Aguardou-se um minuto para que houvesse sedimentação das células, e em seguida o material foi analisado em microscopia de luz (400×), contando-se a quantidade de células leucocitárias contidas nos quatro retículos laterais. A frequência foi calculada pela fórmula leucocitária geral para expressar o total de células por microlitro:

$$\text{número de leucócitos / mm}^3 = \frac{L}{r} \times \text{FD} \times \text{PC}$$

Onde:

L = número de Leucócitos contados nos quatro retículos

r = número de retículos contados

FD = fator de diluição (21)

PC = Profundidade da câmara (10^4)

3.4.1.2 Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico

Foram preparadas distensões do sangue periférico em lâminas de vidro. O material secou ao ar em temperatura ambiente por 24 horas, sendo posteriormente

fixado com álcool metílico P.A por cinco minutos e corado com Wright-Giemsa (TOLOSA et al., 2003) em tampão fosfato pH 6.8, por 6 minutos. Foram analisadas 500 leucócitos por lâmina para determinação da frequência das populações de monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. A análise foi realizada em microscópio de luz (1000×), em teste cego. Para este estudo foram observadas as recomendações propostas por BAIN (2004), a fim de evitar distorções na frequência dos leucócitos causadas pela má distribuição das células e por produtos artefatuais.

3.4.1.3 Contagem diferencial de leucócitos no fluido peritoneal

A coleta da amostra para contagem diferencial de leucócitos da cavidade peritoneal foi feita por meio de suave compressão e esfregaço de uma lâmina de vidro, limpa e seca, sobre as alças intestinais delicadamente revolvidas, após abertura do abdômen. O material secou ao ar em temperatura ambiente por 24 horas, sendo posteriormente fixado com álcool metílico P.A. e corado com Wright-Giemsa (TOLOSA et al., 2003) em tampão fosfato pH 6.8, por 6 minutos. Foram contadas 500 células por lâmina diferenciando macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos de cada animal. A análise foi realizada em microscópio de luz (1000×), em teste cego.

3.4.2 Viabilidade Celular

3.4.2.1 Viabilidade de células peritoneais

A análise da mortalidade celular na cavidade peritoneal possibilitará a avaliação do potencial tóxico das amostras. Simultaneamente, a análise de células viáveis poderá fornecer possível migração celular.

Para a realização desse teste, os animais das fases 1 a 3 foram eutanizados por deslocamento cervical. Cada animal recebeu, por meio de uma incisão de

aproximadamente um milímetro, 10 mL de solução gelada (4°C) de tampão fosfato pH 7,2. Esta solução foi pipetada sucessivas vezes na cavidade peritoneal (trinta segundos), com auxílio de uma pipeta plástica descartável. A seguir, 8 mL da solução contendo células peritoneais foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL e imediatamente centrifugados, por 5 minutos, a 1000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensado em 1 mL de tampão PBS. Deste, 40µL foram transferidos para tubos Ependorff contendo 160µL de solução de nigrosina a 0,05% em PBS, um corante supravital do tipo aniônico que não penetra em células vivas (TOSTA, 1992). Uma alíquota de 10µL do homogeneizado foi analisada em hemocítmetro de Neubauer espelhado (Bright-Line Hemacytometer Sigma). Segundo TOSTA (1992), as células consideradas viáveis se apresentam brilhantes, e as inviáveis, as que apresentam variações de cor do cinza ao preto (TOSTA, 1992).

3.4.2.2 Viabilidade de células do fluido ascítico

Para a contagem das células viáveis e inviáveis, o líquido ascítico retirado da cavidade abdominal, após mensuração do volume, foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL, ao qual foi acrescentado o mesmo volume de tampão fosfato pH 7,4. Após homogeneizar com auxílio de pipeta Pasteur descartável, o material foi centrifugado a 168 g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em novos tubos Falcon estéreis contendo 1mL de tampão fosfato pH 7,4. Em seguida, uma alíquota de 100 µL das células ressuspensas foi retirada e colocada em tubo Ependorff contendo 900 µL de tampão fosfato pH 7,4 (diluição nº 1 = 1:10); uma alíquota de 100 µL desta diluição nº 1 foi retirada e colocada em tubo Ependorff contendo 900 µL de tampão fosfato pH 7,4 (diluição nº 2 = 1:100). Em todas as etapas houve cuidado na homogeneização das amostras. Por fim, 40 µL da diluição nº 2 foram retirados e colocados em tubo Ependorff contendo 160 µL de nigrosina a 0,05%. As células foram contadas em hemocítmetro de Neubauer espelhado (Bright-Line Hemacytometer Sigma). Foram consideradas viáveis as células que se

apresentaram brilhantes, e inviáveis, as que apresentavam variações de cor do cinza ao preto (TOSTA, 1992).

3.4.2.3 Cálculo da Viabilidade Celular

O cálculo da viabilidade de células peritoneais foi feito mediante a fórmula abaixo que expressa a porcentagem de células viáveis ou de inviáveis:

$$C = \frac{n}{r} \times FD \times PC$$

Onde:

C = Porcentagem de células viáveis ou inviáveis

n = número de células contadas

r = número de retículos laterais contados

FD = fator de diluição (5)

PC = Profundidade da câmara (10^4)

3.4.3 Análise Genotóxica e Citotóxica

A avaliação da mutagenicidade e da citotoxicidade foi realizada por meio do teste do micronúcleo (MN) em eritrócitos da medula óssea (SCHMID, 1975). Os micronúcleos (MN) são pequenas inclusões de material nuclear dentro do eritrócito. Estas inclusões podem ser constituídas por cromossomos inteiros ou pedaços cromossômicos envoltos por membrana nuclear, formados espontaneamente ou pelos efeitos de agentes clastogênicos ou aneugênicos. Enquanto as substâncias clastogênicas provocam

quebras nas moléculas de ADN, as aneugênicas induzem perdas cromossômicas devido a interferências na formação e/ou ligação do fuso mitótico.

Durante o processo de maturação, os eritrócitos expulsam seus núcleos, de forma que a presença de MN retidos no citoplasma é indicativa de dano genético. O potencial genotóxico de um agente é medido por sua capacidade de aumentar a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPC - células jovens contendo ARN no citoplasma) de animais tratados, quando comparada ao controle sem tratamento (GUIDELINE OPPTS, 2008) (Figura 8).

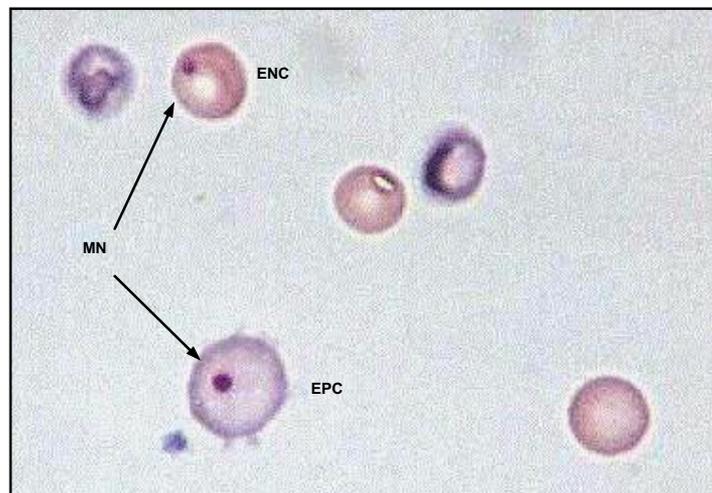


Figura 8: Micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromático (ENC).

O teste do micronúcleo ainda permite avaliar a citotoxicidade do agente na medula óssea por meio da análise do percentual de EPC (% EPC) em relação ao total de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (ENC - células maduras contendo hemoglobina no citoplasma) contados. A toxicidade é indicada por uma redução significativa na percentagem dos eritrócitos policromáticos. O %EPC foi calculado pela fórmula:

$$\%EPC = \frac{EPC}{EPC + ENC} \times 100$$

Para realização do teste, logo após os animais serem eutanizados por deslocamento cervical em tempos variados após tratamentos (1, 2 e 7 dias), os fêmures foram removidos e uma das epífises cortadas. Em seguida, a medula óssea foi coletada com 1 mL de soro fetal bovino (SFB) e transferida para um tubo Falcon de 15 mL. O material foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 168 g. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspensão em 300µL de SFB e uma gota deste homogeneizado foi distendida em lâmina de vidro. O material secou ao ar e em temperatura ambiente por 24 horas, sendo posteriormente fixado com álcool metílico P.A. e corado com Giemsa (TOLOSA et al., 2003) em tampão fosfato pH 6.8, na proporção 1:14, por 6 minutos. Foram analisados 4000 eritrócitos, 2000 policromáticos (EPC) e 2000 normocromáticos (ENC), em microscópio de luz (1000×). Para o cálculo da citotoxicidade foi registrado o número de eritrócitos EPC ou ENC quando a outra população de células (EPC ou ENC) atingia a contagem de 2000.

Foi incluído um grupo controle-positivo para a genotoxicidade em EPC, utilizando-se ciclofosfamida (CF) (40 mg/Kg), para assegurar que o teste estava sendo realizado de acordo com os padrões estabelecidos pela técnica. A ciclofosfamida é uma substância reconhecidamente genotóxica por causar quebras na molécula de DNA (clastogênica).

3.4.4 Análise Histológica

O objetivo da avaliação histológica é observar possíveis alterações na estrutura tecidual de um órgão, em particular devido à ação do tratamento pelo qual o animal é submetido. As alterações podem ser caracterizadas como infiltrados inflamatórios, espessamento do parênquima, necrose, fibrose, entre outros.

Os animais dos grupos experimentais e controles foram eutanizados por deslocamento cervical em tempos variados após os tratamentos.

A cavidade abdominal foi exposta com auxílio de instrumentos cirúrgicos e fragmentos do fígado, baço e pulmão foram coletados. Imediatamente os órgãos foram mergulhados em solução salina 0,9% para retirar o excesso de sangue e transferidos

para um recipiente contendo o fixador *Davison*, no qual permaneceu por 10 horas a 4°C. O fixador *Davison* é constituído por uma solução contendo 40 mL de glicerina, 80 mL de formol a 37%, 114 mL de álcool absoluto e 126 mL de água mili-Q. No momento exato em que a solução vai ser utilizada, 1 mL de ácido acético glacial para cada 9 mL da solução é acrescentado (TOLOSA et al., 2003).

Em seguida, as peças foram desidratadas à temperatura ambiente pela troca do fixador por concentrações crescentes de álcool a 70, 80 e 90%, durante uma hora em cada, e 3 banhos de uma hora em álcool 100%. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados por meio de banhos em solução de álcool/xileno 1:1 (1 hora), seguido de três banhos de xileno P.A. (40 minutos / cada). Em continuidade, os fragmentos foram submetidos a três banhos de parafina (1 hora cada) em estufa a 56°C, e após o último banho, cada fragmento foi incluído em bloco de parafina (TOLOSA et al., 2003).

Secções com 5 µm de espessura foram produzidas por meio do micrótomo (Leica RM2125RT) e foram montadas em lâminas de vidro. Foram coletados cortes histológicos em três diferentes planos, originando três lâminas cada um: o inicial, o intermediário e o final. Foram descartados dez cortes entre cada plano de coleta. As lâminas prontas foram colocadas em estufa a 37°C para aumentar a aderência do corte à lâmina.

Uma lâmina de cada plano de corte foi corada pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE) ou método de Perls (TOLOSA et al., 2003).

O material foi analisado em microscópio de luz (100×, 200×, 400× e 1000×), procurando avaliar o padrão histológico do tecido e identificar a presença de NPM. Micrografias ilustrativas dos resultados foram feitas em microscópio Axioskop (Zeiss), com objetivas variadas.

3.4.5 Regiões organizadoras de nucléolo argentafins (AgNOR)

A técnica de AgNOR é um método histoquímico que evidencia as Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs), sendo considerado um bom marcador de

proliferação celular e conseqüentemente útil na avaliação de malignidade (TRERÈ, 2000; FILIPPIN et al., 2006; SILVA et al., 2007).

As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram descritas primeiramente por HEINTZ (1931) e por MCCLINTOCK (1934) (DERENZINI, 2000), como sendo as regiões marcadas de cromatina em torno da qual, no fim da telófase, o nucléolo torna ser formado após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula. Estas regiões correspondem a regiões do DNA que possuem genes de RNA ribossômico.

As NORs podem ser facilmente identificadas em microscópio convencional mediante a impregnação por prata coloidal (AgNOR), que promove a ligação da prata coloidal às proteínas acídicas, não histônicas, associadas às NOR (KHAN et al., 1993 apud RIVERO; AGUIAR, 2002).

PLOTON et al. (1986) descreveram uma técnica para a demonstração das NORs que foi aplicada em secções histológicas e em esfregaços celulares. A técnica conhecida como AgNOR possibilita a visualização das NORs, na microscopia de luz, como estruturas redondas intranucleares de cor marrom-café (AUBELE et al., 1994; Trerè, 2000) (Figura 9).

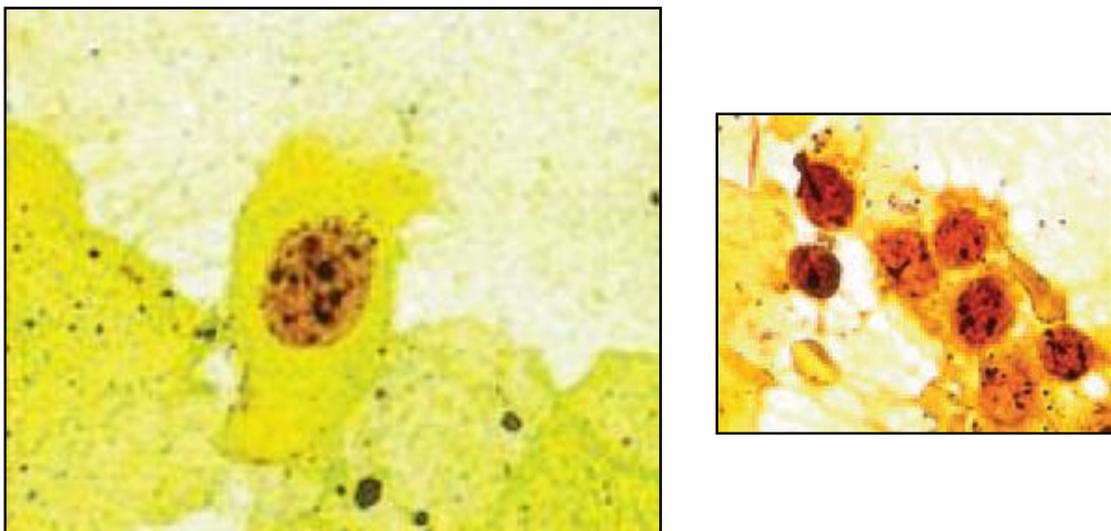


Figura 9: Amostras citológicas de epitélio cervical uterino corado pela prata. O número de pontos AgNOR corados em marrom café em numero crescente conforme a gravidade da lesão (FILIPPIN et al., 2006).

3.4.5.1 Técnica de AgNOR

Após coleta do fluido ascítico (TAE) foi confeccionado esfregaço em duas lâminas de vidro. O material secou ao ar e em temperatura ambiente por 2 horas, sendo posteriormente fixado com álcool metílico P.A por cinco minutos e as lâminas foram coradas com a técnica de AgNOR.

A solução aquosa de gelatina (solução coloidal) foi preparada pela dissolução de 0,5 g de gelatina e 25 mL de água mili-Q, em meio aquecido e pelo acréscimo de 0,25 mL de ácido fórmico a 1%, em água mili-Q (solução reveladora), depois de resfriada. A solução de nitrato de prata foi preparada pela dissolução de 1 g de cristais de nitrato de prata em 2 mL de água mili-Q, filtrada e acondicionada em frasco escuro, para evitar a oxidação do nitrato de prata. No momento do uso, a solução final de coloração foi preparada pela mistura das soluções reveladora e de nitrato de prata, na proporção de 1:2.

A seguir, gotas da solução final foram adicionadas ao esfregaço até cobri-lo completamente. As lâminas foram colocadas em banho-maria a 62°C por 15 minutos, sobre um suporte de maneira que não tocassem a água; até a obtenção de coloração marrom-dourado na superfície do esfregaço. As lâminas foram enxaguadas em água destilada e secas ao ar. Depois de coradas, permaneceram ao abrigo da luz até o momento da análise por microscopia de luz (TRERÈ, 2000; FILIPPIN et al., 2006).

3.4.6 Avaliação das células claras e células escuras

A classificação das células do TAE em claras e escuras, de acordo com sua morfologia, foi proposta por SILVA (2003). Foi sugerido que os vacúolos citoplasmáticos das células claras indicam algum tipo de atividade secretora, levando a maior produção de líquido ascítico, o que é produzido em menor escala pelas células escuras.

As células claras mostram-se com citoplasma abundante, eosinofílico e com muitos vacúolos; os núcleos apresentam-se grande, e às vezes essas células são multinucleadas. Por outro lado, as células escuras são arredondadas e apresentam

citoplasma reduzido, basofílico, poucos vacúolos e bordas definidas; os núcleos são hipercromáticos e, em sua maioria, ovais (SILVA et. al., 2007; VERÇOSA-JÚNIOR et al., 2006) (Figura 10).

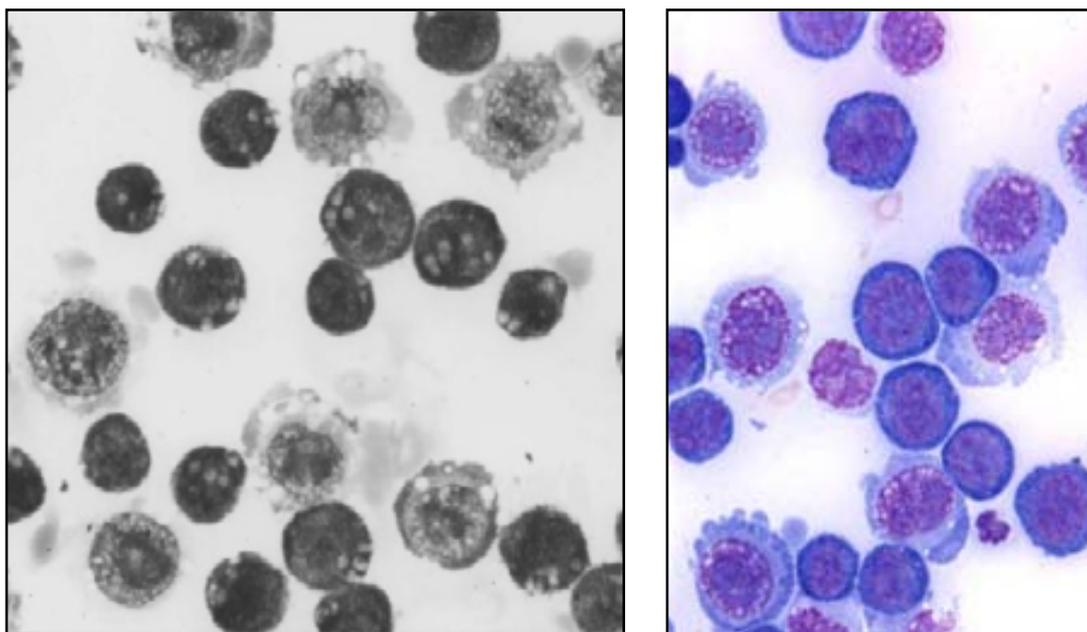


Figura 10: Esfregaços de células do líquido ascítico do tumor de Ehrlich em camundongos fêmeas: a) células coradas com kit panótico (FREITAS et al., 2006) e b) células coradas com Giemsa.

Para avaliação de células claras e células escuras, os animais foram eutanizados por deslocamento cervical, o fluido ascítico (TAE) foi coletado e foram confeccionado esfregaços em duas lâminas de vidro. O material secou ao ar e em temperatura ambiente por 2 horas, sendo posteriormente fixado com álcool metílico P.A por cinco minutos e coradas com Giemsa. Foram contadas as células claras e células escuras em 200 células em cada lâmina.

3.4.7 Qualidade do líquido ascítico no tumor de Ehrlich

Durante a mensuração do volume do fluido ascítico produzido em cada animal, foi avaliado o grau de hemorragia, segundo FUKUMASU (2007), estabelecidos como 0 (amarelo túrgido), 1 (rosa claro), 2 (avermelhado) e 3 (vermelho intenso), de acordo com a quantidade de eritrócitos presentes (Figura 11).

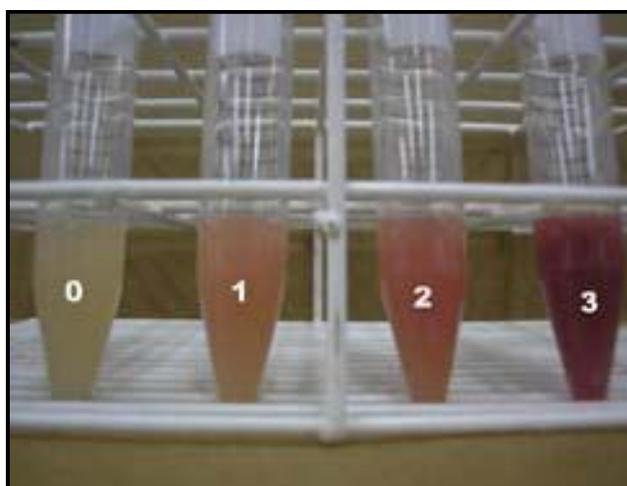


Figura 11: Graus de hemorragia. (FUKUMASU, 2007).

3.4.8 Peso dos animais portadores do TAE

O peso dos animais da etapa 6 foi determinado em balança digital (OHAUS A560) com o objetivo de determinar a alteração de peso médio e possível progressão tumoral. As pesagens foram registradas em cinco momentos diferentes: no dia da implantação das células neoplásicas (TAE) e antes de cada um dos tratamentos com a amostra (ML_{PEG}-ZnF) e com as terapias (MHT e/ou TFD), que foram em número de três.

3.4.9 Volume do líquido ascítico dos animais portadores do TAE

Após a coleta sanguínea, foi realizada eutanásia por deslocamento cervical, incisão da linha alba e então, com auxílio de uma pipeta de Pasteur descartável, foi coletado todo o líquido ascítico da cavidade abdominal, sendo este colocado em proveta graduada para mensuração do volume.

3.4.10 Análise do tempo de vida dos animais portadores do TAE

Para avaliação da sobrevida dos animais portadores de TAE foi anotada diariamente a ocorrência da morte dos mesmos, o que possibilita o preparo de uma curva de mortalidade. O ponto final do experimento foi determinado pela morte espontânea dos animais.

A mediana do tempo de sobrevida dos animais (Median Survival Time - MST) e a porcentagem de aumento do tempo de sobrevida (% ILS - *percentage Increase in Life Span*) foram avaliadas até que o último animal morresse espontaneamente. A MST foi calculada por meio do programa estatístico MedCalc® versão 9.4.2.0, e a % ILS foi calculada usando-se a equação descrita por GUPTA et al. (2000):

$$\% \text{ ILS} = \frac{\text{MST grupo tratado}}{\text{MST grupo controle}} \times 100 - 100$$

De acordo com GUPTA et al (2004) e FONSECA (2006), se o valor do %ILS exceder 25%, tem-se um indicativo de que o tratamento possui uma atividade antitumoral significativa.

3.4.11 Análise Estatística

Na etapa 1, a avaliação da diferença dos parâmetros testados entre os grupos na análise citométrica de sangue periférico e do peritônio, foi aplicado o método de análise de variância (ANOVA) empregando-se o teste “Fisher’s PLSD”. E para determinar o grau de cito- e genotoxicidade da amostra foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney, que se aplica a amostras pequenas e independentes, correlacionando-as duas a duas. O nível de significância adotado nestes testes foi de 5% ($p < 0,05$).

Os testes da etapa 1 foram realizados com auxílio do *software* de estatística STATISTICA[®] versão 0.99.

Para verificar a diferença das médias entre os diferentes tratamentos das etapas 2 a 5, foi aplicado o teste ANOVA *two-way* (*output* General Linear Model).

Para verificar a diferença das médias entre os diferentes tratamentos da etapa 6, foi aplicado o teste ANOVA *one-way* (*output* General Linear Model). As variáveis dos testes de viabilidade das células do fluido ascítico e de AgNOR foram testadas quanto ao tipo de distribuição por meio do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar a homogeneidade de variâncias, foi utilizado o teste de Levene. E para avaliar o grau de hemorragia nos diferentes grupos tratados foi realizado o testes do qui-quadrado (χ^2) (*output* General Linear Model).

Os *post-tests* utilizados em todas as avaliações estatísticas foram o de Tukey, quando as variâncias eram homogêneas ou o de Tamhane’s T2, no caso contrário. (SPSS 16.0).

A sobrevivência dos camundongos foi avaliada usando-se a curva Kaplan-Meier e o teste estatístico Log-rank para comparar as curvas obtidas.

O nível de significância adotado nos testes foi de 5% ($p < 0,05$). Os testes foram realizados com auxílio dos *softwares* de estatística SPSS[®] versão 16.0 e MedCalc[®] versão 9.4.2.0.

4 Resultados

4.1 Etapa 1 - Determinação do tempo de exposição ao campo magnético (AC) em animais expostos a amostra de magnetolipossomas (FeCoML)

Para determinar o tempo de exposição ao AC que não apresentasse efeitos pró-inflamatórios ou atividade genotóxica e citotóxica, ainda que na presença de uma amostra magnética, foram utilizadas as análises citométricas do sangue periférico e do fluido peritoneal, além do teste do micronúcleo (MN), cujos resultados estão descritos a seguir (Figuras 12 e 13).

4.1.1 Análise Citométrica

4.1.1.1 Análise citométrica do sangue periférico

A análise citométrica do sangue periférico revelou que os resultados foram dependentes do tempo de exposição ao AC (Figura 12). Nas coletas de células realizadas 30 minutos após a exposição, alterações significativas foram observadas apenas após 5 minutos de exposição (aumento de monócitos), tendo sido mais expressivas com 10 minutos de exposição (aumento de monócitos e de neutrófilos), embora a contagem global não tenha apresentado alterações em todos os tempos experimentais. Nas coletas de células realizadas 24 horas após a exposição, alterações significativas foram observadas após 10 minutos de exposição (aumento na contagem global e nas populações de linfócitos e de neutrófilos). Os dados mostram, portanto, que o tempo de coleta de células após a exposição ao AC também altera os resultados (comparar Figuras 12A e 12B). Qualquer que tenha sido o tempo de coleta após a exposição, alterações não foram observadas até 3 minutos de exposição ao AC.

4.1.1.2 Análise citométrica do fluido peritoneal

No peritônio, as análises realizadas 30 minutos após a exposição ao AC não mostraram alterações significativas nas populações diferenciais de leucócitos (linfócitos, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos) em qualquer um dos tempos de exposição ao AC (Figura 13A). Contudo, 24 horas após a exposição de 5 minutos e 10 minutos ao AC, ocorreram alterações significativas nas populações de macrófagos (diminuição) e neutrófilos (aumento) (Figura 13B). Assim como observado no sangue, três minutos de exposição ao AC não induzem alterações significativas na citometria peritoneal.

4.1.2 Análise genotóxica e citotóxica

O teste de micronúcleo mostrou que o tratamento com a amostra FeCoML e subsequente exposição ao AC não induziu aumento na frequência de micronúcleos de eritrócitos normocromáticos em nenhum tempo experimental (dados não apresentados). Também não foi observado aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos após o tratamento com FeCoML e da exposição ao AC por três e cinco minutos (Tabela 1). No entanto, após 10 minutos de exposição ao AC, a frequência de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos aumentou, ficando similar aos valores observados nos animais tratados com Ciclofosfamida que constituíam o grupo controle positivo. Nesse mesmo grupo experimental houve redução significativa na porcentagem de eritrócitos policromáticos (%EPC) (Tabela 1), sugerindo atividade citotóxica.

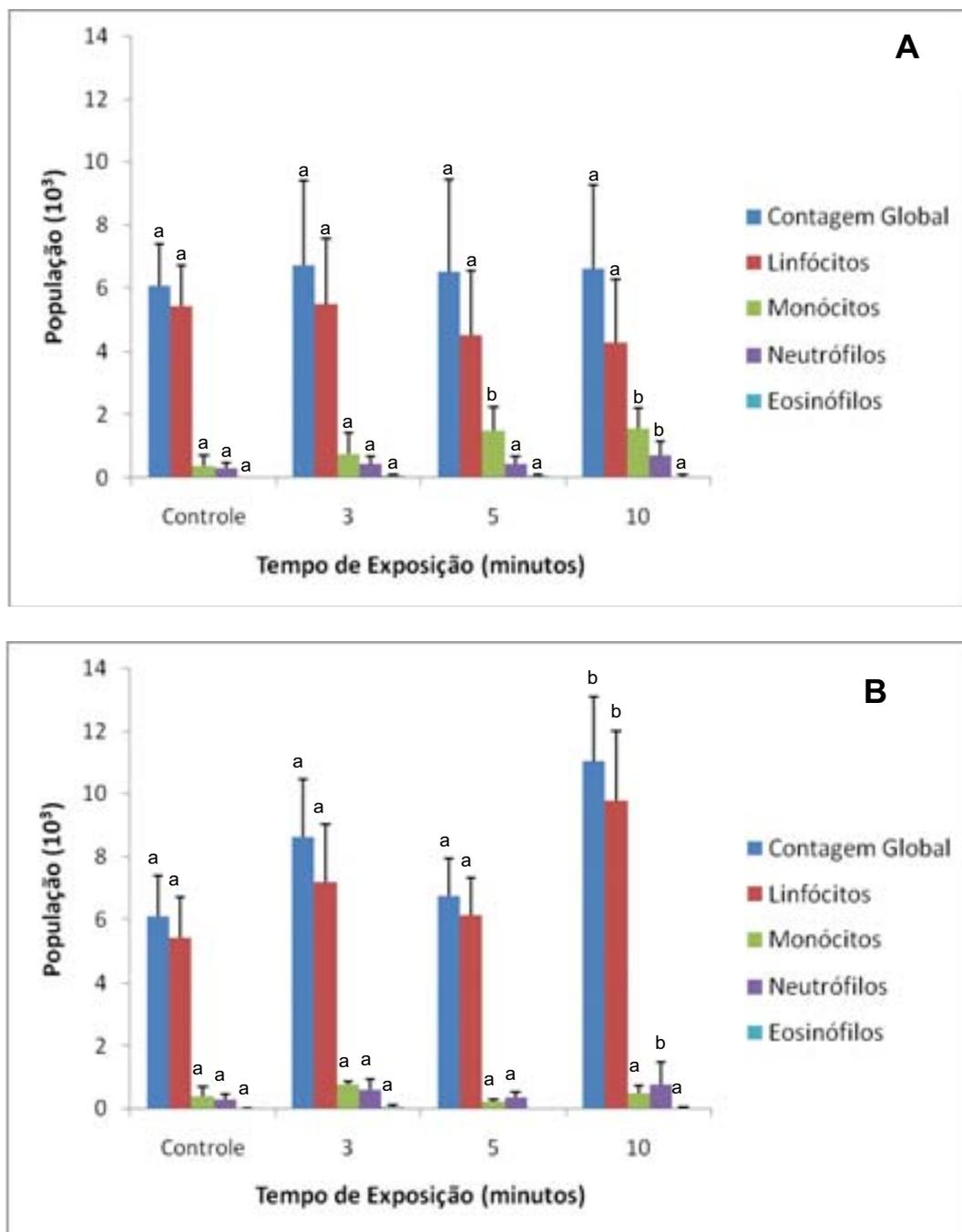


Figura 12: Efeitos do campo magnético (AC) sobre a freqüência de leucócitos no sangue de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de FeCoML. (A) Células obtidas 30 minutos e (B) 24 horas após a exposição ao campo magnético (AC). ♦ = Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

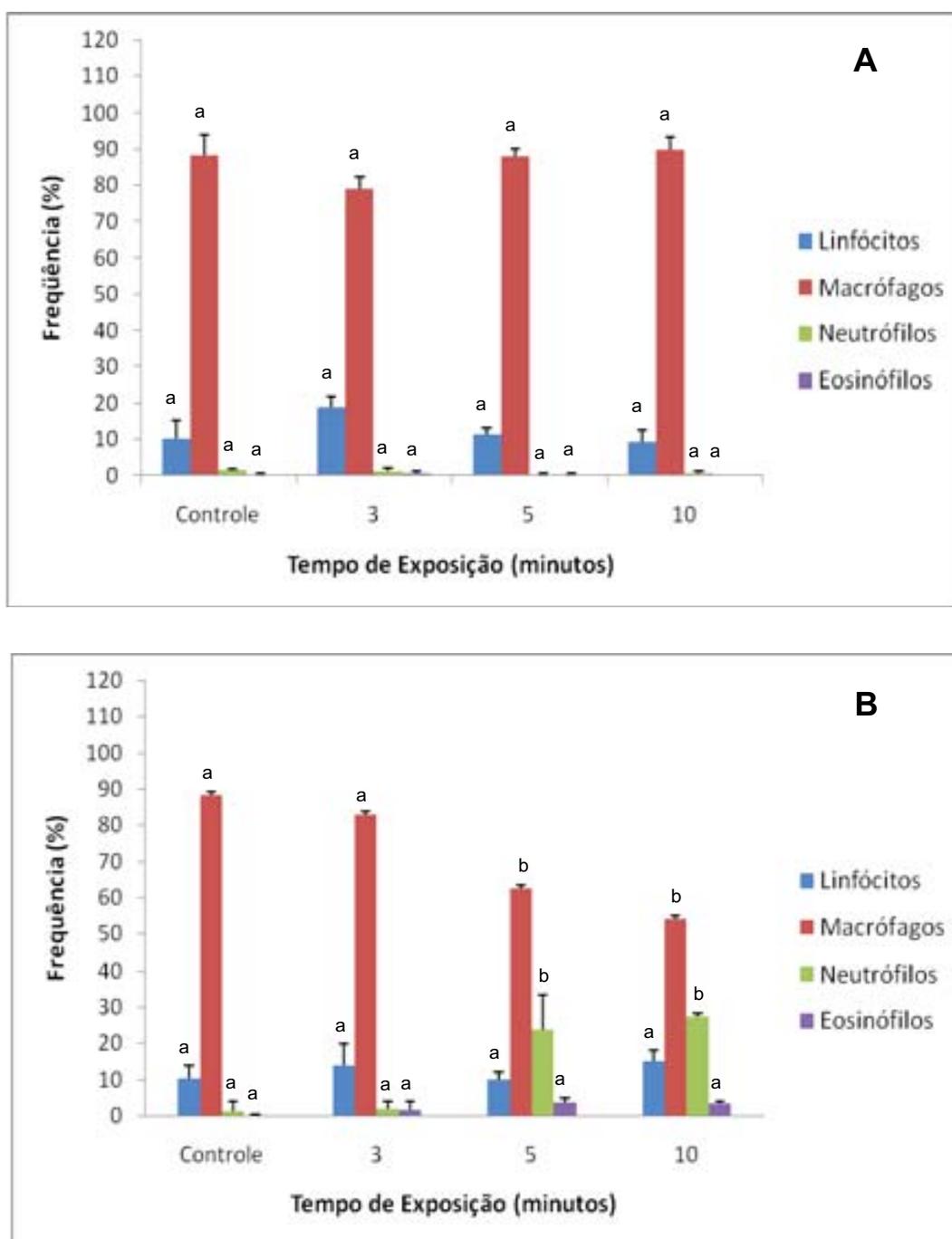


Figura 13: Efeitos do campo magnético (AC) sobre a frequência de leucócitos no peritônio de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de FeCoML. (A) Células obtidas 30 minutos e (B) 24 horas após a exposição ao campo magnético (AC). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 1: Efeitos de diferentes tempos de exposição ao campo magnético (AC) na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos tratados com FeCoML. As células foram coletadas 24 horas após o tratamento com o campo magnético.

GRUPO	MN EPC	% EPC
Controle	1,8 ± 0,8 ^a	42,0 ± 0,9 ^a
3 minutos de exposição	2,0 ± 1,2 ^a	46,0 ± 1,8 ^a
5 minutos de exposição	6,0 ± 2,0 ^a	45,0 ± 1,6 ^a
10 minutos exposição	11,8 ± 5,3 ^b	38,0 ± 1,8 ^b
Controle Positivo (CF)	12,2 ± 1,7 ^b	36,0 ± 3,0 ^b

MN EPC = Frequência de micronúcleos observados em eritrócitos policromáticos; **%PCE** = Porcentagem de eritrócitos policromáticos; **CF** = Ciclofosfamida. Letras diferentes nos tratamentos mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.2 Etapa 2 - Tratamento com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas

Os experimentos desta etapa atendem o objetivo específico de avaliar, por meio de testes biológicos, os efeitos causados pelas amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas (L_{PEG} , ML_{PEG} e $ML_{PEG-ZnF}$) em camundongos. Foram administrados 100 μ L da amostra por via IP, e os dados foram coletados após 30 minutos, 6 horas, 1 dia, 2 dias e 7 dias após tratamentos.

4.2.1 Análise citométrica

4.2.1.1 Análise citométrica do sangue periférico

Os resultados obtidos na análise citométrica mostraram aumento significativo na contagem global de leucócitos (CGL) após tratamento com ML_{PEG} (1 e 2 dias) e $ML_{PEG-ZnF}$ (1 dia) em relação ao grupo controle; e significativa redução da CGL após tratamento com L_{PEG} (2 dias) em relação aos grupos controle e tratado com tampão fosfato (Figura 14 C e D). Os valores retornaram aos valores semelhantes ao encontrado no grupo controle sem tratamento

Os resultados encontrados na análise diferencial mostraram alterações significativas nas populações celulares de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. A população de linfócitos apresentou variações similares àquelas observadas na CGL (Figura 14 C e D).

Na população de neutrófilos observou-se aumento significativo após tratamento com L_{PEG} (30 minutos) em relação ao controle, com ML_{PEG} (30 minutos, 6 horas e 2 dias) em relação ao grupo controle, e com $ML_{PEG-ZnF}$ (6 horas e 7 dias), quando comparado aos grupos controle e tampão fosfato. Além disso, observou-se redução significativa na população de neutrófilos após tratamento com L_{PEG} (1 dia) (Figura 14).

Alterações foram constatadas na população de eosinófilos após tratamento com L_{PEG} (6 horas), com aumento significativo em relação aos grupos controle, tampão

fosfato e ML_{PEG} . E foi observado redução significativa após tratamento de ML_{PEG} -ZnF (1 dia e 7 dias) quando comparado aos grupos controle e tampão fosfato (Figura 14 C e E).

4.2.1.2 Análise citométrica do fluido peritoneal

A análise citométrica do fluido peritoneal apresentou aumento significativo na população de linfócitos após tratamento com tampão fosfato e L_{PEG} (30 minutos), ML_{PEG} e ML_{PEG} -ZnF (2 dias), em relação ao grupo controle (Figura 15 A e D).

Mostrou que a população de macrófagos aumentou significativamente após tratamento com tampão fosfato (30 minutos e 1 dia) em relação ao grupo controle, e reduziu após tratamento com L_{PEG} (6 horas), ML_{PEG} e ML_{PEG} -ZnF (6 horas e 2 dias), quando comparado aos grupos controle e tampão fosfato (Figura 15).

A população de neutrófilos aumentou significativamente após tratamento com ML_{PEG} e ML_{PEG} -ZnF (6 horas, 1 dia, 2 dias), em relação aos grupos controle e tampão fosfato; e redução significativa L_{PEG} (30 minutos), quando comparado aos grupos controle (Figura 15).

4.2.2 Viabilidade de células peritoneais

Os resultados do teste de viabilidade, estatisticamente significativos, demonstraram que ocorreu aumento na frequência de células mortas em 8,8% e 13%, após tratamento com ML_{PEG} -ZnF, 30 minutos e 6 horas, respectivamente em comparação ao grupo controle (Figura 16 A e B).

4.2.3 Análise genotóxica e citotóxica

Não foram verificadas alterações significativas na frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) e no índice de EPC (% EPC) entre os animais tratados com as diferentes amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas em qualquer um dos tempos avaliados neste teste (1, 2 e 7 dias) (Tabela 2).

4.2.4 Análise histológica

Após tratamento com as amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas, as cápsulas de todos os órgãos estavam histologicamente semelhantes aos do grupo controle.

Nos cortes de pulmão observou-se a presença de infiltrados inflamatórios próximos às paredes de bronquíolos ou vasos sanguíneos (Figura 57 B). Os animais de maior tempo experimental (7 dias), apresentaram um menor quantidade de aglomerados.

Nas amostras de fígado não foram observados alteração morfológicas (Figura 57 D) quando comparados ao grupo controle (Figura 57 A).

As lâminas do baço mostram uma marcação para ferro mais intensa na polpa vermelha (Figura 57 E e F) em todos os grupos animais. Alguns poucos animais (controle e tratado) não exibiram marcação alguma no órgão.

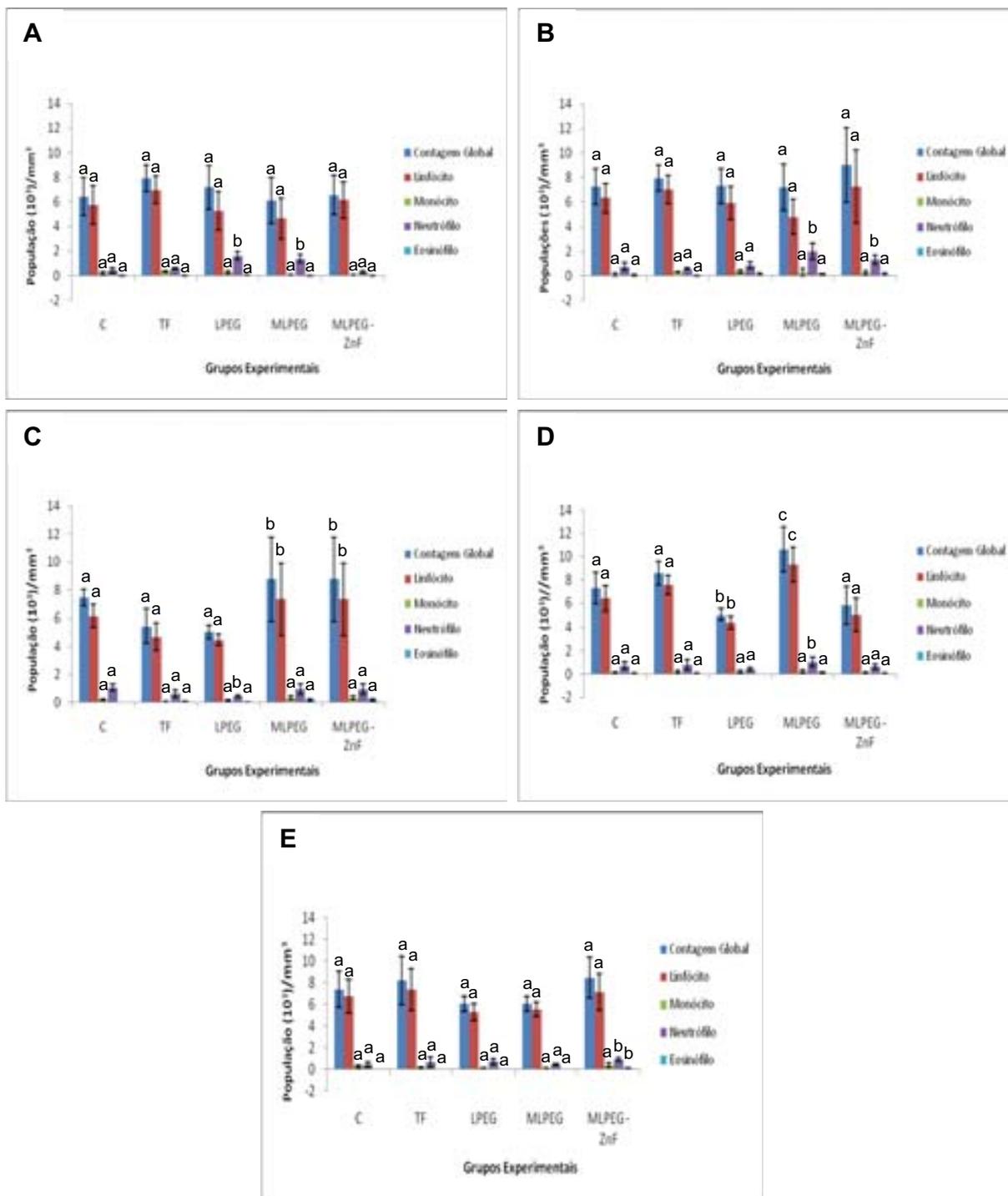


Figura 14: Efeitos de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas sobre a freqüência de leucócitos no sangue de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a administração IP de cada amostra. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

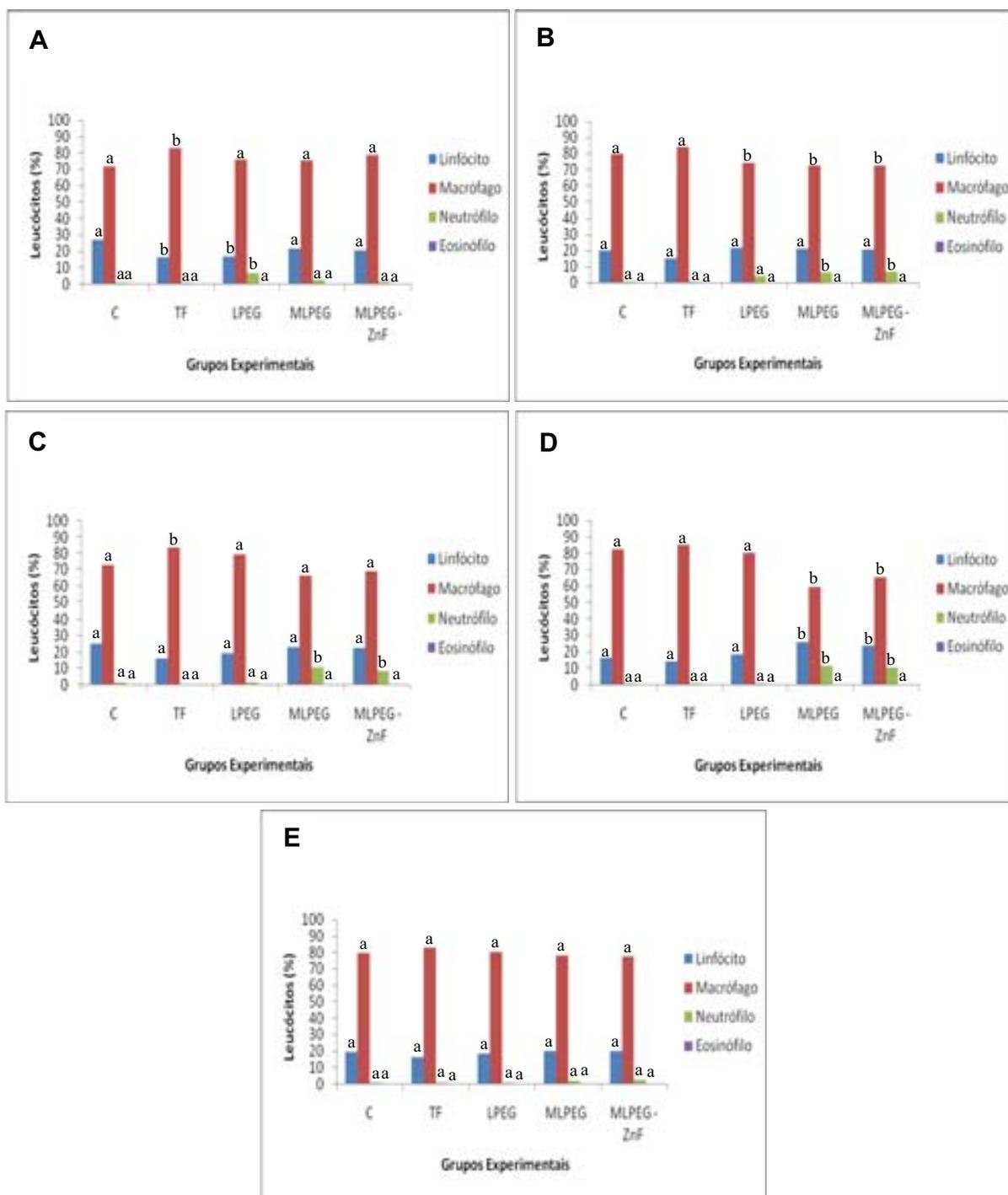


Figura 15: Efeitos de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas sobre a freqüência de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a administração IP de cada amostra. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

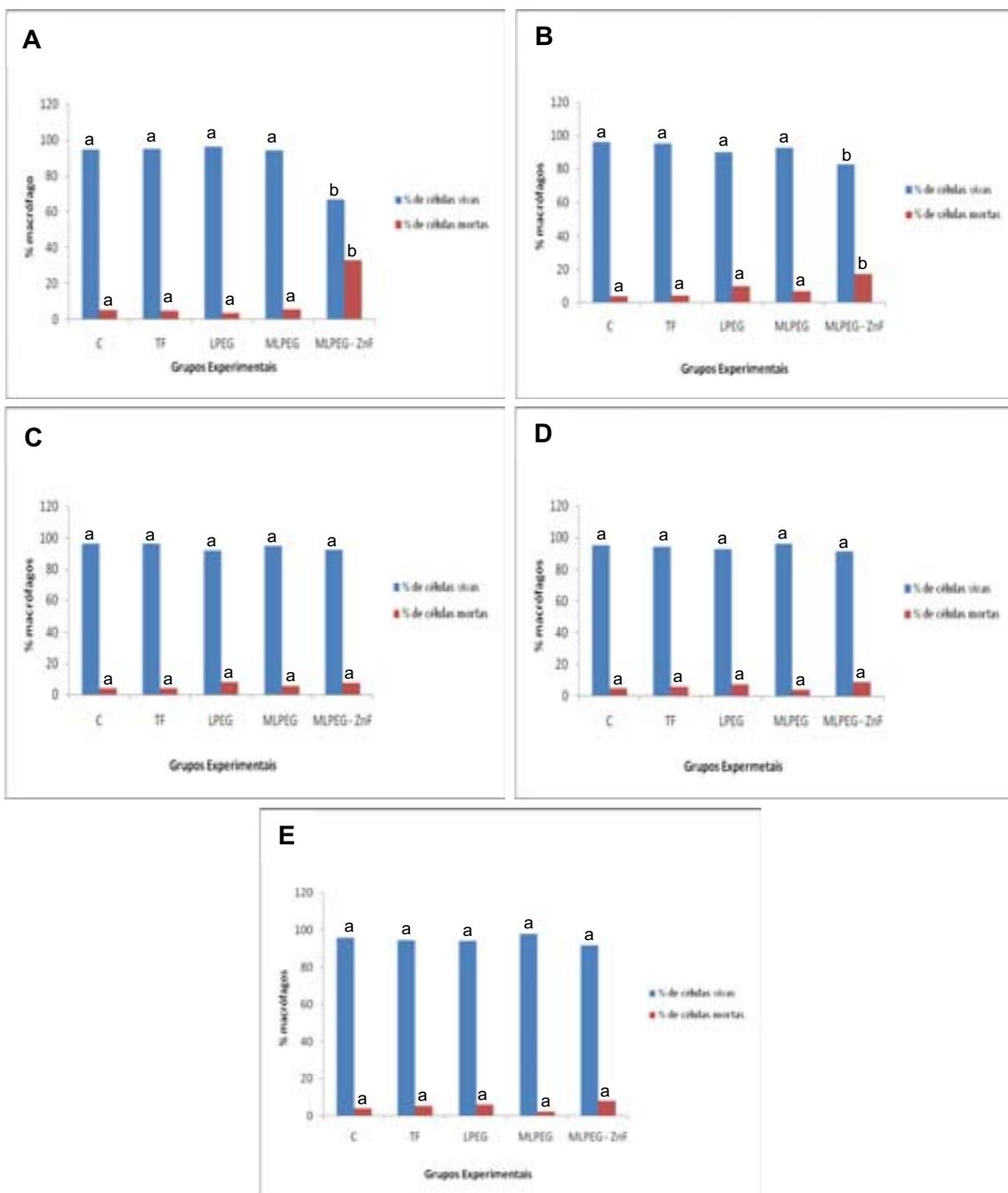


Figura 16: Efeitos de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas sobre a frequência de células vivas e mortas no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a administração IP de cada amostra. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2: Efeitos de amostras magnéticas e /ou fotossensibilizadas na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos.

Tempo após tratamentos	Grupo	MN - EPC	% EPC
1 dia	Controle	2,0 ± 1,2 ^a	47,6 ± 0,7 ^a
	TF 7,4	2,4 ± 1,1 ^a	47,9 ± 0,7 ^a
	L _{PEG}	1,8 ± 0,8 ^a	48,2 ± 1,2 ^a
	L _{PEG} - ZnF	1,0 ± 1,0 ^a	48,4 ± 1,5 ^a
	ML _{PEG}	1,2 ± 0,8 ^a	48,4 ± 0,9 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	1,2 ± 1,3 ^a	48,2 ± 1,1 ^a
2 dias	Controle	1,6 ± 1,1 ^a	48,7 ± 1,5 ^a
	TF 7,4	2,4 ± 1,1 ^a	48,1 ± 1,1 ^a
	L _{PEG}	1,0 ± 0,7 ^a	49,3 ± 1,6 ^a
	L _{PEG} - ZnF	1,2 ± 1,3 ^a	48,0 ± 1,0 ^a
	ML _{PEG}	1,8 ± 1,3 ^a	48,0 ± 1,2 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	1,6 ± 0,9 ^a	48,6 ± 1,6 ^a
7 dias	Controle	2,4 ± 1,1 ^a	48,3 ± 0,7 ^a
	TF 7,4	1,6 ± 1,1 ^a	47,9 ± 1,0 ^a
	L _{PEG}	1,4 ± 1,1 ^a	48,5 ± 0,8 ^a
	L _{PEG} - ZnF	2,2 ± 2,2 ^a	48,7 ± 1,6 ^a
	ML _{PEG}	2,0 ± 1,4 ^a	50,0 ± 2,3 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	3,2 ± 2,3 ^a	48,8 ± 1,1 ^a
Controle Positivo (CF)		50,6 ± 10,0 ^b	35,1 ± 3,5 ^b

MN EPC = Frequência de micronúcleos observados em eritrócitos policromáticos; **%PCE** = Porcentagem de eritrócitos policromáticos; **CF** = Ciclofosfamida. Letras diferentes nos tratamentos mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

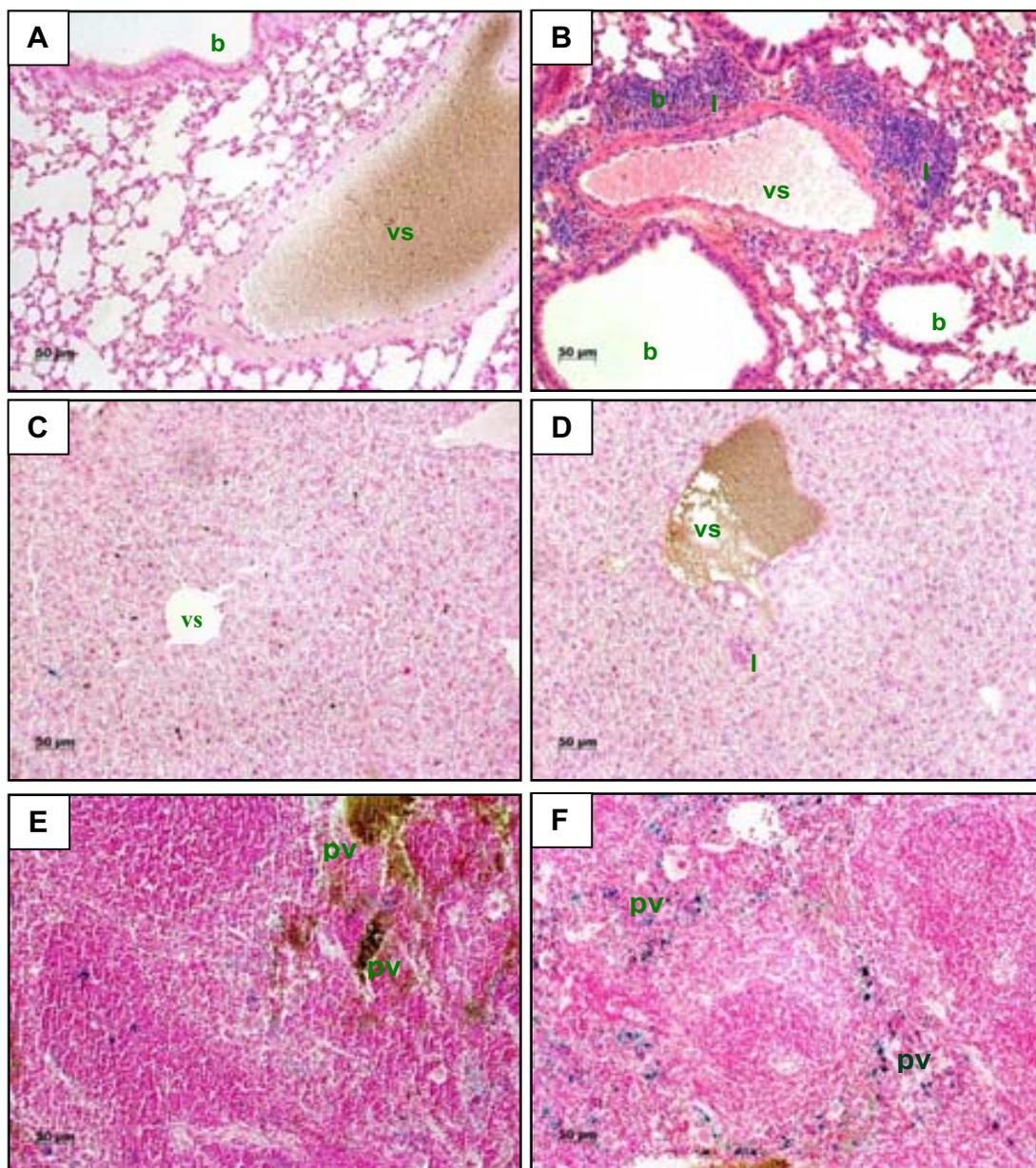


Figura 57: Camundongos tratados com as amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão (A e B), fígado (C e D) e baço (E e F). Em A, pulmão de animal controle (2 dias) comparado ao grupo tratado (B, 2 dias). Note em B extenso processo inflamatório (I) na parede de vasos sanguíneos (vs) ou bronquíolos (b), sempre associados à presença de partículas (setas). Em D, presença de partículas em células de Kupffer nos sinusóides de fígado de animal tratado (2 dias). O grupo controle não apresentou marcação (C). Em F, baço de animal tratado (2 dias) exibindo partículas na polpa vermelha (pv) do baço. Coloração pelo método de Perls.

4.3 Etapa 3 - Tratamento com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas submetidas ao campo magnético (AC)

Os experimentos desta etapa atendem ao objetivo específico de avaliar, por meio de testes biológicos, os efeitos causados pela exposição ao campo eletromagnético alternado (AC), com tempo de exposição de 3 minutos, em animais previamente tratados com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas (L_{PEG} , ML_{PEG} e $ML_{PEG-ZnF}$). O tempo de 3 minutos de exposição ao campo magnético AC foi determinado na primeira etapa deste trabalho, como o tempo que não apresentou qualquer dano nas condições testadas.

Foram administrados 100 μ L da amostra por via IP, e os dados foram coletados após 30 minutos, 6 horas, 1, 2 e 7 dias após tratamentos.

4.3.1 Análise citométrica

4.3.1.1 Análise citométrica do sangue periférico

Os resultados obtidos na análise citométrica mostraram redução significativa na contagem global de leucócitos (CGL) após tratamento com tampão fosfato e L_{PEG} (30 minutos) em relação ao grupo controle (Figura 18 A). No entanto, os valores da CGL dos grupos tratados com tampão fosfato e L_{PEG} retornaram aos valores semelhantes ao encontrado no grupo controle sem tratamento (Figura 18).

Os resultados obtidos na análise diferencial mostraram alterações significativas em todas as populações celulares analisadas: linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos (Figura 18). A população de linfócitos apresentou variações similares àquelas observadas na CGL (Figura 18 A).

Na população de neutrófilos observou-se aumento significativo após tratamento com ML_{PEG} (30 minutos e 1 dia), $ML_{PEG-ZnF}$ (1 dia e 7 dias) em relação ao grupo

controle. Além disso, observou-se redução significativa após tratamento com tampão fosfato, L_{PEG} e ML_{PEG}-ZnF (6 horas) (Figura 18).

Alterações foram constatadas na população de monócitos após tratamento com ML_{PEG}-ZnF (6 horas) com aumento significativo em relação a todos os grupos tratados; e ainda aumento após tratamento com L_{PEG} (1 dia e 2 dias), ML_{PEG} (2 dias e 7 dias) e TF (7 dias), quando comparado aos grupos controle (Figura 18).

A população de eosinófilos sofreu aumento significativo após tratamento com L_{PEG} (1 dia), com aumento significativo em relação ao grupo controle (Figura 18 C).

4.3.1.2 Análise citométrica do fluido peritoneal

A análise citométrica do fluido peritoneal apresentou aumento significativo, em relação ao grupo controle, na população de linfócitos após tratamento com ML_{PEG}-ZnF (2 dias) e ML_{PEG} (30 minutos, 1 dia e 2 dias), no entanto os dados coletados 1 dia (ML_{PEG}) após experimentos apresentaram resultados significativos tanto em relação ao controle como em relação a todos os grupos experimentais (Figura 19).

Mostrou que a população de macrófagos aumentou após tratamento com ML_{PEG} e ML_{PEG}-ZnF (7 dias), e reduziu após tratamento com ML_{PEG} (30 minutos, 1 dia, 2 dias) e ML_{PEG}-ZnF (1 dia, 2 dias), todos os resultados foram significativos quando comparados ao grupo controle (Figura 19).

A população de neutrófilos aumentou significativamente após tratamento com L_{PEG} (6 horas), ML_{PEG} (6 horas, 1 dia) e ML_{PEG}-ZnF (6 horas, 1 dia), em relação aos grupos controle (Figura 19).

E a população de eosinófilos aumentou após tratamento com ML_{PEG} (1 dia) e ML_{PEG}-ZnF (1 dia), quando comparados aos dados do controle (Figura 19).

4.3.2 Viabilidade de células peritoneais

Os resultados do teste de viabilidade demonstraram que ocorreu aumento na frequência de células mortas após tratamento com ML_{PEG} (6 horas) e ML_{PEG}-ZnF (30 minutos, 7 dias), e conseqüente redução da viabilidade celular no peritônio, após tratamento com ML_{PEG}-ZnF (7 dias), quando comparado ao grupo controle (Figura 20).

4.3.3 Análise genotóxica e citotóxica

Não foram verificadas alterações significativas na frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) e no índice de EPC (% EPC) nos animais submetidos ao AC e previamente tratados com as diferentes amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas, em qualquer um dos tempos avaliados neste teste (1, 2 e 7 dias) (Tabela 3).

4.3.4 Análise histológica

Nos cortes de pulmão observaram-se a presença de muitos aglomerados de NPM dispersos pelo parênquima, sempre associados a infiltrados inflamatórios próximos às paredes de bronquíolos ou vasos sanguíneos (Figura 61 B). Os animais de maior tempo experimental (7 dias), apresentaram um menor quantidade de aglomerados e, conseqüentemente, de infiltrados inflamatórios

Nas amostras de fígado observa-se um leve aumento na quantidade de infiltrados inflamatórios (Figura 61 D) quando comparados ao grupo controle (Figura 61 C); Uma fraca marcação para ferro é percebida em células de Kuppfer localizados nos capilares sinusóides do órgão (dado não apresentado).

As lâminas do baço mostram grande quantidade de aglomerados de NPM distribuídas nos sinusóides da polpa vermelha (Figura 61 F) quando comparados ao

controle (Figura 61 E). Em alguns animais, foi notada a marcação mais intensa para ferro na polpa branca de animais tratados (dado não apresentado).

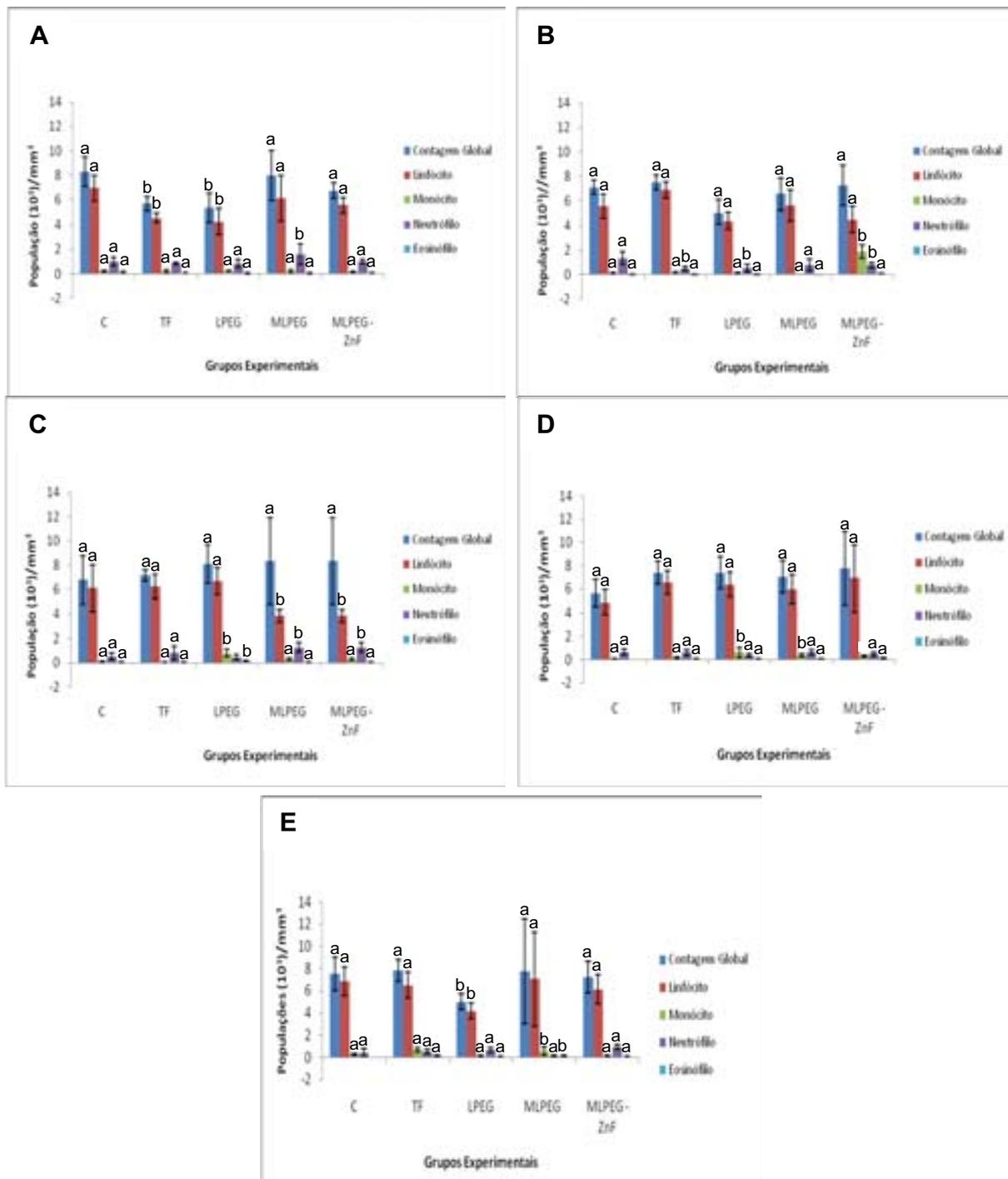


Figura 18: Efeitos do campo magnético (AC) sobre a freqüência de leucócitos no sangue de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao campo magnético (AC). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

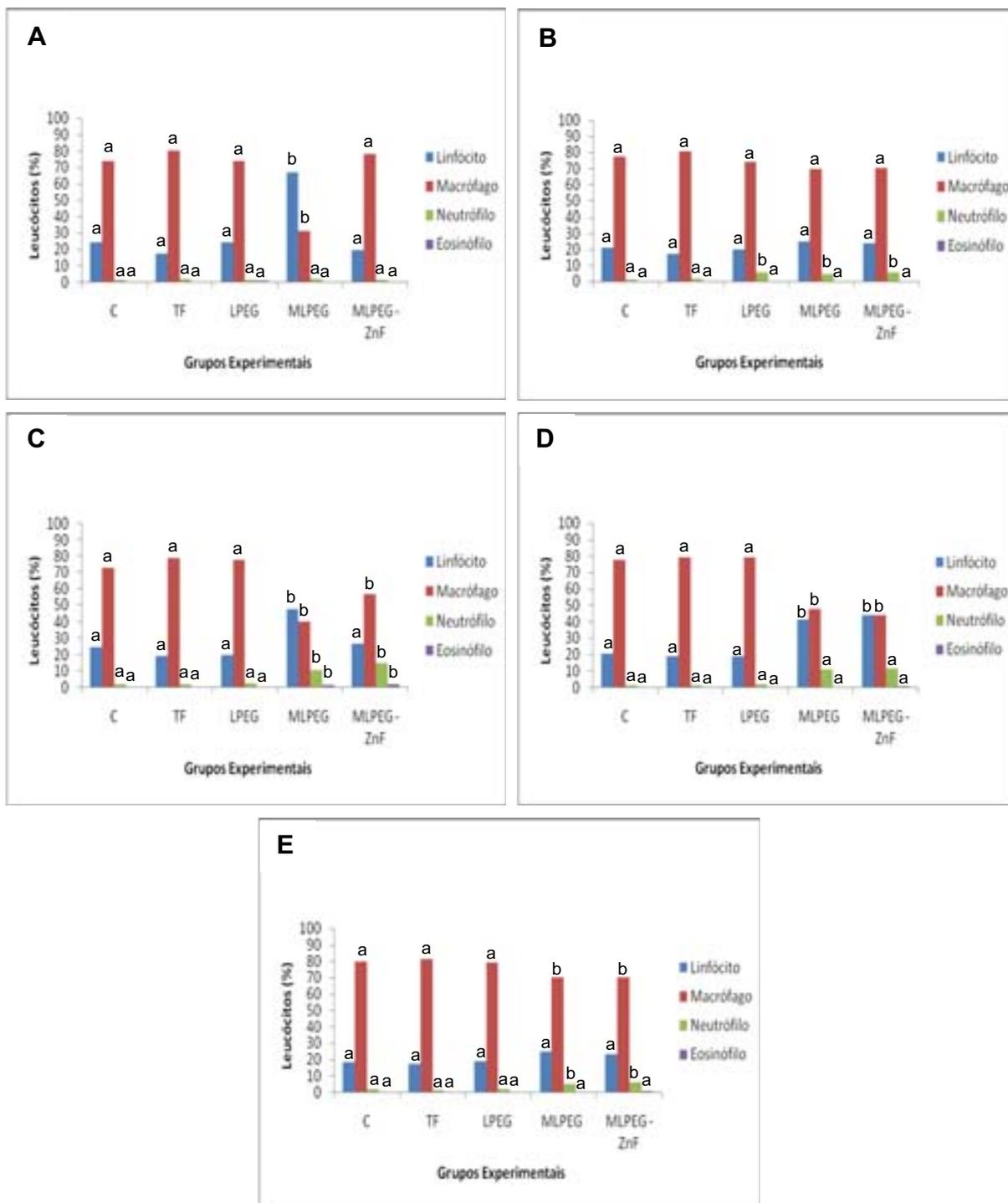


Figura 19: Efeitos do campo magnético (AC) sobre a freqüência de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao campo magnético (AC). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

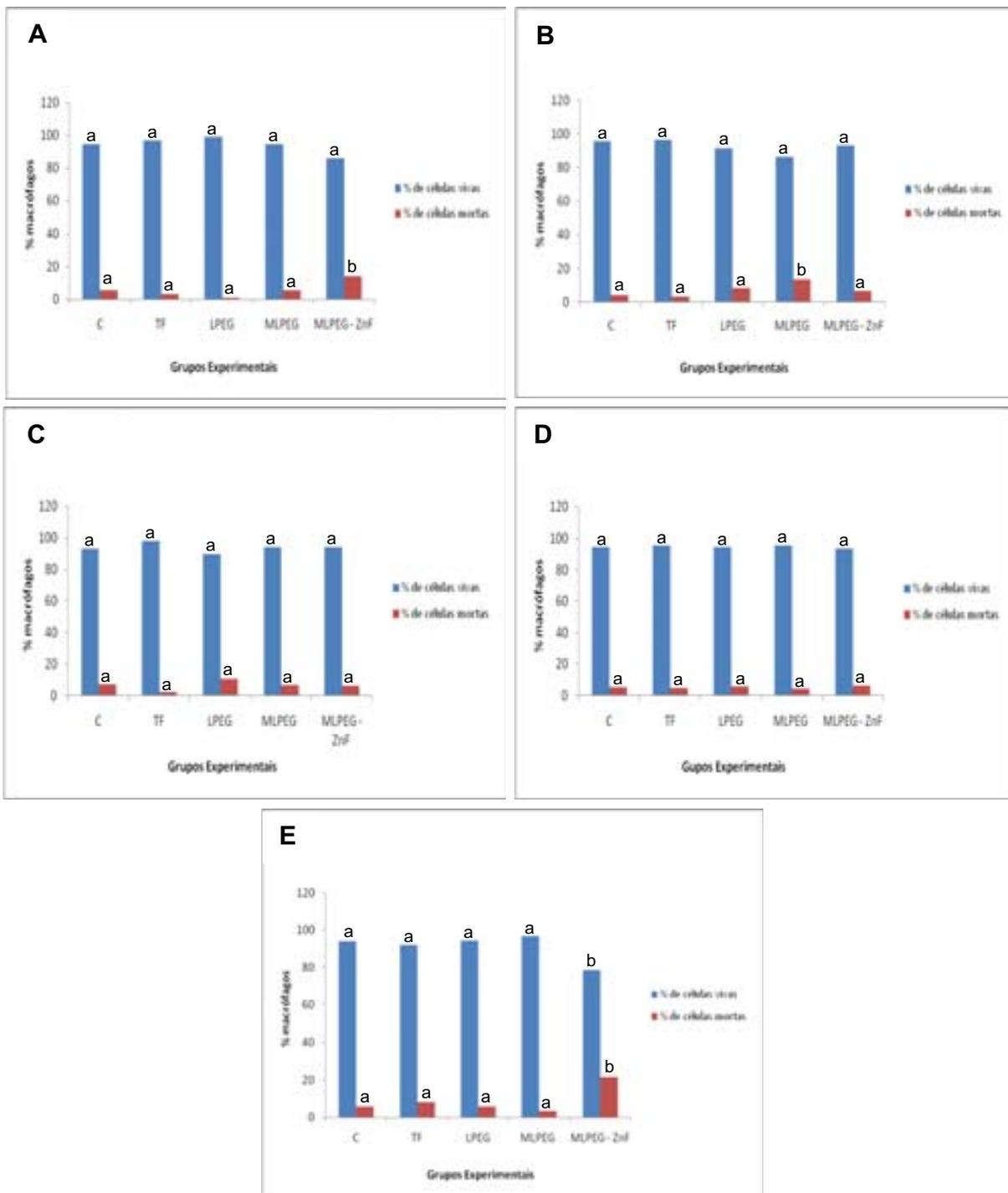


Figura 20: Efeitos do campo magnético (AC) sobre a frequência de células vivas e mortas no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao campo magnético (AC). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3: Efeitos da exposição ao campo magnético (AC) na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos tratados com amostras magnéticas e /ou fotossensibilizadas.

Tempo após tratamentos	Grupo	MN - EPC	% EPC
1 dia	Controle	5,4 ± 1,1 ^a	47,8 ± 3,0 ^a
	TF 7,4	3,4 ± 1,1 ^a	46,9 ± 1,6 ^a
	L _{PEG}	3,8 ± 1,6 ^a	49,4 ± 3,4 ^a
	ML _{PEG}	3,2 ± 1,9 ^a	47,5 ± 0,9 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	6,2 ± 2,2 ^a	46,4 ± 1,3 ^a
2 dias	Controle	5,2 ± 2,4 ^a	49,6 ± 2,7 ^a
	TF 7,4	3,8 ± 1,5 ^a	46,5 ± 1,3 ^a
	L _{PEG}	3,2 ± 2,4 ^a	48,3 ± 2,7 ^a
	ML _{PEG}	4,0 ± 2,9 ^a	48,3 ± 1,9 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	5,4 ± 2,9 ^a	46,6 ± 0,8 ^a
7 dias	Controle	2,2 ± 0,8 ^a	48,3 ± 1,6 ^a
	TF 7,4	3,0 ± 1,7 ^a	48,1 ± 2,2 ^a
	L _{PEG}	3,2 ± 2,4 ^a	48,1 ± 2,4 ^a
	ML _{PEG}	1,6 ± 1,1 ^a	48,2 ± 1,6 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	2,2 ± 0,8 ^a	49,2 ± 3,2 ^a
Controle Positivo (CF)		50,6 ± 10,0 ^b	35,1 ± 3,5 ^b

MN EPC = Freqüência de micronúcleos observados em eritrócitos policromáticos; **%PCE** = Porcentagem de eritrócitos policromáticos; **CF** = Ciclofosfamida. Letras diferentes nos tratamentos mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

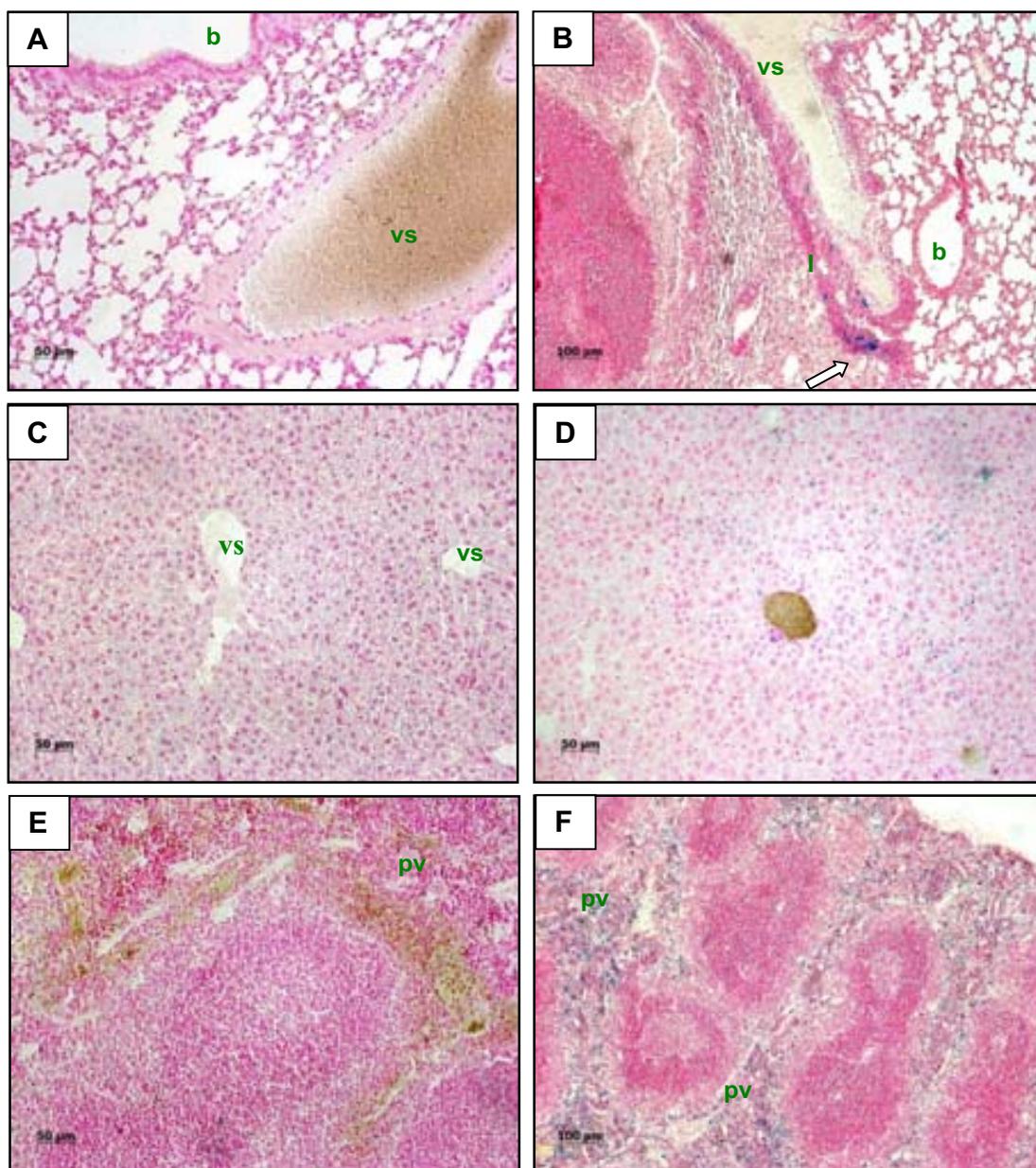


Figura 61: Camundongos tratados com as amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas exposto ao campo magnético. Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão (A e B), fígado (C e D) e baço (E e F). Em A, pulmão de animal controle (2 dias) comparado ao grupo $L_{PEG-ZnF}$ (7 dias). Note em B extenso infiltrado inflamatório (I) na parede de vasos sanguíneos (vs) ou bronquíolos (b), sempre associados à presença de partículas (setas). O grupo controle não apresentou marcação (C). Em F, baço de animal tratado $L_{PEG-ZnF}$ (7 dias) exibindo marcação na polpa vermelha (pv) do baço. Coloração pelo método de Pelrs.

4.4 Etapa 4 - Tratamento com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas submetidas ao laser

Os experimentos desta etapa cumprem o objetivo específico de avaliar, por meio de testes biológicos, os efeitos causados pela exposição ao laser (670 nm), com tempo de exposição de 20 minutos, em animais previamente tratados com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas (L_{PEG} , $L_{PEG-ZnF}$ e $ML_{PEG-ZnF}$). Foram administrados 100 μ L da amostra por via IP, e os dados foram coletados após 30 minutos, 6 horas, 1, 2 e 7 dias após tratamentos.

4.4.1 Análise citométrica

4.4.1.1 Análise citométrica do sangue periférico

Os resultados obtidos na análise citométrica mostraram aumento significativo na contagem global de leucócitos (CGL) após tratamento com $L_{PEG-ZnF}$ e $ML_{PEG-ZnF}$ (1 dia) em relação aos grupos controle e tampão fosfato, retornando aos valores semelhantes ao encontrado no grupo controle sem tratamento (Figura 22 C).

Os resultados encontrados na análise diferencial mostraram alterações significativas nas populações celulares de linfócitos, neutrófilos e monócitos (Figura 22). A população de linfócitos apresentou variações similares àquelas observadas na CGL (Figura 22 C).

Na população de neutrófilos observou-se aumento significativo após tratamento com $ML_{PEG-ZnF}$ (1 dia) em relação ao grupo controle (Figura 22 C).

Os resultados relacionados à população de monócitos mostraram que houve aumento após tratamento com $L_{PEG-ZnF}$ e $ML_{PEG-ZnF}$ quando esses dados são comparados aos dados do grupo controle (1 dia), aos dados de todos os grupos tratados (2 dias) e quando comparado aos grupos controle e tampão fosfato (7 dias) (Figura 22).

4.4.1.2 Análise citométrica do fluido peritoneal

A análise citométrica do fluido peritoneal apresentou aumento significativo na população de linfócitos após tratamento com L_{PEG} , $L_{PEG-ZnF}$ e $ML_{PEG-ZnF}$ (2 dias) em relação aos grupos controle e tampão fosfato, e após tratamento com ML_{PEG} (7 dias), em relação a todos os grupos tratados (Figura 23 D e E). E apresentou redução nesta população celular após tratamento com $L_{PEG-ZnF}$ e $ML_{PEG-ZnF}$ (1 dia), quando comparado aos grupos controle e fosfato (Figura 23 C).

A população de macrófagos reduziu significativamente após tratamento com $L_{PEG-ZnF}$ e $ML_{PEG-ZnF}$ (1 dia) em relação aos grupos controle e tampão fosfato, e $L_{PEG-ZnF}$ (7 dias) e $ML_{PEG-ZnF}$ (2 dias) em relação a todos os grupos tratados (Figura 23).

A população de neutrófilos aumentou significativamente após tratamento com $L_{PEG-ZnF}$ e $ML_{PEG-ZnF}$ (6 horas, 1 dia e 2 dias), em relação aos grupos controle e tampão fosfato (Figura 23).

4.4.2 Viabilidade de células peritoneais

Os resultados do teste de viabilidade demonstraram que ocorreu aumento na frequência de células mortas após tratamento com $ML_{PEG-ZnF}$ (30 minutos, 1 dia), L_{PEG} e $L_{PEG-ZnF}$ (30 minutos, 6 horas e 1 dia), e conseqüente redução da viabilidade celular no peritônio, após tratamento com $L_{PEG-ZnF}$ (1 dia), quando comparado ao grupo controle (Figura 24).

4.4.3 Análise genotóxica e citotóxica

Não foram verificadas alterações significativas na frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) e no índice de EPC (% EPC) nos animais submetidos ao laser (670 nm) e previamente tratados com as diferentes amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas, em qualquer um dos tempos avaliados neste

teste (1, 2 e 7 dias) (Tabela 4).

4.4.4 Análise histológica

A exposição ao laser durante 20 minutos não induziu quaisquer alterações histológicas nas lâminas de fígado, pulmão e baço que pudessem ser detectadas por análise ao microscópio de luz. A Análise dos cortes histológicos dos órgãos se mostrou semelhante àqueles da etapa 3 (fotos não apresentadas).

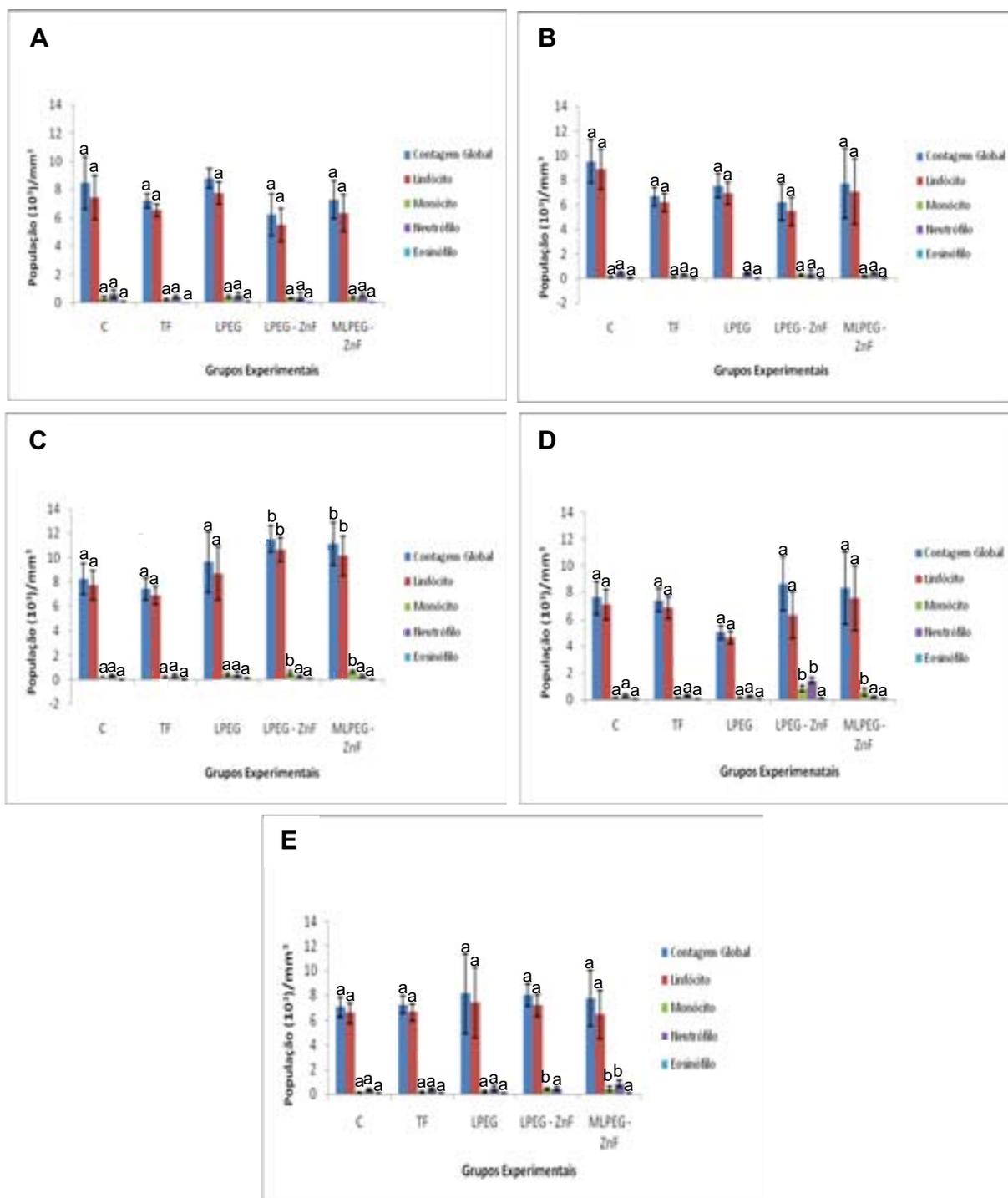


Figura 22: Efeitos do laser sobre a freqüência de leucócitos no sangue de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao laser (670 nm). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

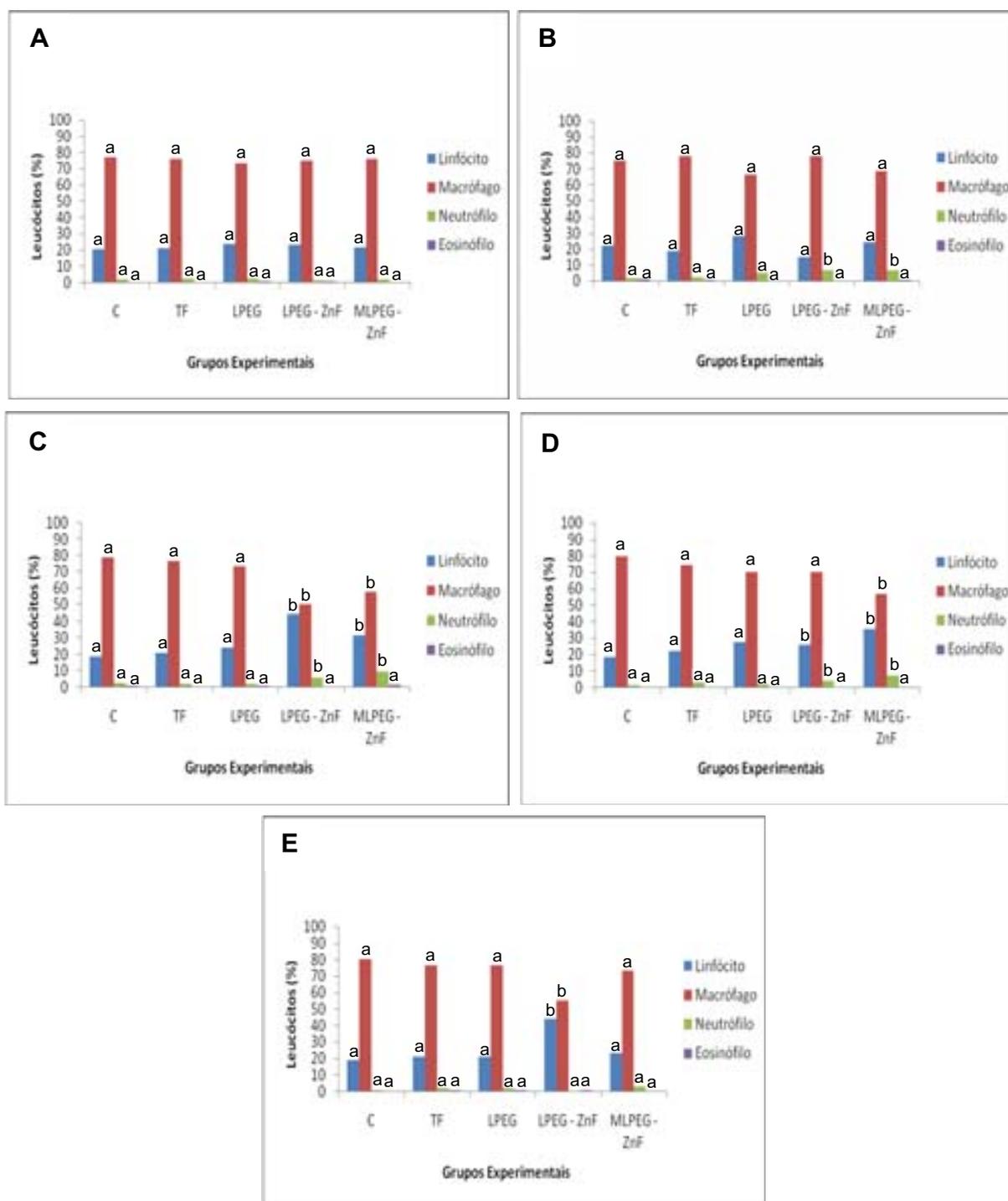


Figura 23: Efeitos do laser sobre a frequência de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao laser (670 nm). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

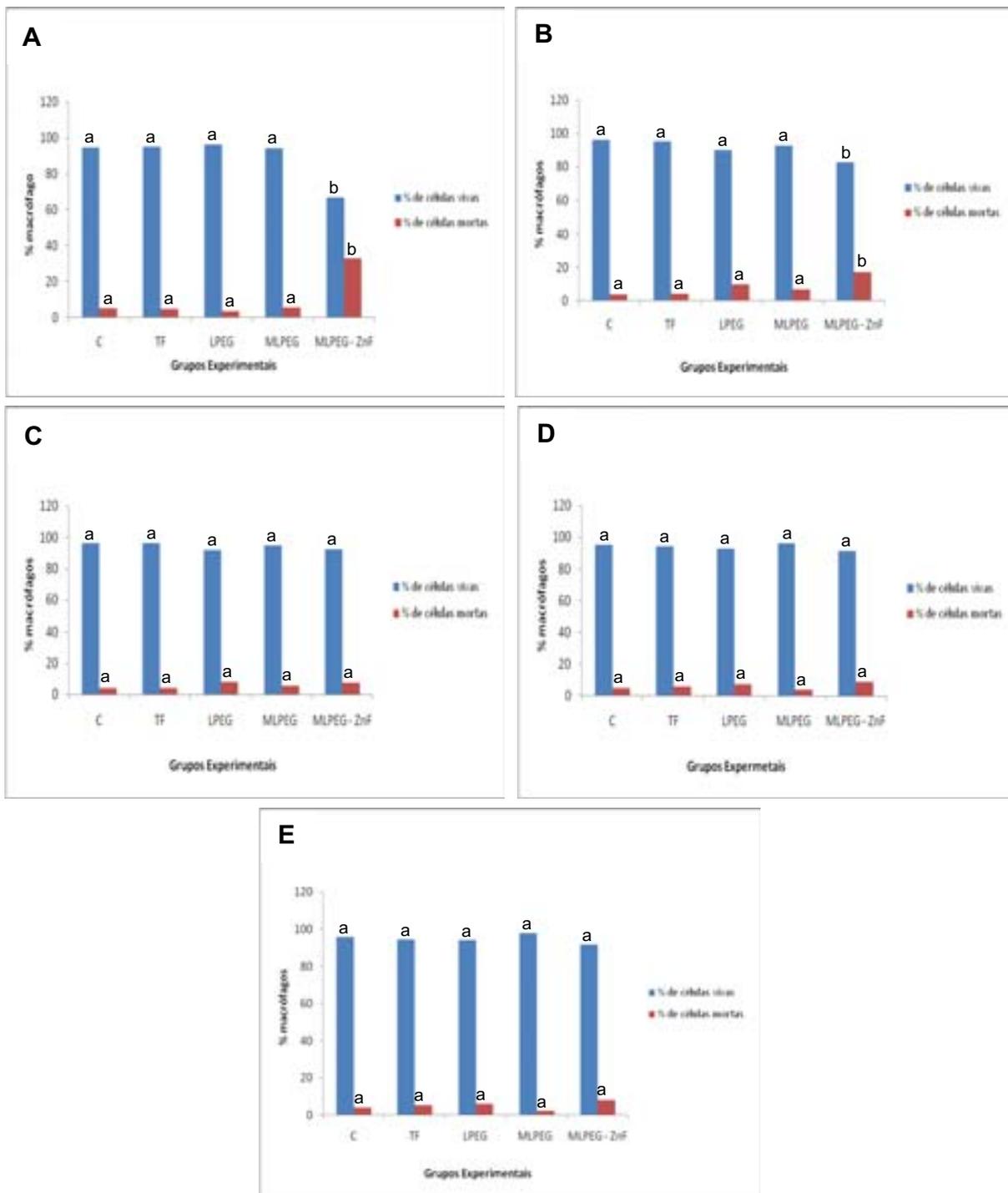


Figura 24: Efeitos de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas sobre a frequência de células vivas e mortas no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a administração IP de cada amostra. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 4: Efeitos da exposição ao laser (670 nm) na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos tratados com amostras magnéticas e /ou fotossensibilizadas.

Tempo após tratamentos	Grupo	MN - EPC ^a	% EPC ^a
1 dia	Controle	3,0 ± 1,9 ^a	49,5 ± 2,9 ^a
	TF 7,4	3,0 ± 1,6 ^a	49,7 ± 3,1 ^a
	L _{PEG}	3,2 ± 1,3 ^a	49,9 ± 3,4 ^a
	ML _{PEG}	2,4 ± 1,1 ^a	48,9 ± 3,4 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	3,4 ± 2,2 ^a	47,8 ± 2,6 ^a
2 dias	Controle	3,8 ± 1,3 ^a	47,9 ± 2,3 ^a
	TF 7,4	3,4 ± 1,1 ^a	48,3 ± 2,4 ^a
	L _{PEG}	3,0 ± 1,4 ^a	48,5 ± 3,5 ^a
	ML _{PEG}	3,0 ± 2,3 ^a	49,8 ± 2,9 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	3,0 ± 2,5 ^a	48,1 ± 2,0 ^a
7 dias	Controle	3,0 ± 1,2 ^a	49,3 ± 2,4 ^a
	TF 7,4	3,0 ± 1,2 ^a	49,2 ± 2,8 ^a
	L _{PEG}	2,6 ± 1,1 ^a	47,8 ± 0,9 ^a
	ML _{PEG}	3,2 ± 2,4 ^a	49,0 ± 3,6 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	2,4 ± 1,1 ^a	47,3 ± 0,9 ^a
Controle Positivo (CF)		56,8 ± 14 ^b	38,0 ± 3,0 ^b

MN EPC = Frequência de micronúcleos observados em eritrócitos policromáticos; **%PCE** = Porcentagem de eritrócitos policromáticos; **CF** = Ciclofasfamida. ♦ Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

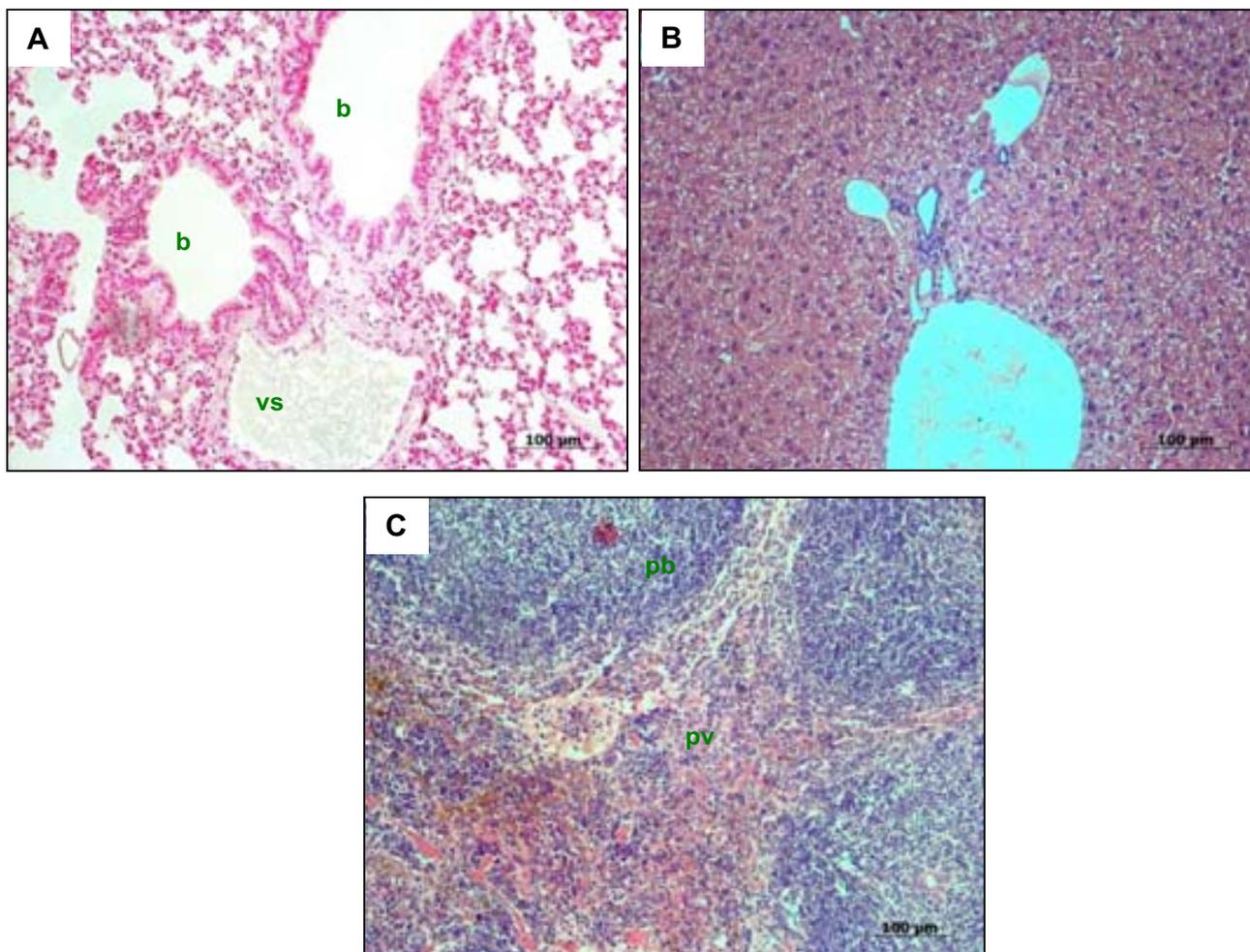


Figura 25: Camundongos tratados com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas expostos ao laser. Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão (A), fígado (B) e baço (C). Em A, pulmão de animal tratado com L_{PEG}-ZnF (7 dias), com a parede de vasos sanguíneos (vs) e bronquíolos (b) sem infiltrados inflamatórios. Em B (L_{PEG}-ZnF, 7 dias), parênquima hepático demonstrando ausência de infiltrado inflamatório. Em C, baço de animal tratado com L_{PEG}-ZnF (7 dias), sem apresentar alterações na polpa branca (pb) e vermelha (pv). Coloração por H&E em A e pelo método de Papanicolaou em B e C.

4.5 Etapa 5 - Tratamento com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas submetidas ao campo magnético (AC) e laser

Os experimentos desta etapa cumprem o objetivo específico de avaliar, por meio de testes biológicos, os efeitos causados pela exposição ao AC (3 minutos) e ao laser - 670 nm (20 minutos), em animais previamente tratados com a amostra magnética e fotossensibilizada (**ML_{PEG}-ZnF**). Foram administrados 100 µL da amostra por via IP, e os dados foram coletados após 30 minutos, 6 horas, 1, 2 e 7 dias após os tratamentos.

4.5.1 Análise citométrica

4.5.1.1 Análise citométrica do sangue periférico

Os resultados obtidos na contagem global de leucócitos no sangue periférico não mostraram alterações significativas em relação ao grupo controle, segundo o teste estatístico empregado (Figura 25).

Os resultados obtidos na análise diferencial mostraram redução significativa na população de neutrófilos (30 minutos e 1 dia) e aumento significativo na população de monócitos (30 minutos, 6 horas e 1 dia) após tratamentos, quando os dados foram relacionados ao grupo tratado com tampão fosfato, considerado nesta etapa como o grupo controle (Figura 25).

4.5.1.2 Análise citométrica do fluido peritoneal

Os resultados obtidos na análise citométrica do fluido peritoneal mostraram aumento significativo, após tratamentos, na população de linfócitos (30 minutos e 2 dias) e aumento significativo na população de neutrófilos (6 horas, 1 dia e 2 dias) (Figura 26).

A população de macrófago apresentou-se aumentada 30 minutos após tratamentos, entretanto, esta população celular sofreu redução significativa em todos os outros tempos experimentais (1 dia, 2 dias e 7 dias). Todos esses dados foram comparados ao grupo tratado com tampão fosfato (Figura 26).

4.5.2 Viabilidade de células peritoneais

Os resultados do teste de viabilidade demonstraram que ocorreu aumento significativo na frequência de células mortas após tratamento com ML_{PEG} -ZnF, 30 minutos, 1 dia e 7 dias, e conseqüente redução da viabilidade celular no peritônio 30 minutos e 7 dias, após tratamentos, quando comparado ao grupo tampão fosfato (Figura 27).

4.5.3 Análise genotóxica e citotóxica

Não foram verificadas alterações significativas na frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) e no índice de EPC (% EPC) nos animais submetidos ao AC e ao laser (670 nm), e que foram previamente tratados com ML_{PEG} -ZnF, em qualquer um dos tempos avaliados neste teste (1, 2 e 7 dias) (Tabela 5).

4.5.4 Análise histológica

Nos cortes de pulmão observaram-se a presença de aglomerados dispersos pelo parênquima, sempre associados a infiltrados inflamatórios próximos às paredes de bronquíolos ou vasos sanguíneos (Figura 28 B) semelhantes aqueles encontrados no grupo L_{PEG} , L_{PEG} -ZnF e ML_{PEG} -ZnF. Os animais de maior tempo experimental (7 dias), apresentaram um menor quantidade de aglomerados e, conseqüentemente, de infiltrados inflamatórios (Figura 28 B).

Nas amostras de fígado observou-se um leve aumento na quantidade de infiltrados inflamatórios (semelhante aos observados nos outros grupos tratados com Lipossomo) (Figura 28 D).

As lâminas do baço mostram grande quantidade de aglomerados de NPM distribuídas nos sinusóides da polpa vermelha (Figura 28 F) quando comparados ao controle (Figura 28 E). Em alguns animais, foi notada também a marcação mais intensa para ferro na polpa branca de animais tratados.

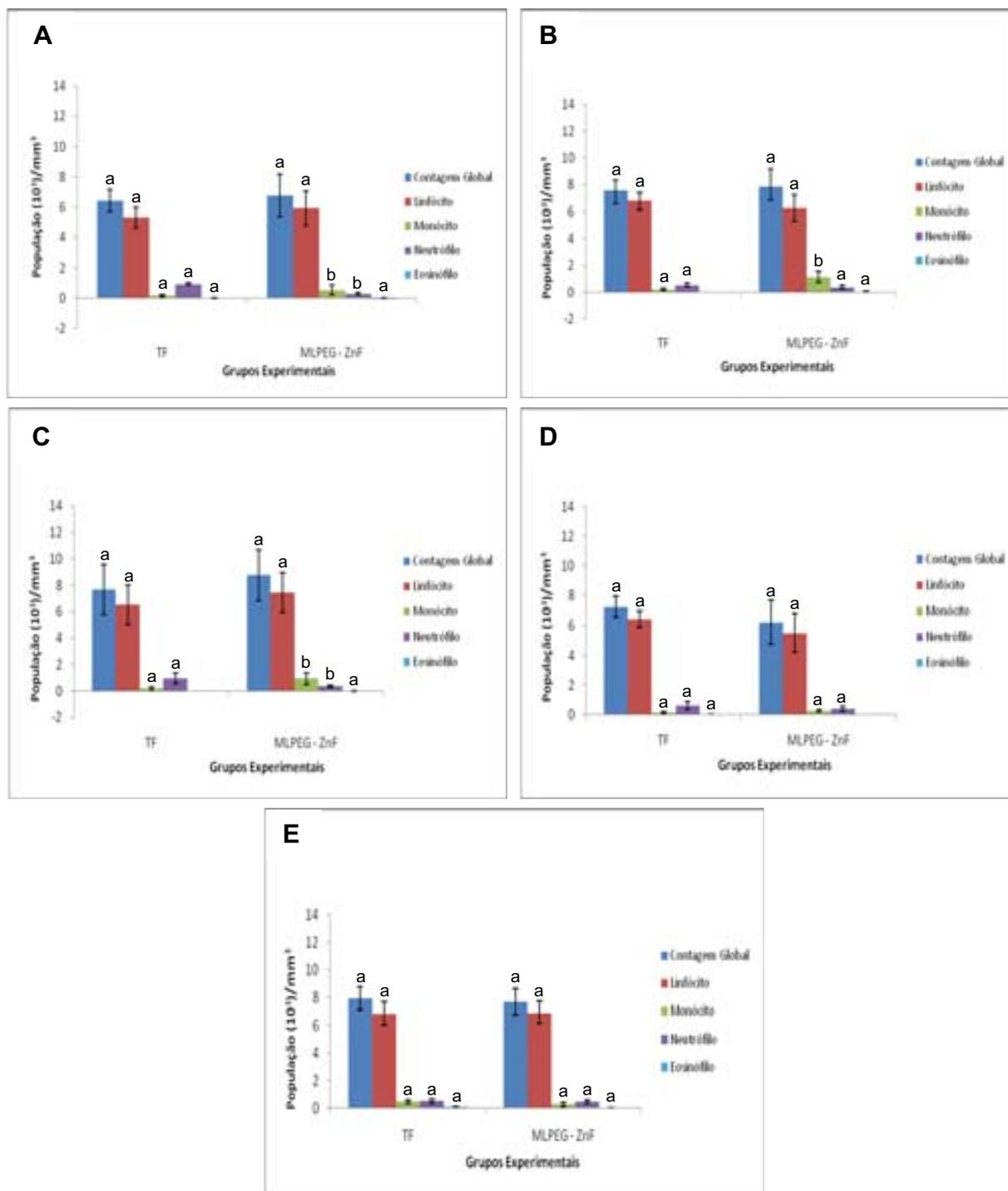


Figura 26: Efeitos do campo magnético (AC) e laser (670 nm) sobre a frequência de leucócitos no sangue de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de **ML_{PEG}-ZnF**. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao campo magnético (AC) e ao laser (670 nm). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

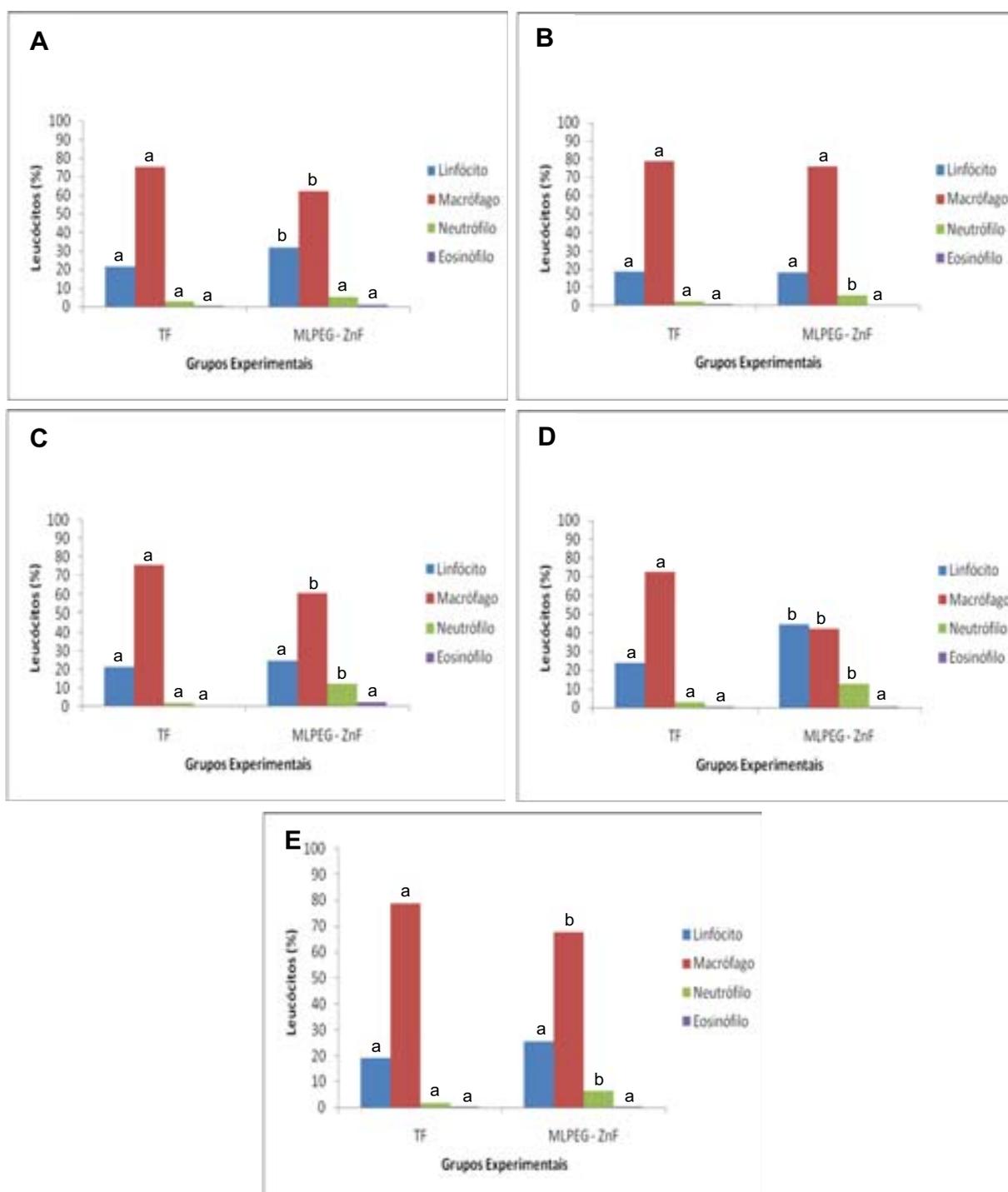


Figura 27: Efeitos do campo magnético (AC) e laser (670 nm) sobre a freqüência de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de **ML_{PEG}-ZnF**. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao campo magnético (AC) e ao laser (670 nm). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

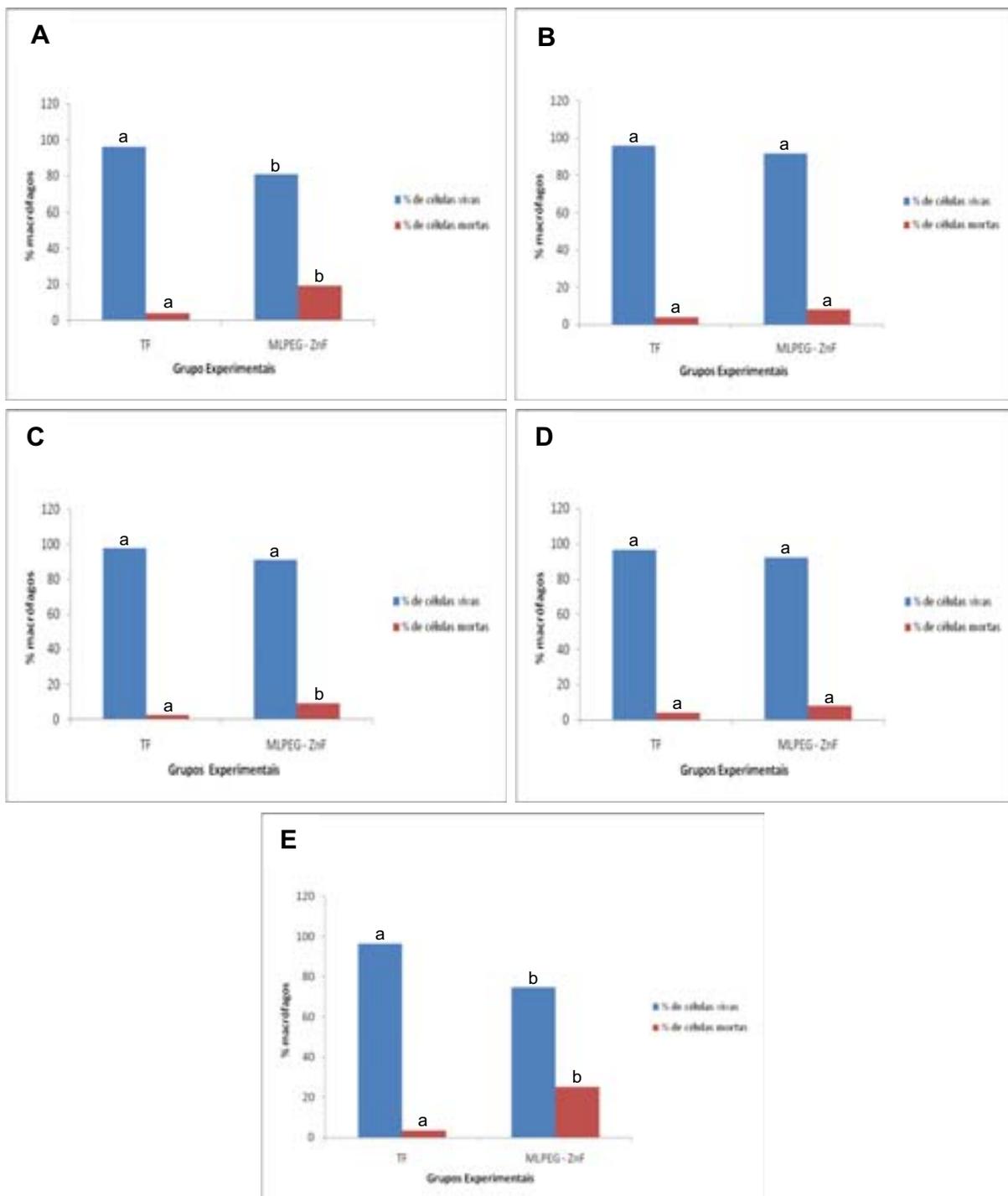


Figura 28: Efeitos do campo magnético (AC) e laser (670 nm) sobre a frequência de células vivas e mortas no fluido peritoneal de camundongos previamente tratados com injeção intraperitoneal de **ML_{PEG}-ZnF**. Células obtidas: (A) 30 minutos, (B) 6 horas, (C) 1 dia, (D) 2 dias e (E) 7 dias após a exposição ao campo magnético (AC) e ao laser (670 nm). Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 5: Efeitos da exposição ao campo magnético e ao laser (670 nm) na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos tratados com **ML_{PEG}-ZnF**.

Tempo após tratamentos	Grupo	MN - EPC ^a	% EPC ^a
1 dia	Controle	3,4 ± 2,1 ^a	49,4 ± 2,8 ^a
	TF 7,4	5,4 ± 1,1 ^a	49,4 ± 2,4 ^a
	L _{PEG}	2,8 ± 2,2 ^a	48,8 ± 3,5 ^a
	L _{PEG} - ZnF	2,4 ± 1,1 ^a	47,0 ± 1,3 ^a
	ML _{PEG}	3,4 ± 2,1 ^a	47,5 ± 2,5 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	3,2 ± 2,7 ^a	46,7 ± 1,0 ^a
2 dias	Controle	5,2 ± 2,2 ^a	49,3 ± 3,0 ^a
	TF 7,4	3,2 ± 1,3 ^a	48,3 ± 2,4 ^a
	L _{PEG}	5,4 ± 1,8 ^a	46,7 ± 1,3 ^a
	L _{PEG} - ZnF	2,2 ± 2,5 ^a	47,8 ± 2,8 ^a
	ML _{PEG}	4,6 ± 3,6 ^a	49,1 ± 2,8 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	3,6 ± 2,7 ^a	48,7 ± 2,9 ^a
7 dias	Controle	1,0 ± 1,1 ^a	49,1 ± 0,7 ^a
	TF 7,4	1,6 ± 1,1 ^a	49,2 ± 1,1 ^a
	L _{PEG}	1,4 ± 1,1 ^a	47,5 ± 1,1 ^a
	L _{PEG} - ZnF	2,2 ± 2,2 ^a	46,9 ± 2,2 ^a
	ML _{PEG}	2,0 ± 1,4 ^a	46,9 ± 1,4 ^a
	ML _{PEG} - ZnF	3,2 ± 2,3 ^a	46,0 ± 2,3 ^a
Controle Positivo (CF)		50,6 ± 10,0 ^b	42,0 ± 3,0 ^b

MN EPC = Frequência de micronúcleos observados em eritrócitos policromáticos; **%PCE** = Porcentagem de eritrócitos policromáticos; **CF** = Ciclofasfamida. ♦ Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

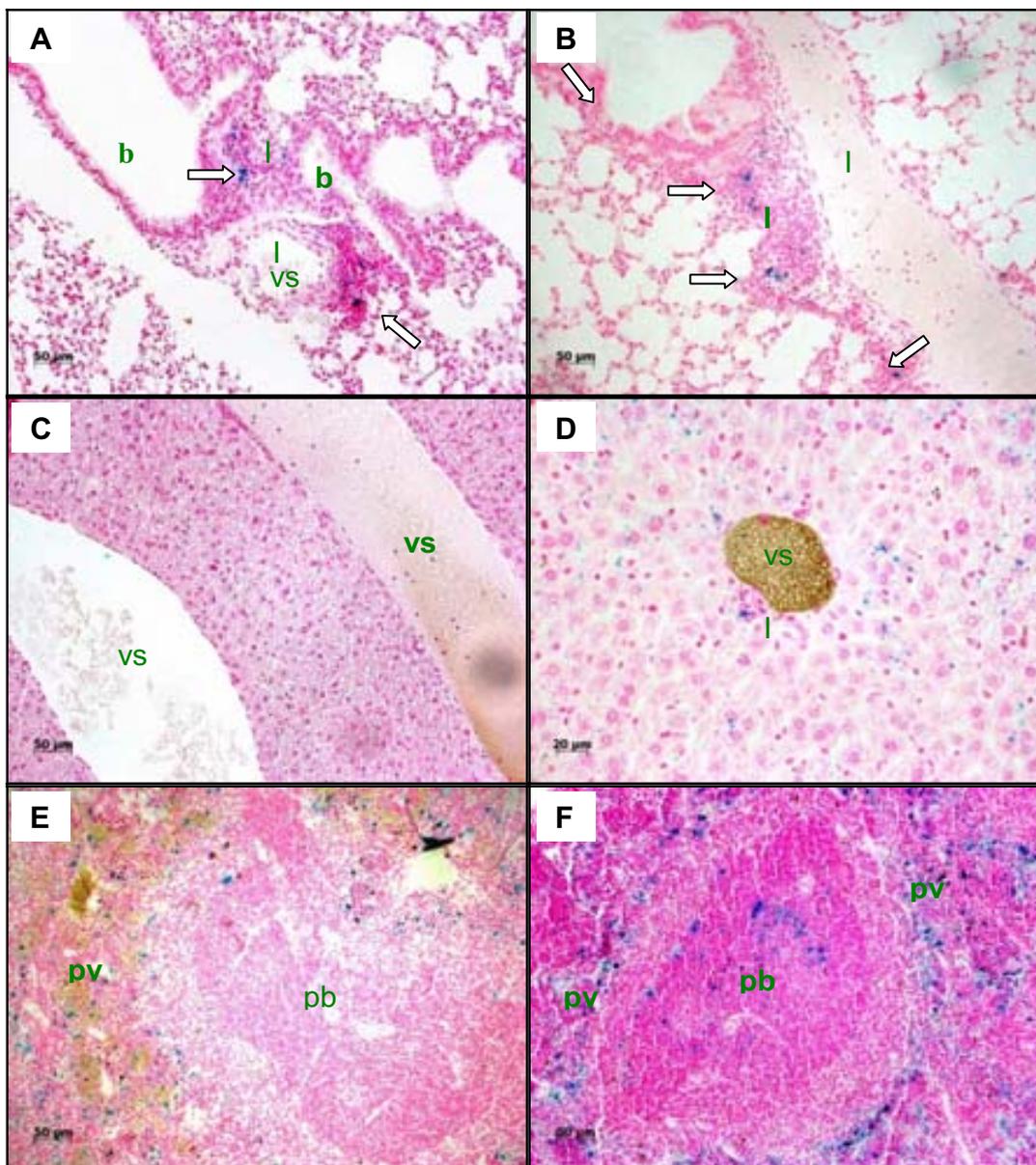


Figura 29: Camundongos tratados com as amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas exposto ao campo magnético e laser. Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão (A e B), fígado (C e D) e baço (E e F) de camundongos FASE 5. Em A e B, pulmão de animal tratado $ML_{PEG-ZnF}$. Note extenso infiltrado inflamatório (I) na parede de vasos sanguíneos (vs) ou bronquíolos (b), sempre associados à presença de partículas (setas). Fígado de animais tratados (D) apresentam alguns poucos infiltrados inflamatórios (I), quando comparados ao grupo controle (C). Em F, baço de animal tratado $ML_{PEG-ZnF}$ (7 dias) exibindo marcação na polpa vermelha (PV) e branca (PB) do baço, padrão diferente ao apresentado no controle (E). Coloração por H&E em B, e pelo método de Pells em A, C, D, E e F.

4.5 Etapa 6 – Magnetohipertermia (MHT) e/ou Terapia Fotodinâmica (TDF) em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich

Esta etapa visou verificar a possível remissão tumoral em animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich que receberam injeção da amostra de ML_{PEG}-ZnF e foram em seguida submetidos ao campo magnético (MHT) e/ou ao laser (TDF), por meio avaliação das regiões organizadoras de nucléolos (AgNORs), contagem de células claras e escuras, avaliação de viabilidade celular, contagem diferencial de leucócitos, peso corpóreo, volume ascítico, qualidade do líquido ascítico no tumor de Ehrlich e análise do tempo de vida.

4.5.1 Regiões organizadoras de nucléolo argentafins (AgNOR)

Com a técnica de coloração de AgNOR regiões organizadoras de nucléolos aparecem como estruturas intranucleares pequenas e irregulares de cor marrom-café a preta.

Para avaliar a capacidade proliferativa das células do tumor por meio da investigação das AgNOR, animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) foram tratados com ML_{PEG}-ZnF e distribuídos em 5 diferentes grupos de tratamento (n = 7): 1) animais portadores de TAE, considerado grupo controle nesta etapa experimental e denominado TAE; 2) animais tratados com ML_{PEG}-ZnF; 3) animais tratados com ML_{PEG}-ZnF e submetidos ao AC; 4) animais tratados com ML_{PEG}-ZnF e submetidos ao laser; e 5) animais tratados com ML_{PEG}-ZnF e submetidos ao AC e ao laser.

No grupo TAE e no grupo tratado apenas com ML_{PEG}-ZnF, as AgNOR apresentaram-se predominantemente pequenas, dispersas por todo o núcleo e em número significativamente maior que nos outros grupos, muitas das vezes incontáveis (Figuras 29 A e 29 B). E nos demais grupos, as AgNOR estavam fortemente unidas, constituindo estruturas argirofílicas grandes e médias, com formato arredondado ou irregular, presentes em pequeno número, preenchendo parcialmente o nucléolo e, em

alguns casos, eram pequenas e encontravam-se dispersas pelo núcleo (Figuras 29 C, D, E e F).

Estatisticamente, todos os grupos apresentaram diferenças entre si, exceto os grupos que, quando tratados com ML_{PEG}-ZnF, eram submetidos ao laser ou ao AC e ao laser (Tabela 6). Os dados mostram que o tratamento de animais com TAE com a amostra ML_{PEG}-ZnF induz aumento nos pontos AgNOR e que esses são ainda mais numerosos (pico máximo) se após esse tratamento forem submetidos ao AC. Entretanto, a exposição ao laser após o tratamento dos animais TAE com ML_{PEG}-ZnF reduziu significativamente os pontos AgNOR observados após a administração da amostra, com ou sem a concomitante exposição ao AC. A exposição ao laser parece diminuir os efeitos da exposição ao AC (Tabela 6).

Tabela 6: Média do número de pontos AgNOR em núcleos de células do tumor ascítico de Erlich.

Grupos Experimentais	Média de AgNOR
TAE	3,02 ± 0,23 ^a
TAE + ML _{PEG} -ZnF	6,79 ± 0,78 ^b
TAE + ML _{PEG} -ZnF + campo magnético	9,69 ± 1,36 ^c
TAE + ML _{PEG} -ZnF + Laser	4,97 ± 0,68 ^d
TAE + ML _{PEG} -ZnF + campo magnético + Laser	5,07 ± 0,98 ^d

Letras diferentes nos tratamentos mostram diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

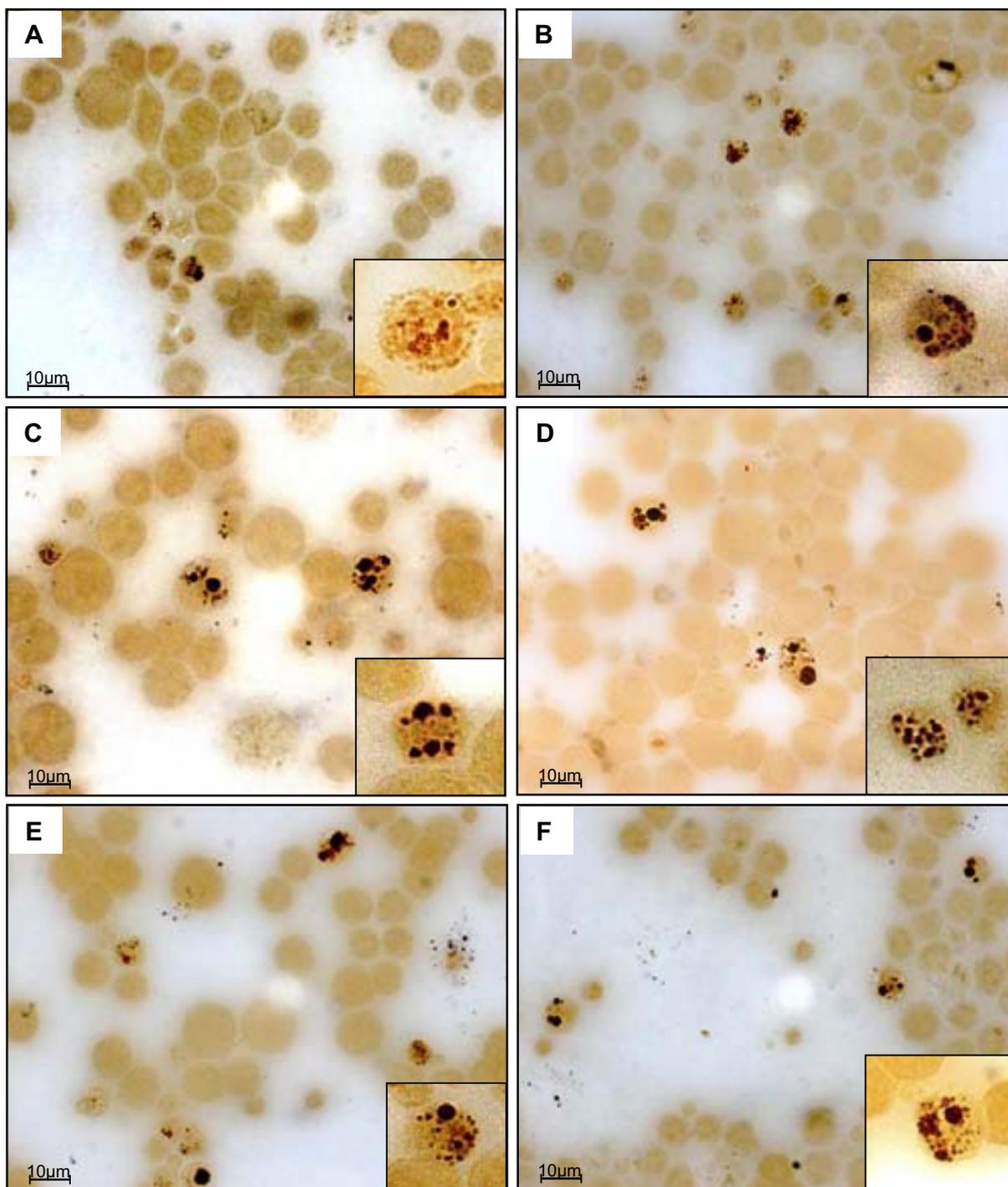


Figura 30: Amostras do líquido ascítico de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, corado pela prata. Os pontos AgNOR estão corados em marrom-café. A) TAE; B) $ML_{PEG-ZnF}$; C) $ML_{PEG-ZnF}$, submetido ao campo magnético; D) $ML_{PEG-ZnF}$, submetidos ao laser (670 nm); E) e F) $ML_{PEG-ZnF}$, submetido ao campo magnético e ao laser (670 nm).

4.5.2 Viabilidade das células do líquido ascítico

Os resultados do teste de viabilidade demonstram que ocorreu redução significativa da viabilidade celular (e concomitante aumento na frequência de células mortas) após o tratamento com a amostra ML_{PEG}-ZnF, mas apenas nos grupos subsequentemente expostos ao AC ou ao laser, quando comparados ao TAE (Figura 30).

O tratamento com ML_{PEG}-ZnF com exposição ao AC apresentou aumentos na frequência de células mortas de 21,66%, 17,17%, 8,54% e 15,13%, respectivamente em relação ao controle TAE, ML_{PEG}-ZnF, ML_{PEG}-ZnF com exposição ao laser e ML_{PEG}-ZnF com exposição ao AC e laser. Por sua vez, o tratamento com ML_{PEG}-ZnF com exposição ao laser apresentou aumentos na frequência de células mortas de 13,12%, 8,63%, 8,54% e 6,59%, respectivamente em relação ao controle TAE, ML_{PEG}-ZnF, ML_{PEG}-ZnF com exposição ao AC e ML_{PEG}-ZnF com exposição ao AC e laser.

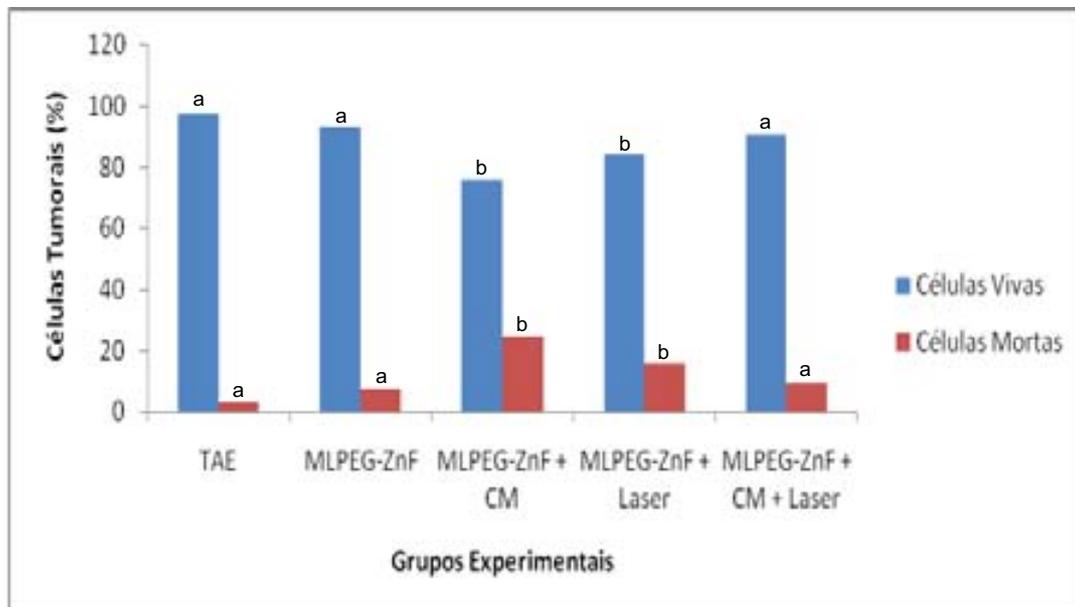


Figura 31: Viabilidade das células do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, tratados com ML_{PEG}-ZnF, submetidos ou não ao campo magnético e/ou laser. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.5.3 Contagem diferencial de leucócitos do líquido ascítico

A análise diferencial de leucócitos foi realizada contando-se o número de células inflamatórias (polimorfonucleares e mononucleares). A figura 31 mostra que ocorreu redução significativa na população de linfócitos, concomitante ao aumento significativo na população de macrófagos, qualquer que tenha sido o tratamento, quando comparado ao controle TAE. Observa-se também que ocorreu aumento na população de neutrófilos, mas apenas após o tratamento com $ML_{PEG-ZnF}$ e $ML_{PEG-ZnF}$ com exposição ao AC. Por outro lado, a população de eosinófilos não foi alterada em qualquer dos tratamentos (Figura 31).

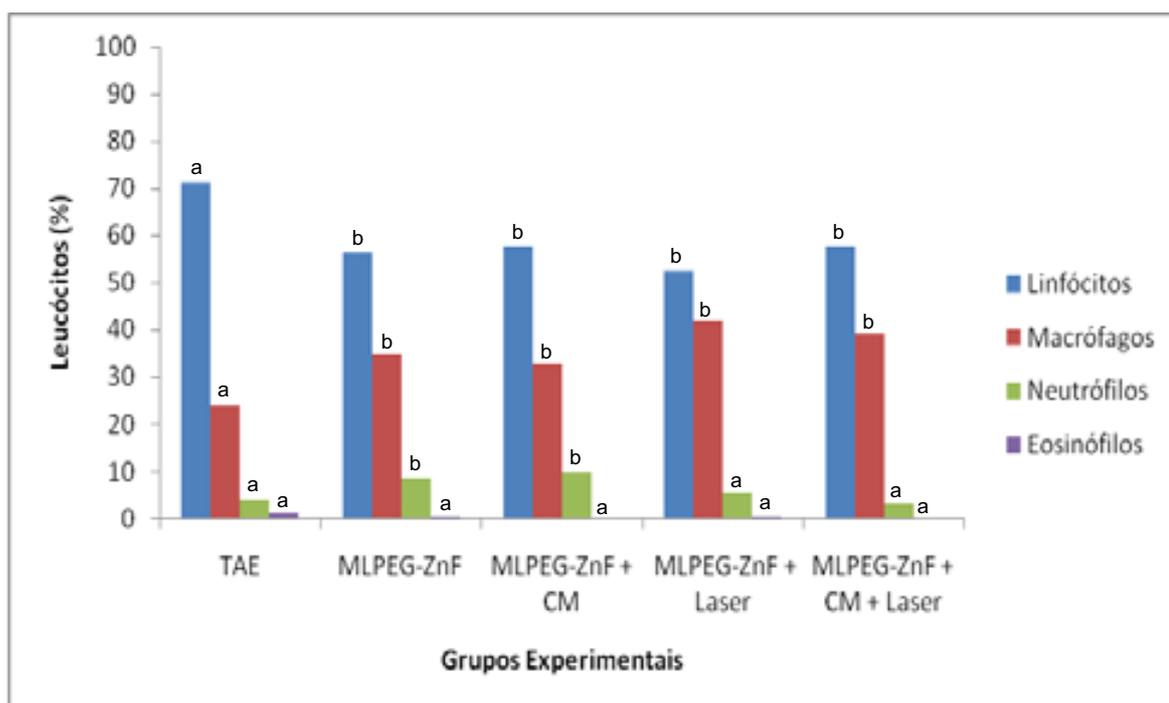


Figura 32: Porcentagem de células inflamatórias no líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, tratados com $ML_{PEG-ZnF}$, submetidos ou não ao campo magnético e/ou laser. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.5.4 Avaliação das células claras e células escuras

A análise dos esfregaços do líquido ascítico mostrou que em todos os grupos tratados houve predomínio de células escuras, arredondadas com citoplasma moderado, basofílico, com poucos vacúolos com bordas definidas e núcleos hipercromáticos, ovais em sua maioria. As células claras, em menor frequência nestes grupos de tratamento, mostram-se com citoplasma abundante, eosinofílico, muitos vacúolos, com núcleo grande e às vezes são multinucleadas (Figuras 33 e 34). No grupo TAE, 32% das células eram claras, e este valor é reduzido a 23%, no grupo tratado com ML_{PEG}-ZnF e submetido ao laser ou a 27% no grupo tratado com ML_{PEG}-ZnF e submetido conjuntamente ao AC e laser. Ainda assim, não houve diferenças significativas nas quantidades de células escuras entre os grupos tratados com ML_{PEG}-ZnF e subsequentemente submetidos ao campo magnético e/ou laser, e destes com o controle (TAE) (Figura 31).

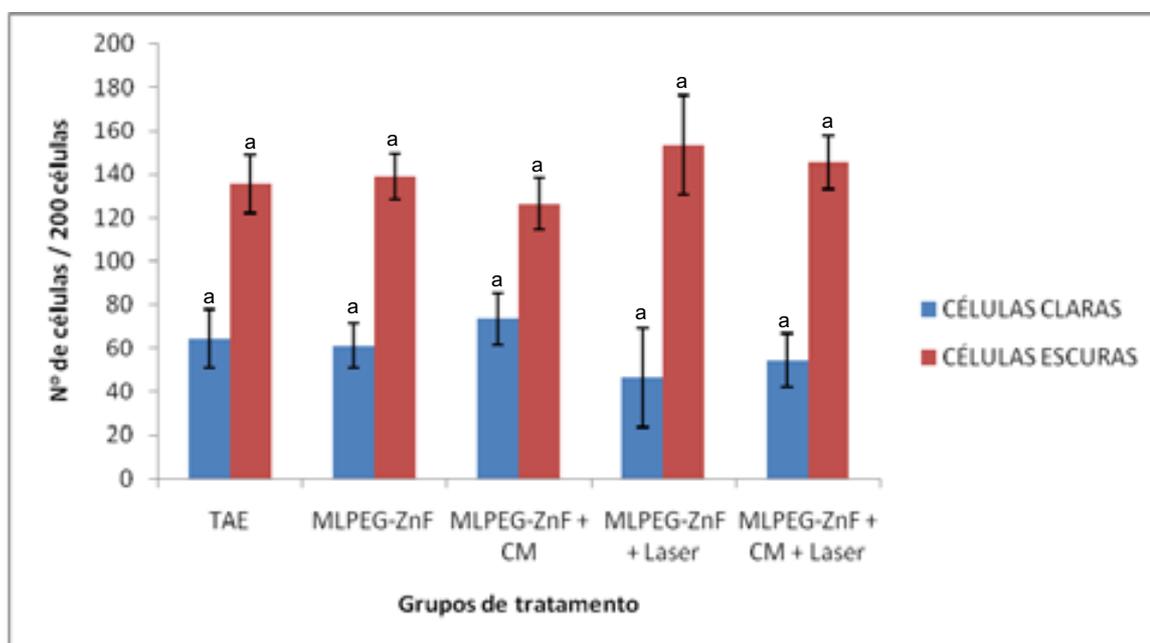


Figura 33: Número de células claras e escuras em 200 células do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, tratados com ML_{PEG}-ZnF, submetidos ou não ao campo magnético e/ou laser. Letras diferentes nas colunas das mesmas populações de células mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

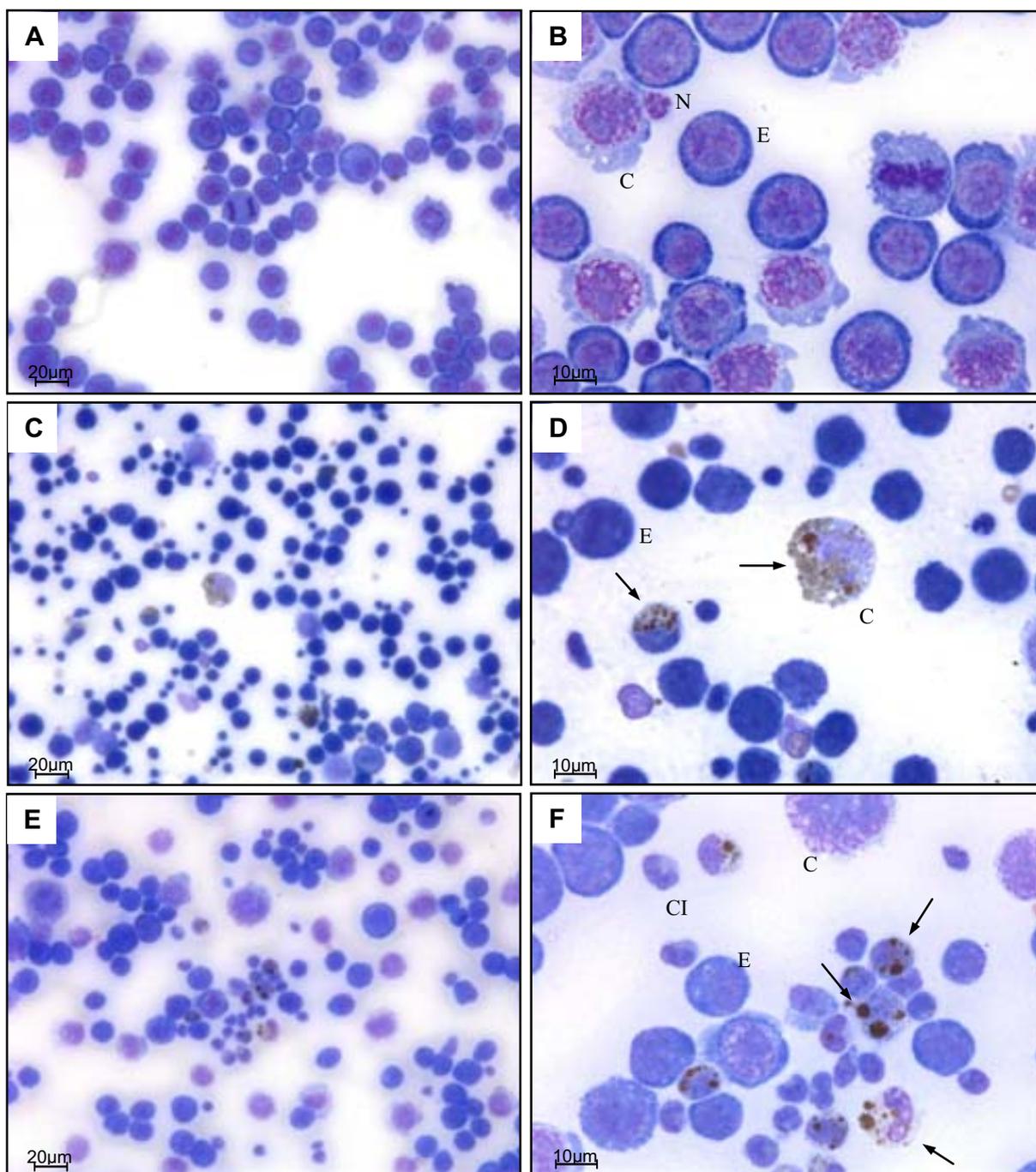


Figura 34: Esfregaços de células do líquido ascítico de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, corados com Giemsa. A) e B) TAE; C) e D) $ML_{PEG-ZnF}$; E) e F) $ML_{PEG-ZnF}$, submetido ao campo magnético; C = célula clara; E = célula escura; CI = Células inflamatórias; As setas indicam aglomerados de NPM no interior das células.

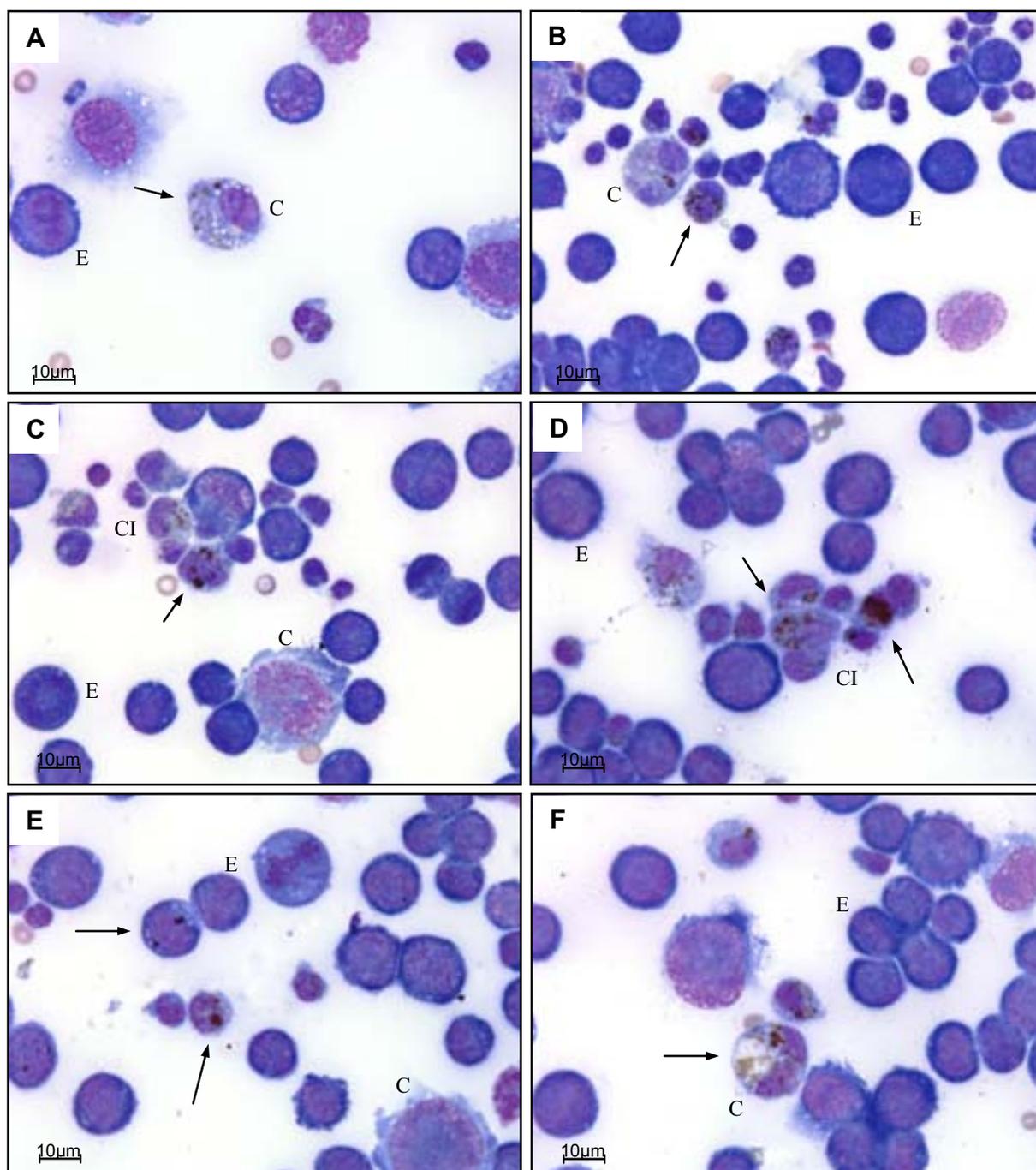


Figura 35: Esfregaços de células do líquido ascítico de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, corados com Giemsa. A) e B) $ML_{PEG}\text{-ZnF}$, submetidos ao laser (670 nm); C), D, E) e F) $ML_{PEG}\text{-ZnF}$, submetido ao campo magnético e ao laser (670 nm). C = célula clara; E = célula escura; CI = Células inflamatórias; As setas indicam aglomerados de NPM no interior das células.

4.5.5 Peso dos animais portadores de TAE

Antes da inoculação das células tumorais, não foram encontradas diferenças significativas no peso dos animais estudados. No entanto, a partir da segunda pesagem começaram a acontecer flutuações deste parâmetro que culminaram, no último dia do experimento, com diferenças significativas entre o grupo controle TAE (maior peso) e todos os outros grupos experimentais, e também entre o grupo tratado com $ML_{PEG-ZnF}$ submetido ao laser (menor peso) e todos os demais (Figura 35 A).

Estes mesmos resultados ficam ainda mais claros quando colocados em forma de ganho de peso, conforme mostra a Figura 35 B.

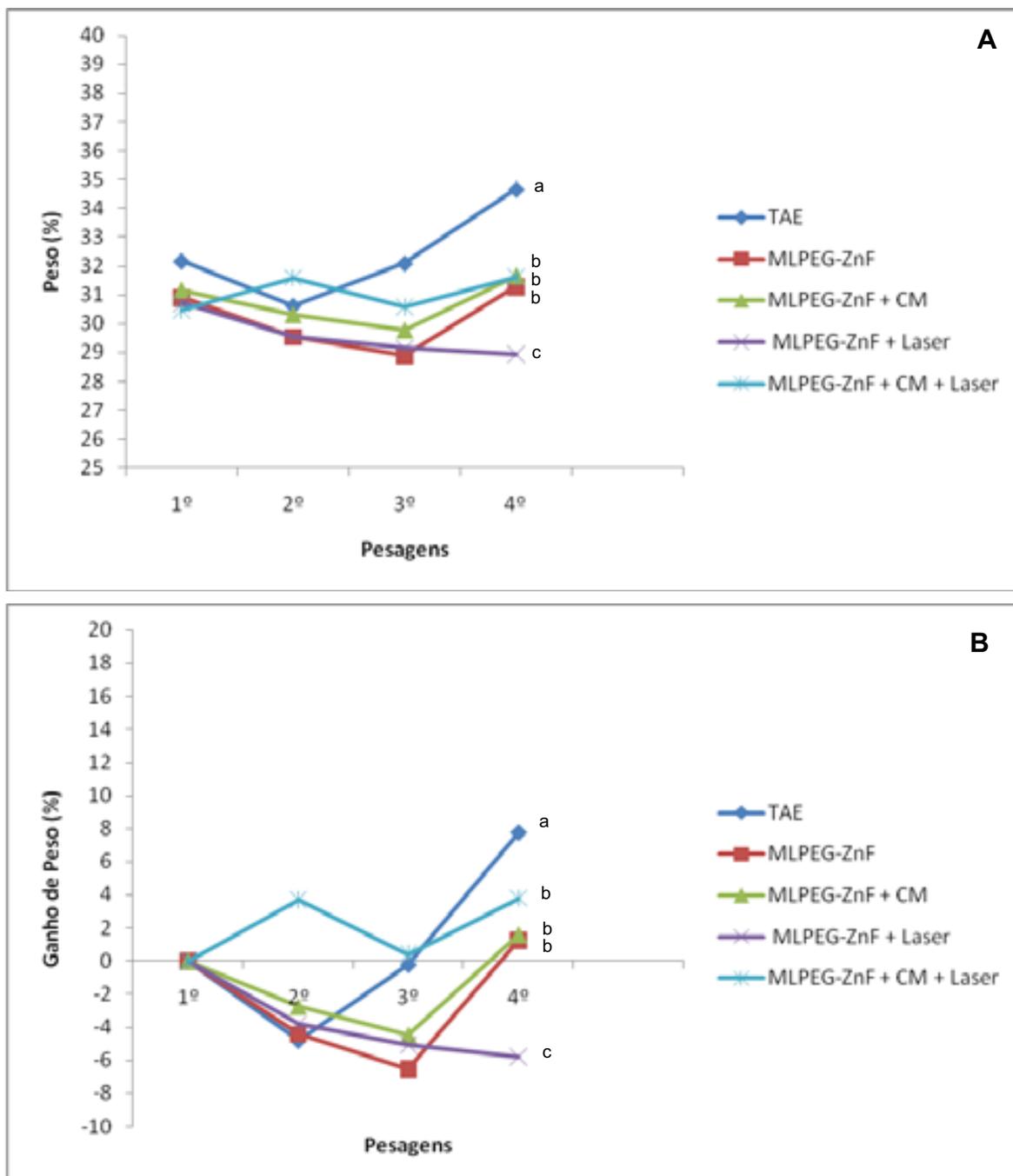


Figura 36: Peso corporal de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, tratados com $ML_{PEG-ZnF}$, submetidos ou não ao campo magnético e/ou laser, ao longo do período experimental. A) Porcentagem do peso e B) Porcentagem do ganho de peso. 1º = pesagem realizada no dia da implantação do TAE; 2º, 3º e 4º = pesagem realizada antes do primeiro, segundo e terceiro tratamentos com a amostra ($ML_{PEG-ZnF}$) e subsequentes terapias (MHT e/ou TFD). Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

4.5.6 Volume do líquido ascítico dos animais portadores de TAE

Os resultados relacionados às mensurações do volume do fluido ascítico podem ser vistos na Figura 36. Os dados mostram que o tratamento com a amostra alterou significativamente o volume do fluido em relação ao observado no controle TAE. Entretanto, nos grupos com tratamento com $ML_{PEG-ZnF}$ submetidos subsequentemente ao AC, ao laser ou simultaneamente ao campo magnético e ao laser, observam-se decréscimos significativos do volume em relação ao grupo controle TAE e ao grupo tratado com a amostra $ML_{PEG-ZnF}$. Estes dados estão em acordo com os valores de peso obtidos na quarta mensuração (Figura 36A).

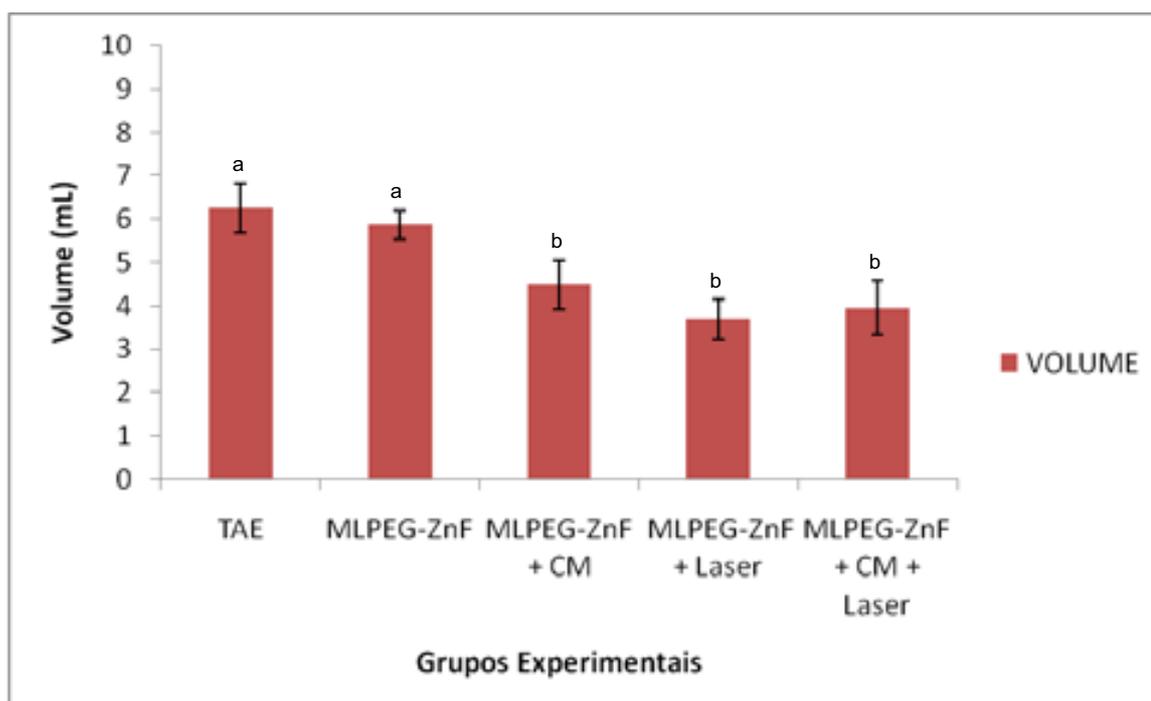


Figura 37: Volume do líquido ascítico de camundongos com tumor de Ehrlich ascítico, tratados com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas, submetidos ou não ao campo magnético e/ou laser. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

4.5.7 Qualidade do líquido ascítico no tumor de Ehrlich

O grau de hemorragia é caracterizado pela frequência crescente de eritrócitos no líquido ascítico e classificado em graus zero a quatro (Figura 11).

Os animais do grupo TAE e do grupo tratado com $ML_{PEG-ZnF}$ apresentaram grau de hemorragia das classes 2 e 3, estágios em que o fluido ascítico apresenta aspecto fibrinoso e hemorrágico. Os animais do grupo $ML_{PEG-ZnF}$ submetidos ao AC apresentaram fluido ascítico das classes 1 e 2, com predomínio da classe 1, enquanto aqueles tratados com $ML_{PEG-ZnF}$ e submetidos ao AC e ao laser apresentaram fluido ascítico também das classes 1 e 2, porém em sua maioria na classe 2. Todos os animais do grupo $ML_{PEG-ZnF}$ submetidos ao laser foram enquadrados na classe 1.

Estatisticamente, os grupos $ML_{PEG-ZnF}$ submetidos ao AC e $ML_{PEG-ZnF}$ submetidos ao laser foram diferentes dos grupos TAE, dos tratados com $ML_{PEG-ZnF}$ e do $ML_{PEG-ZnF}$ submetido ao campo magnético e laser.

4.5.8 Análise do tempo de vida

O tempo de vida foi avaliado pelo acompanhamento diário de cada grupo experimental, até a ocorrência de morte espontânea. O gráfico da Figura 37 mostra que sobrevivência maior que 20 dias só é observada nos grupos submetidos ao laser

A mediana do tempo de sobrevida (MST) de cada grupo e a porcentagem de aumento do tempo de sobrevida (% ILS) foram utilizados para analisar a possível atividade antitumoral dos tratamentos e também para fazer uma comparação entre os mesmos.

No grupo controle TAE, a MST foi de 15,5 dias, enquanto que os grupos tratados apresentaram MST igual a 15 dias para o $ML_{PEG-ZnF}$, 16 dias, tanto para $ML_{PEG-ZnF}$ submetido ao AC, quanto para $ML_{PEG-ZnF}$ submetido ao campo magnético e laser e 18,5 dias $ML_{PEG-ZnF}$ submetido ao laser.

Em relação à % ILS, foram observadas diferenças estatísticas entre os diversos tratamentos (Tabela 7), sendo o grupo tratado $ML_{PEG-ZnF}$ submetido ao laser o que apresentou maior % ILS (19,35).

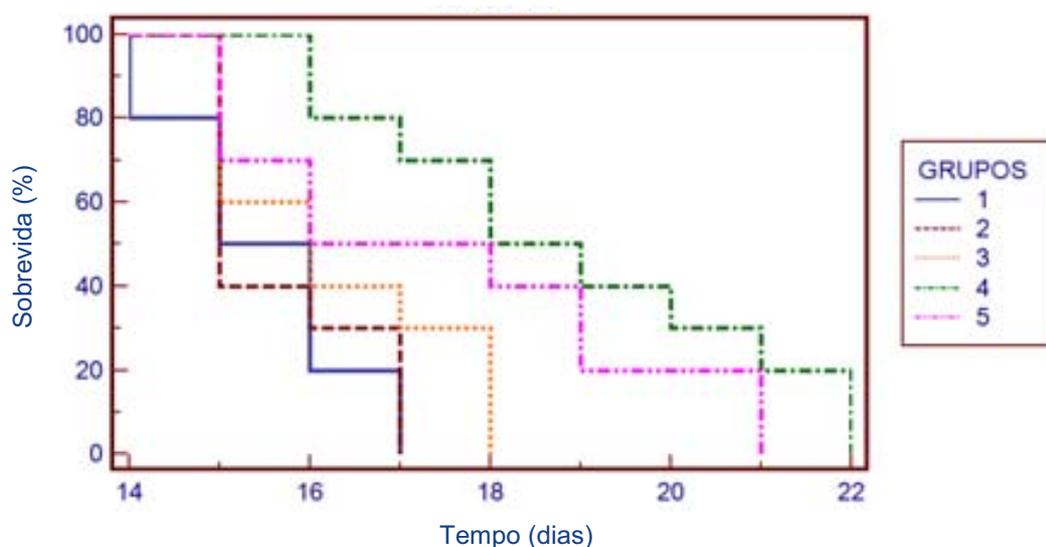


Figura 38: Sobrevivência de animais portadores do tumor de Ehrlich ascítico, tratados com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas, submetidos ou não ao campo magnético e/ou laser. Grupos: 1 = controle TAE; 2 = $ML_{PEG-ZnF}$, 3 = $ML_{PEG-ZnF}$ submetido ao campo magnético, 4 = $ML_{PEG-ZnF}$ submetido ao laser e 5 = $ML_{PEG-ZnF}$ submetido ao campo magnético e laser. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 7: Porcentagem de aumento do tempo de sobrevivência (% ILS) de camundongos com tumor de Ehrlich ascítico, tratados com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas, submetidos ou não ao campo magnético e/ou Laser.

Grupos Experimentais	% ILS	
TAE	0,0	a
TAE + ML _{PEG} -ZnF	-3,22	b
TAE + ML _{PEG} -ZnF + campo magnético	3,22	c
TAE + ML _{PEG} -ZnF + Laser	19,35	d
TAE + ML _{PEG} -ZnF + campo magnético + Laser	3,22	c

Letras diferentes nas nos tratamentos mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram investigados os efeitos biológicos da administração da amostra de magnetolipossomas fotossensibilizados com zinco-ftalocianina (ML_{PEG}-ZnF) e sua eficiência nos processos de Magnetohipertermia (MHT) e Terapia Fotodinâmica (TFD) em camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).

O trabalho foi desenvolvido em seis etapas, sendo a primeira delas a determinação do tempo de exposição ao AC em animais tratados com uma amostra de magnetolipossomas furtivos constituídos por nanopartículas à base de ferrita de cobalto recobertas com citrato (FeCoML). As etapas 2 a 5 tiveram como objetivo a avaliação da toxicidade de amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas (L_{PEG}, ML_{PEG}, L_{PEG}-ZnF e ML_{PEG}-ZnF), em animais saudáveis, submetidos ou não ao AC e/ou laser.

E a sexta etapa visou verificar a possível remissão tumoral em animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich que receberam injeção da amostra ML_{PEG}-ZnF e foram em seguida submetidos à MHT e/ou TFD.

5.1 – Considerações gerais sobre os testes biológicos

Para que se tenha a aprovação de novos materiais para diagnóstico e tratamento de diversas doenças é necessária a realização de variados testes, a fim de prover informações de eficácia e segurança junto aos órgãos regulatórios. Os testes envolvem uma fase pré-clínica, *in vitro* e *in vivo*, em diferentes espécies animais. Uma vez que resultados favoráveis tenham sido obtidos, iniciam-se as etapas de testes clínicos em seres humanos, avaliando-se os parâmetros de segurança de novo material, como a tolerância, dose adequada, farmacocinética e efeitos adversos (ANVISA, 2008).

Os testes de toxicidade em animais são freqüentemente baseados em métodos hematológicos que visam estabelecer a existência e a extensão de alterações de componentes do sangue na presença de material exógeno. A contagem de leucócitos, o teste de viabilidade celular e o teste de micronúcleo são fortes indicadores de

alterações hematológicas e, juntamente com testes histológicos, formam um conjunto que avalia com sucesso materiais nanoestruturados.

A análise citométrica constitui uma ferramenta importante no estudo de novos materiais. A interação de nanoestruturas com as células pode induzir alterações nas populações leucocitárias características de processos inflamatórios (FREITAS et al., 2002; GARCIA et al., 2002). Se as alterações não são severas nem persistem por longo tempo, podem ser consideradas como uma resposta normal do hospedeiro na presença de corpos exógenos (LACAVA et al., 1999). O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por estímulos variados, dentre os quais pode ser citada a administração de materiais nanoestruturados. As várias populações de leucócitos, tanto os polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), quanto os mononucleares (linfócitos e monócitos), desempenham papel essencial e específico nesse processo (GILMAN et al., 2001; RANG et al., 2004). Na inflamação aguda, os leucócitos migram ao local ou área inflamada dos tecidos danificados (GILROY et al., 2004). Os neutrófilos estão envolvidos na resposta inflamatória inicial, podendo migrar para o local da inflamação pouco tempo depois do reconhecimento de uma partícula estranha (ABBAS; LICHTMAN, 2005; MORALES; DOWNEY, 2003). O aumento na frequência de neutrófilos indica resposta inflamatória aguda, porque estas células respondem rapidamente a estímulos quimiotáticos, ajudando a eliminar partículas estranhas opsonizadas e limitam a extensão de uma reação inflamatória (KIERSZENBAUM, 2008). Por outro lado, a migração de linfócitos é tardia para o foco inflamatório e faz o papel de coadjuvante na progressão inflamatória. Os monócitos têm inúmeras funções relacionadas à inflamação e seu aumento reflete uma resposta rápida do organismo na tentativa de fagocitar partículas estranhas.

Nos estudos de nanoestruturas magnéticas tem sido relatada uma gama muito variável de intensidade de reações, mas, em geral, estas reações são representativas de processo inflamatório brando que ocorre de maneira tempo e dose-dependentes (BRUGIN, 2007; PORTILHO-CORRÊA, 2007).

As interações entre as células e as NPM podem também ser avaliadas por citometria das células peritoneais. De acordo com a literatura, a célula predominante na cavidade peritoneal de camundongos Swiss é o macrófago (GARCIA et al., 2002).

Macrófagos secretam interleucinas, um importante fator das reações inflamatórias responsável pelos eventos que mudam a população da cavidade peritoneal (GARCIA et al., 2002). Evidências de processo inflamatório foram vistas pelo aumento das populações de neutrófilos e linfócitos peritoneais após administração de FM à base de NPM de ferrita de manganês recobertas por citrato (LACAVA et al., 1999).

O teste de viabilidade celular, realizado *in vivo* ou *in vitro*, constitui uma ferramenta amplamente utilizada para averiguar as interações entre diferentes compostos químicos com células e tecidos, permitindo, portanto, avaliar sua toxicidade. A viabilidade celular pode ser testada por diferentes ensaios, entre os quais o teste de exclusão de nigrosina. GUEDES et al. (2004) usaram esse teste após administração intraperitoneal de NPM de magnetita recobertas com carboximetildextrana e observaram que nanopartículas magnéticas podem induzir morte celular, como previamente observado com NPM de magnetita recobertas com dextrana (LACAVA, 2004), DMSA (CHAVES, 2002) ou ácido cítrico (KÜCKELHAUS et al., 2003).

Os macrófagos, por fazerem parte do sistema mononuclear fagocitário, têm papel importante na resposta primária gerada na cavidade abdominal em resposta a agentes estranhos, como as NPM (NEUHAUS; WATSON, 2004). Estudos *in vivo* com NPM variadas mostram que os macrófagos fagocitam as NPM (LACAVA et al., 1999; KÜCKELHAUS, 2004; GUEDES, 2005), o que pode acarretar a formação de radicais livres devido à presença de grandes quantidades de ferro exógeno e também devido ao próprio processo de fagocitose. As espécies reativas de oxigênio podem causar danos às membranas e ao DNA das células (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001), aumentando dessa forma a mortalidade celular. SESTIER et al. (2002) mostraram que o ferro tem papel importante nos processos citotóxicos de algumas amostras de FM, ao demonstrar que o uso de quelantes de ferro podem reverter estes efeitos.

O teste de micronúcleo em eritrócitos de medula óssea de camundongos é amplamente utilizado para avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos (SCHMID, 1975; KRISHNA; HAYASHI, 2000). Além de avaliar a ação clastogênica e/ou aneugênica de drogas e biomateriais, possibilita estimar o tempo específico de ação do mutágeno e de seus efeitos secundários no ciclo celular (MAIER; SCHMID, 1976) e serve também para monitorar populações expostas a agentes genotóxicos (KRISHNA; HAYASHI, 2000;

NORPPA, 2003). O MN é um cromossomo ou fragmento cromossômico que permanece na célula após a expulsão do núcleo principal durante o processo de maturação de eritroblastos a eritrócitos nas células da medula óssea. Eritrócitos policromáticos anucleados (EPC) têm normalmente menos que 30 horas de idade e se coram diferentemente de células mais velhas, conhecidas por eritrócitos normocromáticos (ENC). Substâncias clastogênicas, como a ciclofosfamida, induzem aumento significativo na frequência de MN tanto em EPC quanto em ENC. O mesmo teste revela também a citotoxicidade da amostra para as células da medula óssea, quando a %EPC obtida está distante do valor normalmente esperado (50%) (SCHMID, 1975; SAHU; BASU; SHARMA, 1981; RABELLO-GAY, 1991; RIBEIRO, 2003) O teste é, atualmente, empregado com sucesso nos testes com materiais magnéticos (FREITAS, 2002, GARCIA, 2002, KÜCKELHAUS, 2003, BARBOSA et al., 2005).

As técnicas histológicas visam estabelecer a existência e o grau de toxicidade de diversos agentes para os tecidos, fundamentando-se na avaliação das reações locais e sistêmicas, eventualmente produzidas na presença de material estranho. Entre as várias metodologias utilizadas para verificar os efeitos da administração de agentes estranhos, a morfologia costuma ser a mais utilizada. Muitos dados diferentes podem ser obtidos pela análise morfológica, como a integridade de células e tecidos, a fagocitose, processo inflamatório detectado pela infiltração de células sanguíneas, fibrose e aspectos da biodistribuição. A análise morfológica de camundongos tratados com NPM é usualmente realizada no fígado, baço, pâncreas, timo, pulmões, cérebro e medula óssea coletados de animais submetidos ou não ao procedimento de perfusão. Este trabalho concentrou os estudos histológicos no fígado, baço e pulmões, os três órgãos em que frequentemente são observados aglomerados de NPM. As lâminas microscópicas a serem analisadas são coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) (agregados de coloração marron) ou reação de Perls associado com o Vermelho Rápido Nuclear (agregados de coloração azul ou raramente marron).

Estes testes biológicos têm sido realizados rotineiramente nos Laboratórios de Genética e Morfologia do Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia (CNANO) do Instituto de Ciências Biológicas – UnB, para avaliar a biocompatibilidade de diversas amostras de FM e de ML e seus efeitos em curto, médio e longo prazos: (1) NPM à

base de ferrita de manganês recobertas com ácido cítrico ou tartarato (LACAVA et al., 1999); (2) NPM à base de ferrita de cobalto recobertas com ácido cítrico ou encapsuladas em lipossomas associados a polietilenoglicol (KÜCKELHAUS, 2003); (3) NPM à base de magnetita recobertas por ácido cítrico (GARCIA et al., 2002), DMSA (CHAVES et al., 2002), ácido dodecanóico/ácido etoxilado (FREITAS et al., 2002), dextrana (LACAVA et al., 2003), carboximetildextrana (GUEDES et al., 2005), ácido glucônico (BARBOSA, 2004) e ácido poliaspártico (SADEGHIANI, 2004); (4) NPM à base de maghemita recobertas por citrato (BRUGIN, 2007), poli-fosfato (PORTILHO-CORRÊA, 2007), encapsuladas em polímeros de albumina (ESTEVANATO, 2008; SALDANHA, 2007), recobertas com citrato e encapsuladas em lipossomas furtivos (COELHO, 2008) ou ainda recobertas com DMSA e associadas a anfoterina B (PEIXOTO, 2008).

Baseado nestes testes biológicos se concluiu que algumas destas formulações apresentam resultados promissores para futuras aplicações biomédicas (KÜCKELHAUS, 2003; CHAVES et al., 2002; GARCIA et al., 2002; GUEDES et al., 2005; BRUGIN, 2007; PORTILHO-CORRÊA, 2007; ESTEVANATO, 2008; COELHO, 2008; PEIXOTO, 2008), enquanto outras amostras demonstraram alta toxicidade e mutagenicidade, dose e tempo dependentes (LACAVA et al., 1999; FREITAS et al., 2002; CHAVES et al., 2002; BARBOSA, 2004).

5.2 Considerações sobre a determinação do tempo de exposição ao campo magnético (AC) em animais expostos a amostra de magnetolipossomas (FeCoML) (etapa 1)

Estudos prévios com uma amostra de magnetolipossomas constituída de nanopartículas magnéticas (NPM) à base de ferrita de cobalto recobertas com ácido cítrico e encapsuladas em lipossomas furtivos (FeCoML) mostraram biocompatibilidade e padrão de biodistribuição adequados (KÜCKELHAUS, 2003), sugerindo seu uso em aplicações biomédicas, como magnetohipertermia.

Para que esta amostra pudesse ser usada no procedimento de magnetohipertermia (MHT), as condições de funcionamento do equipamento gerador de campo magnético de frequência alternada (AC) precisavam ser estabelecidas, especialmente porque não existem relatos na literatura do uso de NPM à base ferrita de cobalto para realizar esta terapia. No grupo de pesquisadores do CNANO, testes anteriores foram feitos apenas com amostra magnética constituída por NPM à base de magnetita (GUEDES et al., 2004).

A administração intraperitoneal da amostra FeCoML não induziu morte em animais tratados durante um período de 60 dias e observações clínicas não revelaram nenhuma aderência dos órgãos peritoneais, reação inflamatória ou dano tecidual no peritônio. Os animais não apresentaram nenhuma apatia ou irritabilidade depois de qualquer tempo de exposição.

As alterações apresentadas na análise citométrica do sangue periférico e fluido peritoneal de animais tratados com FeCoML ocorreram principalmente 24 horas após exposição ao AC durante 5 ou 10 minutos. Essas alterações estão relacionadas ao aumento da população de macrófagos e neutrófilos 30 minutos após a exposição ao AC e ao aumento da população global de leucócitos, linfócitos e neutrófilos no sangue periférico, após 24 horas da exposição ao AC. Foi também observado redução na população de macrófagos e aumento na de neutrófilos no fluido peritoneal, 24 horas após a exposição ao AC. Essas alterações podem ser explicadas pela resposta automática do próprio organismo frente à presença de partículas estranhas, bem como à ação do AC. Sabe-se que os prováveis efeitos causados pela ação do AC estão relacionados com a interferência no metabolismo, diferenciação e comportamentos celulares (BERSANI et al., 1997).

Aumento da contagem de leucócitos ocorre devido à liberação no meio de substâncias químicas por mediadores inflamatórios, estimulando a medula óssea hematogênica a produzir mais leucócitos. Essa inflamação pode ser causada, por muitos fatores, inclusive pelo uso de determinados medicamentos (HUANG et al, 2000). De acordo com a resposta apresentada 24 horas após a exposição ao AC por 10 minutos, pode-se sugerir que o maior tempo de exposição tenha ativado a produção de mediadores inflamatórios, levando ao aumento na população de células brancas no

sangue. O aumento na população de leucócitos no sangue periférico pode está associado com a citotoxicidade revelada pelo teste de micronúcleo após o mesmo período de tempo.

Qualquer que tenha sido o tempo de coleta após a exposição, alterações citométricas só foram observadas após 3 minutos de exposição ao AC.

Os dados obtidos pelo teste de micronúcleo mostraram que a exposição por 10 minutos ininterruptos ao campo magnético induz aumento significativo na frequência de MN em eritrócitos policromáticos, evidenciando efeito genotóxico, resultado este em acordo com dados obtidos por GUEDES et al. (2004) após aplicação de fluido magnético constituído de nanopartículas de magnetita recobertas com carboximetildextrana.

Observou-se também redução no índice de eritrócitos policromáticos (% EPC) após exposição ao AC por 10 minutos, o que sugere atividade citotóxica para as células da medula óssea. Não houve resposta citotóxica com exposição de 3 e 5 minutos ao AC, resultado similar aos encontrados por GUEDES et al. (2004).

Os dados obtidos permitiram concluir que os danos induzidos pelo AC em células normais na presença da amostra FeCoML estão relacionados ao tempo de exposição e sugeriram que o tempo de exposição de 3 minutos pode ser utilizado nos experimentos de magnetohipertermia realizados neste trabalho, com efeitos adversos mínimos.

5.3 Considerações sobre as amostras investigadas

Com base nos resultados de biocompatibilidade da amostra FeCoML (KÜCHELHAUS, 2003) e de seus testes na primeira etapa deste trabalho e ainda com o intuito de desenvolver uma amostra apta a realizar, além da Magnetohipertermia (MHT), também a Terapia Fotodinâmica (TFD), foi sintetizada uma nova amostra constituída de nanopartículas magnéticas (NPM) à base de ferrita de cobalto recobertas com ácido cítrico ($D_{rx} = 10,8 \text{ nm}$) encapsuladas em lipossomas furtivos (PEG) contendo o fotossensibilizador Zinco-ftalocianina (ZnF), e que foi denominada $ML_{PEG}\text{-ZnF}$, conforme

relatado em OLIVEIRA et al. (2006). Essa amostra continha $4,8 \times 10^{14}$ partículas/mL, o dobro da concentração da amostra FeCoML.

A propriedade de ser biocompatível constitui um dos pré-requisitos básicos para aplicação de novos materiais em terapias para tratamento e diagnóstico do câncer. A biocompatibilidade e também a biodistribuição de nanomateriais dependem de características como tamanho, composição química, características superficiais, solubilidade, formato, estabilidade. Esses parâmetros podem modificar a captação pela célula, a ligação a proteínas, tempo de permanência na circulação, o deslocamento até o local alvo e a possibilidade de causar danos teciduais (LEMKE et al., 2004; NEL et al., 2006).

Está bem documentado na literatura a importância que os diâmetros das nanopartículas podem ter na biocompatibilidade/toxicidade das amostras. Testes realizados com amostras contendo nanopartículas à base de ferrita de cobalto, recobertas por ácido cítrico, sintetizadas nas mesmas condições, mas com diâmetros distintos (5, 10,8 e 15,6 nm), mostraram que as NPM com tamanhos de 15,6 nm causam maior toxicidade do que as demais (KÜCHELHAUS, 2003). Outras características, além da biocompatibilidade, estão também relacionadas ao seu diâmetro. Partículas que apresentam diâmetro menor que 10 nm são rapidamente removidas por meio do extravasamento e depuração renal. Por outro lado, aquelas maiores que 200 nm são facilmente removidas pelos fagócitos, resultando em menor tempo de circulação no sangue (GUPTA; GUPTA, 2005). No entanto, partículas com diâmetro entre 10 e 100 nm apresentam tamanho ideal, pois reduzem a captura pelo sistema mononuclear fagocítico (SMF), permanecendo mais tempo em circulação, além de sua habilidade de penetrar em pequenos capilares de modo que possam ser melhor biodistribuídas. Estes dados explicam porque as NPM escolhidas para compor a amostra $ML_{PEG-ZnF}$ tinham diâmetro de 10,8 nm. Além disso, partículas muito pequenas, com diâmetro inferior a 4 - 7 nm, podem perder a capacidade de responder ao AC de frequência alternada, inviabilizando a MHT. E ainda outro aspecto interessante é que este diâmetro garante que na síntese dos magnetolipossomas, cada um deles não encapsule mais que duas NPM, de modo a não comprometer seu tamanho final (KÜCHELHAUS, 2003).

Os lipossomas furtivos utilizados para encapsular as NPM de ferrita de cobalto apresentaram diâmetro muitas vezes maior do que o das NPM que os constituem, podendo alcançar valores maiores que 100 nm. Ainda assim, este tamanho é muito menor do que o observado nos menores capilares do organismo (5 - 6 μm) (MULLER; KECK, 2004), o que o torna adequado para aplicações biomédicas (ROMBERG et al., 2007). O tamanho pode ainda aumentar a seletividade por determinados tecidos, inclusive para o tecido tumoral. As nanoestruturas podem ser capazes de penetrar em tumores devido às características da vasculatura neoplásica, que tipicamente apresenta poros com diâmetros entre 100 a 1000 nm (HUGUES, 2005), enquanto que nos tecidos saudáveis esses espaços variam em torno de 10 nm. De modo que, nanoestruturas menores que os poros presentes na vasculatura tumoral e maiores do que os poros de tecidos saudáveis apresentam, provavelmente, tamanhos muito adequados nas terapias antineoplásicas (HUGUES, 2005). Estas observações se aplicam sobretudo a tumores sólidos, o que não se adequa ao tumor líquido pesquisado neste trabalho.

O tipo de cobertura das NPM é outro fator relacionado à biocompatibilidade e estabilidade dos sistemas nanoestruturados. O encapsulamento das NPM em vesículas lipossomais associadas ao PEG tem potencial de conferir biocompatibilidade e estabilidade ainda maiores que as verificadas nas amostras de fluidos magnéticos convencionais (KÜCHELHAUS, 2003), uma vez que sistemas lipossomais acarretam baixo reconhecimento pelo sistema fagocítico mononuclear e, em condições adequadas, não se aglomeram nem precipitam rapidamente (SENOIR et al., 1991; ALLEN, 1994; DONG; FENG, 2007).

A constituição química das NPM que compõem os magnetolipossomas é também um fator importante na determinação de sua biocompatibilidade. Amostras de composições diversas exibem comportamentos também variados. Fluidos magnéticos contendo nanopartículas à base de ferrita de manganês induziram morte, diarreia, genotoxicidade e inflamação severa em camundongos após o tratamento (LACAVA et al., 1999a), outro à base de NPM de magnetita com dupla cobertura de álcool etoxilado e ácido dodecanóico apresentaram alta toxicidade, enquanto NPM à base de ferrita de cobalto (KÜCKELHAUS, 2003), ou de maghemita (BRUGIN, 2007), ambas recobertas por citrato, mostraram um leve e temporário efeito inflamatório, sem letalidade aos

animais. No presente estudo, ML_{PEG}-ZnF, também à base de NPM de ferrita de cobalto recobertas com citrato induziram efeitos inflamatórios brandos, pequena redução da viabilidade e, o que é notável, nenhuma genotoxicidade ou citotoxicidade nas células da medula óssea.

Em estudos prévios com a amostra ML_{PEG}-ZnF (OLIVEIRA, 2006), foi constatado que a presença das NPM não interfere em suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas e também que a presença do fotossensibilizador não modifica as propriedades magnéticas da mesma. Testes *in vitro* foram realizados e confirmaram que os lipossomas funcionam como excelente veículo, apontando para resultados promissores e relação às duas terapias (MHT e TFD) (OLIVEIRA et al., 2006) Com base nos dados preliminares e por se tratar de um novo material com este potencial, a amostra ML_{PEG}-ZnF foi submetida a um processo de patente (PI 04055730) (em anexo).

5.4 Considerações sobre o tratamento com amostras magnéticas e/ou fotossensibilizadas e exposição ou não ao campo magnético e ao laser (etapas 2 a 5)

Para melhor entendimento dos efeitos biológicos da amostra ML_{PEG}-ZnF e de seu papel na MHT e na TFD, seus constituintes foram utilizados para compor formulações similares: L_{PEG}, ML_{PEG} e L_{PEG}-ZnF. Estas amostras foram investigadas por diferentes testes biológicos (etapa 2), e subsequente exposição ao AC (etapa 3), ou ao laser (etapa 4) ou ainda ao campo magnético e ao laser (etapa 5). Os resultados obtidos estão discutidos a seguir.

5.4.1 Considerações sobre a análise citométrica em animais não portadores de tumor ascítico de Ehrlich (sadios)

A análise citométrica, como ressaltado anteriormente, é um instrumento importante na verificação de indução de processos inflamatórios ou alérgicos por

materiais compostos por nanopartículas magnéticas (KÜCKELHAUS, 2003; BARBOSA, 2004; SADEGHIANI, 2004; BRUGIN, 2007; PORTILHO-CORRÊA, 2007) e foi utilizada para investigar a biocompatibilidade da amostra teste deste trabalho, a $ML_{PEG-ZnF}$, bem como dos sub-sistemas que a compõem, L_{PEG} , ML_{PEG} e $L_{PEG-ZnF}$.

No presente trabalho foram usados como controles animais sem tratamento ou tratados com tampão fosfato. A administração de tampão fosfato, por si só, causou alterações nas populações de células peritoneais (linfócitos e macrófagos) nos tempos iniciais (30 minutos e um dia após administração). É importante salientar este fato porque pode ser correlacionado com as alterações observadas também nos tempos iniciais após administração dos lipossomas furtivos vazios, os quais não portam nanopartículas magnéticas nem fotossensibilizador (L_{PEG}). É também interessante observar que a exposição ao AC após administração intraperitoneal do tampão fosfato levou a alterações nas populações leucocitárias do sangue que podem ser ligeiras, como os decréscimos na população global e na de linfócitos observados 30 minutos após a exposição, mas que também podem ser mais duradouras, como o aumento na população de monócitos verificado 7 dias após a exposição, sugerindo papel importante do campo magnético AC sobre as células leucocitárias.

Os efeitos da administração de L_{PEG} , com ou sem exposição ao campo magnético AC, são similares, brandos e passageiros, como poderia ser esperado de estruturas compostas por lipídeos recobertas por polietilenoglicol e, portanto, potencialmente biocompatíveis. Quando os animais tratados por L_{PEG} são expostos ao laser, os efeitos podem ser considerados mínimos, tendo sido observado apenas o aumento de linfócitos sanguíneos 2 dias após o tratamento. A introdução de nanopartículas magnéticas nesta amostra (ML_{PEG}), entretanto, causa efeitos mais duradouros (7 dias) nas populações leucocitárias, tanto do peritônio, quanto do sangue, sobretudo quando os animais são também expostos ao AC. Alterações em populações de leucócitos após administração de nanopartículas magnéticas contidas em amostras as mais diversas têm sido relatadas na literatura (KÜCKELHAUS, 2003; BARBOSA, 2004; SADEGHIANI, 2004; BRUGIN, 2007; PORTILHO-CORRÊA, 2007). Relatos de estudos de populações leucocitárias após tratamento com amostra magnética e subsequente exposição a AC não foram encontrados na literatura.

A administração da amostra de lipossomas contendo fotossensibilizador (L_{PEG} -ZnF) e subsequente exposição ao laser causa efeitos pouco expressivos nas populações de leucócitos. A única alteração mais significativa foi a diminuição na população de macrófagos observada no sétimo dia após o tratamento.

A associação do fotossensibilizador ZnF ao ML_{PEG} parece aumentar os efeitos sobre as populações das células investigadas. Enquanto os efeitos da amostra ML_{PEG} na população de neutrófilos se manifestaram até o segundo dia após o tratamento, os da amostra ML_{PEG} -ZnF se estenderam até o sétimo dia. A exposição ao AC ou ao laser evidenciou ainda mais os efeitos pró-inflamatórios da amostra ML_{PEG} -ZnF. No entanto, quando os dois procedimentos (campo magnético e laser) foram feitos simultaneamente, estes efeitos diminuíram consideravelmente. De forma geral, as alterações na população global, observadas até no máximo dois dias após tratamento, ocorreram devido a alterações nas populações de linfócitos. Convém frisar que apenas nos tratamentos com a amostra ML_{PEG} -ZnF seguidos de exposição ao AC e ao laser não se verificou alterações nestas populações (global e linfócitos).

A amostra L_{PEG} , com ou sem exposição ao AC causou ligeiro aumento na população de eosinófilos. Alterações nesta população de células não foram observadas com as outras amostras, exceto nos testes com a amostra ML_{PEG} -ZnF, que revelaram uma diminuição de eosinófilos, resultado provavelmente obtido em função do aumento da população global de leucócitos (linfócitos) induzido pela amostra. Os eosinófilos fagocitam e eliminam complexos de antígenos com anticorpos que aparecem em casos de alergia e modulam a inflamação por produzirem moléculas que inativam leucotrienos e histamina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). As amostras testadas neste trabalho não apresentaram efeito alérgico, um resultado interessante para sua aplicação biomédica.

Analisados em conjunto, os dados da citometria obtidos após as aplicações das amostras testadas permitem sugerir que o potencial pró-inflamatório da amostra ML_{PEG} -ZnF pode ser explicado pelos seus diferentes componentes, mas são brandos e, em geral, temporários. Quando após administração das amostras, o animal era submetido também ao AC ou ao laser, as alterações citométricas ficaram em geral pouco mais intensas. Entretanto, quando ambos os procedimentos eram aplicados

simultaneamente, as alterações foram mais tênues, evidenciando o potencial da amostra ML_{PEG}-ZnF nas aplicações da Magnetohipertermia e Terapia Fotodinâmica.

O uso da análise citométrica para avaliar atividade pró-inflamatória de materiais nanoestruturados já está bem fundamentado na literatura. O presente trabalho mostra que este teste também pode contribuir de forma significativa na investigação dos efeitos do campo magnético e do laser sobre as células leucocitárias.

5.4.2 Considerações sobre a análise genotóxica e citotóxica em animais não portadores de tumor ascítico de Ehrlich (sadios)

Como frisado anteriormente, o propósito do teste do micronúcleo em eritrócitos de mamíferos é identificar substâncias que causam danos citogenéticos, sejam eles clastogênicos ou aneugênicos.

O teste de MN realizado neste trabalho não evidenciou qualquer efeito citotóxico ou genotóxico relacionados a qualquer uma das amostras testadas. A ausência de genotoxicidade e de citotoxicidade também foi verificada em outros estudos realizados com materiais magnéticos (ESTEVANATO, 2008; COELHO, 2008; BRUGIN, 2007). O controle positivo empregado demonstrou a confiabilidade da técnica, pois os animais expostos à ciclofosfamida sofreram significativo aumento na frequência de MN em EPC.

Tais resultados assinalam que as amostras testadas apresentam biocompatibilidade que evidenciam potencial nas aplicações da Magnetohipertermia e Terapia Fotodinâmica, sem que gere conseqüências adversas ao organismo.

5.4.3 Considerações sobre a viabilidade de células peritoneais em animais não portadores de tumor ascítico de Ehrlich (sadios)

O teste de viabilidade celular, como citado anteriormente, constitui ferramenta útil no estudo da toxicidade de diferentes materiais, inclusive os magnéticos. No presente trabalho foi observado que a amostra ML_{PEG}-ZnF, com ou sem submissão ao AC e ao

laser, aumenta a morte das células peritoneais. Na ausência do fotossensibilizador (amostra ML_{PEG}), só há diminuição da viabilidade celular no grupo tratado apenas com a amostra sem posterior submissão ao AC e ao laser e na ausência das NPM (amostra L_{PEG}-ZnF), apenas quando submetida ao laser.

A análise de células do peritônio mostra aglomerados de NPM no seu interior que podem estar relacionadas com a morte celular, considerando que muitas destas células apresentavam-se lisadas. KÜCHELHAUS (2003) observou aumento na frequência de células mortas quando estudou a biocompatibilidade de NPM de ferrita de cobalto recobertas com citrato, e este efeito foi proporcional à quantidade de partículas fagocitadas. Na presença de partículas estranhas, os macrófagos são ativados e produzem substâncias, como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, que podem levar à morte celular. Os dados encontrados podem ser corroborados pelos de SADEGHIANI (2004) que verificou 30% de morte celular após administração de NPM de magnetita recobertas com ácido poliaspártico, de cinco minutos até sete dias após tratamento intraperitoneal. E ainda, pelos achados de que camundongos tratados com fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas com carboximetildextrana também apresentaram diminuição significativa da viabilidade dos macrófagos peritoneais, de 15 minutos até 48 horas (GUEDES et al., 2005).

5.4.4 Considerações sobre a análise histológica em animais não portadores de tumor ascítico de Ehrlich (sadios)

A análise histológica, como já referendado, agrega grande valor para investigar os efeitos dos materiais magnéticos, pois possibilita investigar a biodistribuição e a biocompatibilidade de diversas amostras à base de NPM.

As nanopartículas podem apresentar direcionamento preferencial a certos órgãos devido a características química e/ou físicas de sua composição, inclusive àquelas relacionadas à cobertura ou características de superfícies (MOGHIMI et al., 2005, GARNETT; KALLINTERI, 2006). Tem sido demonstrado que partículas neutras, de carga negativa ou associadas ao polietilenoglicol apresentam seu padrão de

distribuição relacionado às características de superfícies (LEMKE et al., 2004). Segundo BRANNON-PEPPAS e BLANCHETTE (2004) partículas mais hidrofílicas são menos captadas pelo fígado e baço de modo que permaneçam mais tempo em circulação e alcancem outros sítios. Estudos também revelaram que NPM de magnetita recobertas com DMSA tiveram direcionamento específico para o pulmão (CHAVES, 2002), embora já tenham sido estudadas outras NPM que apresentam vasta distribuição (KÜCKELHAUS, 2004).

Apesar de órgãos como fígado, pulmões, baço, pâncreas, rins e cérebro serem comumente avaliados com o propósito de averiguar alterações teciduais e a ocorrência de processos inflamatórios (GARCIA, 2002; KÜCKELHAUS, 2003; LACAVA et al., 2004; SADEGHIANI, 2004; GUEDES, 2005; BRUGIN, 2007), na maioria dos estudos realizados as NPM foram encontradas preferencial nos pulmões, fígado e baço (GARCIA et al., 2002; FREITAS, 2004; LACAVA, 2004; BARBOSA, 2004;). Estes resultados influenciaram a escolha desses três órgãos para análise dos magnetolipossomas magnéticos e/ou fotossensibilizados no emprego da MHT e da TDF. Além do mais, fígado, baço e pulmão são órgãos importantes para a metabolização e resposta imune aos magnetolipossomas das amostras estudadas.

Para fins comparativos e com o intuito de facilitar a identificação das NPM, foram realizados dois métodos de coloração, o habitual H&E e o Perls. Na coloração de H&E, os aglomerados de NPM apresentam-se marrons e são facilmente visualizados (LACAVA et al., 2006), enquanto na coloração de Perls são visualizados em azul intenso. A formação dos agregados azuis observados no parênquima dos órgãos e no interior de células fagocíticas se deve à perda parcial ou total da cobertura das NPM, que ocorre em pH ácido (KUCKELHAUS et al., 2003).

A análise morfológica dos pulmões demonstrou que o magnetolipossomo testado causou alterações no tecido pulmonar. A presença de NPM nas amostras M_{LPEG} e $M_{LPEG-ZnF}$ formaram aglomerados possíveis de serem visualizados após coloração de Perls. Os infiltrados inflamatórios observados nos pulmões são provavelmente decorrentes da migração de células fagocíticas do sangue através de vasos sanguíneos. Nas pranchas observadas, comumente os infiltrados acompanhavam vasos sanguíneos em toda sua extensão. Tal fenômeno provavelmente está associado

à presença do lipossomo, comum a todos os grupos tratados. A marcação para ferro nos infiltrados de pulmões de animais tratados com de M_{LPEG} e $M_{LPEG-ZnF}$ apenas reforçam esta constatação. As amostras M_{LPEG} e $L_{PEG-ZnF}$ mantiveram o padrão de resposta no pulmão. A adição de campo alternado ou laser não levou a qualquer variação nesta resposta perceptível ao microscópio de luz.

Em lâminas de fígado de animais tratados, a única alteração morfológica percebida foi um leve aumento de infiltrados, novamente em grupos que receberam lipossomo vazio (L_{PEG}) ou conjugado ($L_{PEG-ZnF}$). Poucas células de Kupffer apareceram marcadas para ferro pelo método de Perls, quando são considerados os animais submetidos ao tratamento com M_{LPEG} . Esse fato demonstra efeito protetor dos lipossomos aos elementos por eles transportados, uma vez que estas células não são vistas com NPM fagocitadas. Esta é uma evidencia de que as células do tecido hepático respondem ao lipossoma, e a qualquer fator ligado a ele, de uma maneira diferente das células do pulmão. Entretanto, KÜCKELHAUS (2003) verificou após administração intraperitoneal de magnetolipossomas furtivos constituídos de NPM de ferrita de cobalto recobertas com citrato, aglomerados dentro de fagócitos no fígado.

As lâminas do baço não permitiram verificar qualquer diferença entre os vários tratamentos realizados, provavelmente porque este órgão já possui uma grande quantidade de ferro endógeno. No entanto, alterações histológicas não foram encontradas.

5.5 Considerações sobre os testes em animais com o Tumor Ascítico de Ehrlich (etapa 6)

5.5.1 Considerações sobre o Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

O tumor de Ehrlich (TAE) foi introduzido por Paul Ehrlich em 1906, e descrito em 1906 como um adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária de camundongos fêmeas. No início, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado por via subcutânea ou intramuscular em animais da mesma espécie. (MATSUZAKI et al., 2003). Loewenthal e Jahn, em 1932, introduziram a forma

ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com as células tumorais, formando uma bolsa repleta de líquido (DAGLI, 1989).

O TAE tem sido extensamente utilizado em estudos oncológicos devido a sua grande facilidade de manipulação experimental (MATSUZAKI et al., 2004; SAAD-HOSSNE et al., 2004; FREITAS et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2006). Dos vários tumores utilizados hoje como modelos experimentais *in vivo*, os transplantáveis de forma ascítica oferecem diversas vantagens, tais como a facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas, a quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral e também por permitir o estudo comparativo com métodos desenvolvidos para pesquisa de células sanguíneas e demais fluidos corporais (SAAD-HOSSNE et al., 2004; FONSECA, 2006). Além disso, não existem relatos de ocorrência de metástases no coração, rins, adrenais, fígado ou baço (SUGIURA, 1965 apud GENTILE, 2001).

Esta neoplasia pode ser induzida, de modo experimental, transplantando-se células tumorais de um camundongo em estágio avançado da doença para outro saudável. Fazendo uso de uma seringa, parte da ascite obtida é inoculada na cavidade peritoneal de um animal sadio, para o desenvolvimento da forma ascítica, ou no coxim plantar ou via subcutânea, para indução da forma sólida. Esse procedimento é repetido de um portador para um receptor a cada oito dias, sendo possível observar expressivo crescimento da massa tumoral a partir do sexto dia, que continua ocorrendo até levar o camundongo à morte (DAGLI et al., 1992, KLEEB et al., 1997).

5.5.2 Considerações gerais sobre os testes em tumores

Trabalhos realizados com tumores, em particular com o tumor ascítico de Ehrlich, permitem que se conheça o seu comportamento e evolução frente a novas alternativas terapêuticas. Em conformidade, vários testes biológicos foram realizados neste trabalho com o objetivo de avaliar a inibição ou mesmo a regressão do crescimento tumoral quando os animais que o portam são submetidos à amostra ML_{PEG}-ZnF e à exposição ao AC e/ou ao laser. A técnica histoquímica de impregnação

pela prata (AgNORs) marca as regiões organizadoras de nucléolo e é considerada um bom marcador de proliferação celular e conseqüentemente, é útil na avaliação da malignidade (TRERÈ, 2000; FILIPPIN et al., 2006). A avaliação de células claras e escuras e sua relação com o volume do líquido ascítico e a análise do grau de hemorragia no fluido também constituem formas de atestar a agressividade desse tipo de tumor. Outros parâmetros também foram avaliados, tais como o volume do ascite, peso corpóreo, viabilidade celular, quantificação de células inflamatórias e a análise de sobrevida. Todos esses parâmetros foram eficientes em fornecer dados que ajudam na análise da eficiência dos procedimentos de MHT e TFD no tratamento do TAE ascítico.

5.5.3 Considerações sobre a análise das regiões organizadoras de nucléolo argentafins (AgNOR) em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich

Para se determinar o grau de proliferação celular várias técnicas têm sido utilizadas como a dos marcadores MIB-1, PCNA, Ki-67 e a incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) (BÀNKFALVI et al., 1999; DERENZINI, 2000). Atualmente, vários trabalhos descrevem o emprego da técnica de AgNOR e sua aplicação em morfometria quantitativa, como método auxiliar na distinção entre células benignas e malignas, em diversos tecidos (MAKINEN, et al., 1993; KRUGER, et al., 2000).

A quantificação das AgNORs é simples e menos onerosa em relação às demais técnicas e tem sido amplamente utilizada para caracterizar e diferenciar neoplasias e hiperplasias (PICH et al., 2000; SERAKIDES et al., 1999), já que elas representam os marcadores da atividade dos genes ribossômicos e, portanto, da atividade nucleolar (ROUSSEL; HERNANDEZ-VERDUM, 1994). A transcrição dos genes para RNA ribossômico envolve, além da RNA polimerase I, proteínas que formam partículas pré-ribossômicas, dando origem ao nucléolo (PLOTON, 1984). Essas proteínas associadas às regiões organizadoras do nucléolo têm grande afinidade pela prata (UNDERWOOD; GIRI, 1988), sendo chamadas AgNORs (TRERÉ, 1993).

Na coloração AgNOR, as células apresentam coloração amarelada com núcleos em castanho, enquanto as regiões organizadoras de nucléolos aparecem como estruturas intranucleares pequenas e irregulares de cor marrom-café a preta. Em células normais os pontos NOR são ligeiramente centrais, arredondados, em quantidade de até quatro e menores que o nucléolo. Entretanto, em células onde se observam alterações morfológicas de pré-malignidade e malignidade, os pontos variam na localização no interior do núcleo e em número, refletindo a gravidade da lesão (FILIPPIN et al., 2006). Sabe-se que quanto maior o número de AgNORs, maior a atividade proliferativa das células (DERENZINI; SIRRI; TRERÉ, 1994; DERENZINI, 2000; PICH et al., 2000).

As observações morfológicas das células tumorais nos diferentes grupos não permitiram uma diferenciação suficiente para perceber os efeitos dos tratamentos realizados. Entretanto, por meio da contagem de pontos AgNOR foi possível identificar diferenças significativas entre os tratamentos. Por exemplo, o tratamento com ML_{PEG}-ZnF e exposição ao AC induziu aumento no número de NOR, sugerindo proliferação celular maior que no grupo TAE. Por outro lado, o tratamento com ML_{PEG}-ZnF associado ao laser, reduziu a quantidade de NOR, evidenciando menor atividade proliferativa nesse grupo. Os dados obtidos no grupo submetido à exposição ao AC e também ao laser mostram que a exposição ao laser parece diminuir os efeitos proliferativos da exposição ao AC.

5.5.4 Considerações sobre a viabilidade das células do líquido ascítico em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich

Os tratamentos com ML_{PEG}-ZnF e submissão ao AC e ML_{PEG}-ZnF e submissão ao laser afetaram a viabilidade das células do líquido ascítico, causando morte celular significativa.

A citotoxicidade pode ter sido induzida pela presença de ferro nas nanopartículas, uma vez que esse metal por ter a capacidade de aceitar e doar elétrons, danificar tecidos, pois catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em

radicais livres que atacam membranas celulares, proteínas e DNA (FREITAS, 2004). Em apoio a esta idéia, SESTIER et al. (2002) verificaram que o uso de quelante de ferro pode minimizar os efeitos de amostra magnética na viabilidade de células tumorais.

Os resultados da viabilidade celular podem ser diretamente correlacionados aos dados de volume tumoral, peso e grau de hemorragia.

5.5.5 Considerações sobre a contagem diferencial de leucócitos do líquido ascítico em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich

A resposta inflamatória caracteriza-se por aumento do calibre e da permeabilidade dos vasos da microcirculação, alterações que permitem a saída de macromoléculas, líquido e células da luz dos vasos para o interstício.

Toda reação inflamatória é caracterizada por influxo de leucócitos, edema e mudança no calibre e na permeabilidade da microcirculação. Muitas destas modificações refletem a liberação de mediadores químicos. Os macrófagos representam papel importante na patogênese e na manutenção do processo inflamatório.

Os resultados apresentados nesta pesquisa mostraram redução na população de linfócitos e aumento na população de macrófagos em todos os tratamentos testados (ML_{PEG}-ZnF e ML_{PEG}-ZnF submetidos subseqüentemente ao AC, ao laser ou simultaneamente ao AC e ao laser), e ainda aumento na população de neutrófilos apenas nos tratamentos com ML_{PEG}-ZnF e ML_{PEG}-ZnF submetidos subseqüentemente ao AC, realçando o papel dos tratamentos efetuados.

5.5.6 Considerações sobre o teste de células claras/células escuras e do volume do líquido ascítico

Os dados obtidos mostraram que em todos os grupos investigados houve predomínio de células escuras. A classificação de células do tumor de Ehrlich em claras

e escuras foi proposta por SILVA (2003). Segundo SILVA et al. (2007) essa classificação tem sido a denominação mais apropriada quando se considera as características morfológicas das células tumorais.

As células claras possuem muitos vacúolos citoplasmáticos que sugerem algum tipo de atividade secretora, de modo que o aumento nesta população celular poderia estar relacionado com a maior produção do líquido ascítico, ocorrendo o inverso quando se trata do maior número de células escuras. Evidências para este fato foram relatadas em um estudo (SILVA et al., 2007) sobre o efeito da hipotireoidismo no TAE de camundongos ooforectomizados e não- ooforectomizados, onde grande quantidade de células escuras estavam relacionadas com a redução do volume do tumor ascítico. Outros estudos corroboram a existência de relação entre quantidades de células claras e volume ascítico. VERÇOSA JÚNIOR et al. (2006) estudaram a atividade antineoplásica de um produto natural (miriadenolídeo) no TAE, e observaram que a dose de 31µg/kg favorece a presença de células escuras, culminando com a menor produção de líquido ascítico, enquanto a dose de 139µg/kg favorece a presença de células claras, levando a maior produção de líquido ascítico. FREITAS et al. (2006) estudaram os efeitos das drogas Tiroxina (induz hipertireoidismo) e Propiltiouracil (induz hipotireoidismo) em TAE, e observaram que o grupo que foi tratado com Tiroxina apresentou predominância de células claras e maior volume de líquido ascítico, enquanto que o grupo tratado com Propiltiouracil apresentou resultado inverso.

Na análise dos dados de volume do líquido ascítico obtidos nos testes realizados, observa-se uma diminuição significativa nos três grupos que, após o tratamento com a amostra ML_{PEG}-ZnF, foram submetidos ao AC e/ou laser, Essa diminuição de volume é concomitante a um decréscimo de células claras nestes três grupos, resultado este em acordo com os dados da literatura (FREITAS et al., 2006, VERÇOSA JÚNIOR et al., 2006, SILVA et al., 2007). Vale comentar, entretanto, que embora as células claras sejam reduzidas no grupo TAE e no grupo tratado apenas com a amostra ML_{PEG}-ZnF, o volume ascítico é significativamente maior do que nos grupos submetidos ao AC e/ou laser, demandando estudos posteriores para melhor compreensão da relação células brancas e volume ascítico.

5.5.7 Considerações sobre o peso dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich

Os resultados revelaram que os animais tratados com $ML_{PEG-ZnF}$ e $ML_{PEG-ZnF}$ submetidos subseqüentemente ao AC, ao laser ou simultaneamente ao campo magnético e ao laser, apresentaram redução significativa de peso. Vale ressaltar que o tratamento $ML_{PEG-ZnF}$ submetido apenas ao laser foi o que provocou maior perda de peso ao longo do tempo de tratamento.

No início do experimento não foi constatada qualquer diferença de peso entre os grupos experimentais. No entanto, a partir da segunda pesagem verificou-se perda de peso, o que reflete o período de incubação do tumor, o que está em concordância com os relatos de FREITAS et al. (2006).

Após o período de incubação o tumor começa a crescer, como observado na segunda pesagem, o que pode ser responsável pelo aumento crescente de peso no grupo TAE. Este crescimento tumoral, entretanto, não é observado nos demais grupos, mostrando papel importante dos tratamentos sobre o desenvolvimento do tumor. Ao final do experimento, observa-se perda de peso significativa nos grupos tratados, o que deve estar diretamente relacionado com morte celular ou a algum mecanismo citostático, que tenha inibido a proliferação celular, em acordo com os resultados obtidos na mensuração do volume. É interessante frisar que o grupo tratado com $ML_{PEG-ZnF}$ e submetido ao laser apresentou redução de peso mais marcante.

5.5.8 Considerações sobre o volume dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich

Os camundongos que receberam injeção intraperitoneal de células ascíticas do TAE apresentaram aumento expressivo do volume no terço abdominal. À palpação, notava-se acúmulo difuso de líquido. A produção do líquido ascítico no tumor de Ehrlich é creditada principalmente à hiperpermeabilidade dos capilares presentes na cavidade

peritoneal (SENGER et al., 1983). Essa alteração vascular deve-se à ação das células neoplásicas que induzem aumento da expressão de receptores para o fator de motilidade autócrina (FMA), ao mesmo tempo em que secretam grande quantidade desse fator. A ligação do FMA ao seu receptor induz angiogênese e aumenta a permeabilidade vascular por alterar a morfologia das células endoteliais, com subsequente formação de grande quantidade de líquido ascítico (VERÇOSA JÚNIOR et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Os resultados obtidos mostraram que houve diminuição significativa no volume ascítico nos tratamentos com ML_{PEG}-ZnF submetidos subsequente ao AC, ao laser ou simultaneamente ao campo magnético e ao laser. Concomitante ao decréscimo de volume ascítico, observa-se que ocorre melhoria significativa na qualidade do líquido ascítico evidenciada pela cor mais clara (classes 1 e 2). Estes dados fazem com que as variações de volume ascítico sejam mais facilmente relacionadas com alterações vasculares do que à quantidade de células claras no ascite.

A diminuição do volume ascítico ocasionada pelo tratamento seguido de exposição ao campo e/ou laser pode também ser correlacionada com a diminuição do peso observado nos mesmos grupos de animais.

5.5.9 Considerações sobre o grau de hemorragia da ascite nos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é um carcinoma de crescimento rápido com comportamento muito agressivo (SEGURA et al., 2000). A produção do líquido ascítico no tumor de Ehrlich é creditada principalmente à hiperpermeabilidade dos capilares presentes na cavidade peritoneal (SENGER et al., 1983).

O processo inflamatório desencadeado pela presença das células neoplásicas na cavidade peritoneal é marcado pelo extravasamento de hemácias, já que os vasos ficam tão mais dilatados e danificados quanto maior é o número de células inflamatórias atuando contra a presença das cancerosas. Medir o nível de hemorragia é uma forma de atestar a agressividade desse tipo de tumor.

A partir dos dados analisados, pode-se sugerir que, estatisticamente, os tratamentos com ML_{PEG}-ZnF submetidos ao laser e ML_{PEG}-ZnF submetidos ao AC e ao laser, reduzem a agressividade do tumor. Considerando que o tratamento ML_{PEG}-ZnF submetidos ao laser apresenta o ascítico com grau 1 de hemorragia, é um indicativo de que o tratamento reduziu, de alguma forma, o extravasamento de eritrócitos para a ascite, reduzindo, pelo menos aparentemente, sua agressividade. Tal resultado coincide com os observados na análise de peso, que nos mesmos tratamentos apresentou maior perda.

Tais resultados coincidem com outros já discutidos neste trabalho, como os dados de volume e peso que apresentam maior perda com o tratamento ML_{PEG}-ZnF submetido ao laser.

5.5.10 Considerações sobre a sobrevida dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich

Os tratamentos com ML_{PEG}-ZnF submetidos ao laser e ML_{PEG}-ZnF submetidos ao AC e ao laser possibilitaram aumento na sobrevivência dos camundongos. No entanto, foi o tratamento ML_{PEG}-ZnF submetidos ao laser que mostrou a sobrevivência maior que 20 dias, em relação a todos os outros grupos, o que equivale segundo ao tempo de sobrevida (%ILS) a 19,35%. Segundo GUPTA et al. (2004), este resultado ainda não indica atividade antitumoral significativa, pois essa condição só seria assumida se o % ILS excedesse 25%.

Da mesma forma que observada em outros parâmetros, os resultados de sobrevivência dos animais podem ser correlacionados com os dados de viabilidade celular, volume, peso, qualidade do ascite, quantidade de células inflamatórias, sobretudo nos grupos submetidos ao tratamento com ML_{PEG}-ZnF e ao laser, todos eles sugerindo redução da agressividade tumoral.

5.5.11 Considerações sobre a Magnetohipertermia e Terapia Fotodinâmica

A magnetohipertermia (MHT) é um processo de aquecimento sítio-específico gerado magneticamente que promove morte celular (HALBREICH et al., 2002), inclusive de células neoplásicas. O método é bastante vantajoso quando se faz uso de nanopartículas magnéticas (NPMs) biocompatíveis. Assim que as nanopartículas são capturadas pelas células cancerígenas, são submetidas a um AC de corrente alternada de alta frequência (AC) que possibilita a elevação da temperatura local em até 8° C (BACRI et al., 1997). A injeção da amostra magnética no local desejado ou sua atração por gradiente de campo magnético ou ainda a associação de anticorpos monoclonais às NPM torna viável a restrição do aquecimento ao tecido tumoral, minimizando danos aos tecidos normais. Sendo assim, a magnetohipertermia constitui uma técnica promissora para tratamento de cânceres diversos (DA SILVA et al., 1997). A combinação da MHT com outras terapias para tratamento de neoplasias tem sido de grande interesse, pois pode potencializar o efeito terapêutico, possibilitando resultados satisfatórios.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) parte do princípio de que a interação da luz de comprimento de onda adequado, com um fotossensibilizador, na presença de oxigênio resulta em espécies reativas capazes de induzir morte celular (MACHADO, 2000). Os fotossensibilizadores são os agentes ativos no processo da TFD. Existe grande interesse no desenvolvimento de novos compostos fotossensíveis que absorvam luz em comprimentos de onda maiores, que sejam biologicamente estáveis, possuam alta seletividade tumoral, apresentem toxicidade mínima ao tecido normal, além de potencialmente mais ativos (ACKROYD et al., 2001). Os agentes fototerapêuticos de primeira geração, baseados em misturas de derivados porfirínicos, aumentam a eficiência do tratamento neoplásico e podem ser usados na TFD, mas possuem baixa seletividade, pouca incorporação nos tecidos tumorais e longo tempo de permanência no organismo. Por outro lado, os fotossensibilizadores de segunda geração apresentam baixa toxicidade, alta seletividade e incorporação ao tumor. Nessa classe se encontram as ftalocianinas e as clorinas (LEACH, 1992; JORI, 1996). Em especial, as ftalocianinas têm demonstrado grande potencial como agentes fotossensibilizadores na erradicação de

processos neoplásicos, vantagens que despertam o interesse nas possibilidades de seu uso.

A amostra $ML_{PEG-ZnF}$, utilizada neste estudo, contém zinco-ftalocianina e nanopartículas magnéticas encapsuladas em lipossomas furtivos, constituindo um sistema que permite avaliar a ação combinada de processos relacionados à MHT e TFD.

Em síntese, nos testes de biocompatibilidade realizados da amostra $ML_{PEG-ZnF}$ pode ser observado atividade pró-inflamatória branda, total ausência de genotoxicidade e citotoxicidade nas células da medula óssea, alteram pouco a viabilidade celular e têm efeitos morfológicos temporários apenas nos pulmões. O que torna a amostra adequada para testes *in vivo*.

Em relação à sua atividade antitumoral foi constatado que, nas condições experimentais deste trabalho, nenhum dos tratamentos causou remissão total do tumor. Entretanto, pode ser observada significativa atividade antiproliferativa, sobretudo quando após o tratamento com a amostra, os animais eram submetidos ao laser, evidenciando mais vantagens do sistema para realização da TFD do que da MHT.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho que teve como objetivo principal investigar efeitos biológicos da administração de amostra de magnetolipossomas fotossensibilizados com zinco-ftalocianina ($ML_{PEG-ZnF}$) e sua eficiência nos processos de Magnetohipertermia (MHT) e Terapia Fotodinâmica (TFD) em camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), permitem concluir que, nas circunstâncias experimentais empregadas:

- A exposição durante 3 minutos ao AC após tratamento com amostra magnética não causa alterações biológicas severas que impeçam o uso de MHT para tratamento de tumores.
- A amostra $ML_{PEG-ZnF}$ e suas sub-componentes ML_{PEG} (magnetolipossomas furtivos), $L_{PEG-ZnF}$ (lipossomas furtivos associados ao ZnF) e L_{PEG} (lipossomas furtivos) causam apenas efeitos inflamatórios brandos e temporários, alteram pouco a viabilidade celular, não causam genotoxicidade alguma e têm efeitos morfológicos temporários apenas nos pulmões, como revelado por muitos e diferentes testes biológicos, sendo que a exposição ao AC alterou ligeiramente estes efeitos inflamatórios.
- Os tratamentos de animais portadores de TAE com a amostra $ML_{PEG-ZnF}$, e subsequente submissão ou não ao AC e laser não ocasionaram remissão total do tumor, mas inibiram sua proliferação, conforme observado nos inúmeros testes realizados e aumento do tempo de sobrevida.
- O tratamento de animais portadores de TAE apenas com a amostra $ML_{PEG-ZnF}$ não resultou em melhora significativa, como constatado pela morfologia no teste AgNOR, volume e padrão hemorrágico do ascite, entre outros.
- O tratamento de animais portadores de TAE com $ML_{PEG-ZnF}$ e subsequente submissão ao laser apresentou os resultados mais favoráveis, como verificado pela morfologia no teste AgNOR, volume e padrão hemorrágico do ascite, peso e sobrevida do animal, evidenciando a importância deste novo sistema na TFD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A.K; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74(5), p. 656–669, 2001.

ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KLEIN, R. J.; PARAK, F. G.; HULIN, P.; BERGEMANN, W. E.; WAGENPFEIL, S.; LÜBBE, A. S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. **Cancer Research**, v. 60, 6641 – 6648, 2000.

AKTAS, M; DE JONG, D.; NUYTTENS, J.J.; ZEE, J.V.D.; WIELHEESEN, D.H.M.; BATMAN, E.; BURGER, C.W.; ANSINK, A.C. Cocomitant radiotherapy and hyperthermia for primary carcinoma of the vagina: a cohort study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 2006.

ALINGTON, V.A. Nanotechnology. In: Report of the National Nanotechnology Initiative Workshop, 2003.

AHL et al., 1997

ALLEN, T.M.; HANSEN, C.; RUTLEDGE, J. Liposomes with prolonged circulation time : factor affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 981, p.27-35, 1989.

ALLEN, T.M et al. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1066, p.29-36, 1991.

ANDERSON, D.G.; BURDICK, J.A. LANGER, R. Smart Biomaterials. Science, v.305, n. 24, p. 1923-1924, 2004.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Medicamentos: pesquisa clínica**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>>. Acesso em: 05 jan. 2008.

BACRI, J.C.; DA SILVA, M.F.; PERZYNSKY, R.; PONS, J-N.; ROGER, J.; SABOLOVIC, D. & HALBREICH, A. Use of a magnetic nanoparticles for thermolysis of cells in a ferrofluid. In **Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: An Overview**. (W.Shütt, J.Teller, U.Häfelí and M.Zborowsky, eds.) Plenum Publishing Corp., New York, 597-606, 1997.

BAIN, B.J. Células sanguíneas: um guia prático. 3 ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 2004. 334p.

BARBOSA, L. S. **Avaliação in vivo da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico**. Brasília, 2004. 64f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

BARBOSA, L. S.; SADEGHIANI, N.; GUEDES, M. H. A.; OLIVEIRA, D. M.; TEDESCO, A. C.; LIMA, E. C. O.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M. Effects of magnetic field and magnetoliposomes on mice: cytotoxicity and genotoxicity tests. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 42 (10), p. 1-3, 2006.

BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G.; Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of physics D – applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R198 – R206, 2003.

BERSANI, F.; MARINELLI, F.; OGNIBENE, A. Intra membrane protein distribution in cell cultures is affected by 50 Hz pulsed magnetic fields. *Bioelectromagn.*, v. 18, p. 463-469, 1997.

BIANCO, A.; KOSTARELOS, K.; PRATO, Maurizio. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 674–679, 2005.

BLASIAK J.; WIDERA K.; PERTYŃSKI T. Hyperthermia can differentially modulate the repair of doxorubicin-damaged DNA in normal and cancer cells. **Acta Bioquímica Polonica**. Vol. No 50, 191–195. 2003

BLUME, G.; CEVE, G. Liposomes for sustained drug release in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1029, p.91-97, 1990.

BONNET, R.; BERENBAUM, M. Porphyrins as photosensitizers. Ciba Foundation Symposium, v. 146, p. 40-53, 1989.

BOUHON, I.A.; SHINKAI, M.; HONDA, H. et al. Synergism between mild hyperthermia and

BROWN, S.B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncological**, v.5, p. 497-508, 2004.

BRIGGER, I. DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, n. 5, p. 631-651. 2002.

BRUGIN, A. **Avaliação da biocompatibilidade/ toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss**. Brasília, 2007, 86f. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.

BRUSENTOV, N.A.; KUZNETSOV, V.D.; BRUSENTOV, T.N.; GLENDER, T.S.; NOVAKOVA, A.A.; VOLTER, E.R.; HALIULINA, E.A.; DANILKIN, M.I. Magnetization of ferrifluid and effects of intracellular deposition of ferrite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 268, p. 272-276, 2004.

CHAVES, S.B. **Efeitos biológicos de fluidos magnéticos a base de magnetita recoberta por DMSA em camundongos: análise por microscopia de luz, imunohistoquímica e ressonância magnética**. Brasília, 2002. 55f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

CHAVES, S. B.; LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Light microscopy and magnetic resonance characterization of DMSA – coated magnetic fluid in mice. **IEEE Trans. Magn.**, 38: 3231 – 3233, 2002.

CLEMENT, O.; FRIJA, G.; CHAMBON, C.; SCHOUMANCLAYES, E.; MOSNIER, J.F.; POUPON, M.F.; BALKAU, B. Liver tumor in cirrhosis- Experimental study with spio-enhanced MR imaging. **Radiol.**, **180**: 31-36, 1991.

CLETON, F. J. Chemotherapy general aspect. *In*: Peckhan, M.; Pinedo, H. M.; Veronesi, U. Oxford Textbook of Oncology, Oxford: Oxford Medical Publications. V. 1, 445 – 468, 1995.

COELHO, J. P. **Avaliação da biocompatibilidade de magnetolipossomas à base de nanopartículas de maghemita**. Brasília, 2008. 83f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

COHEN-JONATHAN, E.; BERNHARD, E.J.; MCKENNA, W.G. How does radiation kill cells? **Cur. Opin. Chem. Biol.**, **3**: 77-83, 1999.

DAHL, O.; DALENE, R.; SCHEM, D.C. MELLA, O. Status of clinical hyperthermia. **Acta Oncologica**, v. 38, n. 7, p. 863-873, 1999.

DA SILVA, M.F.; GENDRON, F.; BACRI, J.C.; ROGER, J.; PONS, J.N.; ROBINEAU, M.; Sabolovic, D.; Halbreich, A. Quantification of maghemite nanoparticles in biological media by ferromagnetic resonance and its alteration by conjugation with biological substances. in *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: An Overview*. (W.Shütt, J.Teller, U.Häfelí and M.Zborowsky, eds.) Plenum Press. New York, 1997a, pp. 171-176.

DAGLI, M.L.Z.; GUERRA, J.L.; SALDIVA, P.H.N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, p. 97– 103. 1992

DEGER, S.; BOEHMER, D.; TÜRK, I.; ROIGAS, J.; BUDACH, V.; LOENING, S.A. Interstitial hyperthermia using self-regulating thermoseeds combined with conformal radiation therapy. **European Urology**, v. 42, p. 147-153, 2002.

DE CUYPER, M.; JONIAU, M. Magnetoliposomes: formation and characterization. *Eur. Biophys. J.*, v. 15, p. 311-319, 1988.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v.31, p.117 – 120, 2000.

DE ROSA, M.C.; CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Review**, v. 233-234, n. 1, p. 351-371, 2002.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 380-387, 2003.

DONG, Y.; FENG, S. In vitro and in vivo evaluation of methoxy polyethylene glycol–poly lactide (MPEG–PLA) nanoparticles for small-molecule drug chemotherapy. **Biomaterials**, v. 28, p. 4154–4160, 2007.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 55, p. 333-339, 2001.

ENGELS, H.; WAMBERSIE, A. Relative biological effectiveness of nêutrons for c4ncer induction and other late effects: a review of biological data. **Recent Results Cancer Res.**, 150: 54 – 87, 1998.

ESTEVANATO, L. L. C. **Investigaç4o da biocompatibilidade de pol4meros de albumina magn4ticos em camundongos**. Bras4lia, 2008. 102f. Dissertaç4o de mestrado do Programa de P4s Graduaç4o em Biologia Animal – Instituto de Ci4ncias Biol4gicas, Universidade de Bras4lia.

FAHMY, T.M.; FONG, P.M.; GOYAL A.; SALTZMAN, W.M. Targeted for drugs delivery. **Nanotoday**. p. 18-26, 2005.

FERRARIO, A.; von TIEHL, K. F.; RUCKER, N.; SCHWARZ, M. A.; GILL, P. S.; GOMER, C. J. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. **Cancer Research**, v. 60, p. 4066–4069, 2000.

FILIPPIN, C.; CHISTOFOLETTI, L.D.; RIBEIRO, M.C.M.; VITURI, .C.L. Determinaç4o do n4mero de regi4es organizadoras de nucl4olo (AgNOR) em les4es do epitelo cervical uterino. **RBAC**, v. 38, n. 3, p. 133-139, 2006.

FOOTE, C.S. Definition of type I and II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, p.659,1991.

FORTINA, P; KRICKA, L.J.; SURREY, S.; GRODZINSK, P.; Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n.4, 2005.

FONSECA, C. S. Avaliação, in vivo e in vitro, dos efeitos dos flavonóides quercetina, naringentina e ipriflavona na prevenção e tratamento do tumor e Ehrlich. Viçosa , 2006. 1150f. Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Química Agrícola, Universidade de Minas Gerais.

FREITAS, E. S.; LEITE, E. D.; SILVA, A. E.; OCARINO, N. M.; FERREIRA, E.; GOMES, M. G.; CASSALI, G. D. & SERAKIDES, R. Effect of thyroxine and propylthiouracil in Ehrlich acitic tumor cells. **Int. J. Morphol.**, 24(4):665-671, 2006.

FREITAS M.L.L., SILVA L.P., AZEVEDO R.B., GARCIA V.A.P., LACAVA L.M., GRISÓLIA C.K., LUCCI C.M., MORAIS P.C., DA SILVA M.F., BUSKE N., CURI R., LACAVA Z.G.M. A double-coated magnetite-based magnetic fluid evaluation by cytometry and genetic tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252: 3.6 – 398, 2002.

GAO, D.; AGAYAN, R. R.; XU, H.; PHILBERT, M. A.; KOPELMAN, R. Nanoparticles for two-photon photodynamic therapy in living cells. **Nano Letters**, v. 6(11), p. 2383-2386, 2006.

GARCIA, V. A. P.; LACAVA, L. M.; KUCKELHAUS, S.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C.; DE CUYPER, M.; LACAVA, Z. G. M. Magnetoliposomes: evaluation by cytometry and micronucleus test. **European Cells & Materials Journal**, v. 3, p. 154-155, 2002.

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.1330-1340, 2001.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. **Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery**. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 401–416, 2004.

GOETZE S.; BUNGENSTOCK A.; CZUPALLA C.; EILERS F.; STAWOWY P.; KINTSCHER U.; SPENCER-HÄNSCH C.; GRAF K.; NÜRNBERG B.; LAW R. E.; FLECK E. AND GRÄFE M. Leptin Induces Endothelial Cell Migration Through Akt, Which Is Inhibited by PPAR γ -Ligands. **Hypertension**, v. 40: 748 -754, 2002.

GORDON, R.T. US patent 4.735.796, 1998.

GOULD, P. Nanomaterials face control measures. **Nanotoday**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 34-39, May. 2006.

GREGORIADS, G. Liposome technology: preparation of liposomes. Flórida: **Boca Raton: CRC Press**, 1984.

GUEDES, M.H.A; GUEDES, M.E.A.; MORAIS, P.C.; DA SILVA, M.F., SANTOS, T.S.; ALVES, J.R., J.P.; BERTELLI, C.E.; AZEVEDO, R.B.; LACAV, Z.G.M. Proposal of a magnetohyperthermia system: preliminary biological tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272-276, p. 2406-2407, 2004.

GUEDES, M. H. A. **Desenvolvimento de um novo sistema de magnetohipertermia para tratamento do câncer e seus efeitos em camundongos**. Brasília, 2005, 139f. Tese de Doutorado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.

Guidelines OPPTS 870.5395 Health Effects test: Mammalian Erythrocytes Micronucleus Test. United States Environmental Protection Agency, aug. 1998. Disponível em <http://epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS>. Acesso em 10 março 2008.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995-4021, 2005.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; KUMAR, R.S. KUMAR, T.S. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Acta Pharmacol Sin**, v. 25, n. 8, p. 1070-1076.

GUZ, I.A.; RODGER, A.A.; GUZ b, A.N.; RUSHCHITSKY, J.J. Developing the mechanical models for nanomaterials. **Composites**, Guildford, v. 38, n. 4, Apr. 2007. Part A. Applied Science and Manufacturing, p. 1234-1250.

HALBREICH, A.; ROGER, J.; PONS, J. N.; GELDWERTH, D.; DA SILVA, M. F.; ROUDIER, BACRI, J.C. Biological applications of maghemite ferrofluid. **Biochimie**, v. 80, p. 379 – 390, 1998.

HILDEBRANDT, B.; WUST, P.; AHLERS, O.; DIEING, A.; SREENIVASA, G.; KERNER, T. The cellular and molecular basis of hyperthermia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 43, n. 1, p. 33–56, 2002.

HERGT R.; DUTZ S.; MÜLLER R.; ZEISBERGER M.S. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. **Journal Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. S2919-S2934, 2006.

HOEBEKE, M. The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology**, v. 28, p. 189-196, 1995.

HUGHES, G.A. Nanostructure-mediated drug delivery. Nanomedicine. **Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.1, p. 22-30, 2005.

HUSSAIN, S.M.; HESS, K.L.; GEARHART, J.M.; GEISS, K.T.; SCHLAGER, J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, v. 19, n. 7, p. 975-983, 2005.

HERR, J. K.; SMITH, J. E.; MEDLEY, C. D.; SHANGGUAN, D.; TAN, W. **Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells.** *Analytical Chemistry*, v. 78(9), p. 2918-2924, 2006

HODENIUS, M.; DE CUYPER, M.; DESENDER, L.; MULLER-SCHULTE, D.; STEIGEL, A.; LUEKEN, H. **Biotinylated Stealth[®] magnetoliposomes** *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 120, p. 75-85, 2002.

HUANG H. W. Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model. *Biochemistry*, v. 39 , 2000.

International Agency for Research on Cancer. **World Cancer Report.** (eds Stewart, B. W.; Kleihues, P.). 351p. IARC Press, Lyon, 2003. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=6YF9DWHieo8C&vq=World+Cancer+Report>>. Acesso em: 10 dez. 2007.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em 10 de março de 2008.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Situação do câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em 10 de março de 2008.

ITO; FUKUSAKI, 2004

JAIN, T.K.; MORALES, M.A.; SAHOO, S.K.; LESLIE-PELECKY, D.L.; LABHASETWAR. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. **Molecular Pharmacological**, v. 2, p. 194-205, 2005.

JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; WUST, P.; FAEHLING, H.; FELIX, R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, p. 413-419, 1999.

JORDAN, A.; WUST, P.; SCHOLZ, R.; TESCHIE, B.; FAHLING, H.; MITROVICS, T.; VOGL, T.; CERVOSNAVARRO, J.; FELIX, R. Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro. **Intern. J. Hypertherm.** V. 12, p. 705-722, 1996.

JORI, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. Biol.** V. 36, p. 87-93, 1996.

KLEEB, S.R., XAVIER, J.G., FRUSSA-FILHO, R., DAGLI, M.L.Z. Effect of haloperidol on the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Sciences**, v. 60, p. 69– 74. 1997.

KLIBANOV et al. Amphipathic polyethyleneglycol effectively prolong the circulation time of liposome. **FEBS Letters**, v. 268, p. 235-237. 1990.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166. 2000.

KRUGER, S.; STAHLHUT, M.; MULLER, H. Cell cycle-dependent AgNOR analysis in invasive breast cancer. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 22, n.5, p. 358-363, 2000.

KÜCKELHAUS, S. A. S. **Avaliação biológica de materiais magnéticos à base de ferrita de cobalto desenvolvidos para tratamento alternativo do câncer.** Brasília, 2003, 133f. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal, Universidade de Brasília.

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

LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, L. M.; MARTINS, E. V.; GARCIA, V. A. P.; RÉBULA, C. A.; LEMOS, A. P. C.; SOUSA, M. H.; TOURINHO, F. A.; MORAIS, P. C.; DA SILVA, M. F. **Toxic effects of ionic magnetic fluids in mice.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 194, p. 90-95, 1999a.

LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MARTINS, E. V.; LACAVA, L. M.; FREITAS, M. L. L.; GARCIA, V. A. P.; REBULA, C. A.; LEMOS, A. P. C.; SOUSA, M. H.; TOURINHO, F. A.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C. **Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 201, p. 431-434, 1999b.

LACAVA, Z. G. M. Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. *In Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.* São Paulo: Artliber Editora, 2006.

LACAVA, L. M.; GARCIA, V. A. P.; KÜCKELHAUS, S.; AZEVEDO, R. B.; SADEGHIANI, N.; BUSKE, N.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. **Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 272–276, p. 2434–2435, 2004.

LACAVA, L. M.; **Estudos de Biodistribuição e toxicidade de fluido magnético à base de partículas de magnetita recobertas por Dextran em camundongos.**

Brasília, 2008. 105f. Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

LACAVA, Z.G.M.; MORAIS, P.C. Aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas. *In.: Parcerias Estratégicas*. N. 18. Brasília: CGEE. P. 73-81. 2004.

LEACH, M. Effectiveness of a lysil chlorine p e6/chlorine e6 mixture in photodynamic therapy of the subcutaneous (L glioma in the rats). *Cancer Research*, v.52, p. 1235-1239, 1992.

LEE, L. A.; WANG, Q. Adaptations of nanoscale viruses and other protein cages for medical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n.3, p. 137– 149, 2006.

LEMKE, A. J.; VON PILSACH, M. I. S.; LÜBBE, A.; BERGEMANN, C.; RIESS, H.; FELIX, R. **MRI after magnetic drug targeting in patients with advanced solid malignant tumors**. *Eur Radiol*, v. 14, p. 1949–1955, 2004.

LIU, H; WEBSTER, T.J. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**, v. 28, p. 354-369, 2007.

LISBÔA, A.C.V.C.; LOJUDICE, F.H.; KROGH, K; et al. NAno e micro-encapsulamento de ilhotas pancreáticas para o tratamento do Diabetes mellitus e Engenharia e tecidos. *In.: Terapias Avançadas*. P.289-306, 2007.

LÜBBE, A.S.; ALEXIOU, C.; BERGEMANN, C. Clinical applications of magnetic drug targeting. *J. Surg. Res.*, v. 95, p. 200-206, 2001.

MA, M.; WU, Y.; ZHOU, J.; SUN, Y.; ZHANG, Y.; GU, N. **Size dependence of specific power absorption of Fe₃O₄ particles in AC magnetic field**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 268, p. 33–39, 2004.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

MAKINEN, K.; ESKELINEM, M.; LIPPONEN P.; NUUTINEM, P.; MARIN, S.; ALHAVA, E. Ag-NORs related to flow cytometry, morphometry and prognosis in patients with pancreatic cancer. **Anticancer Res.**, v. 13, n. 1, p. 157-160, 1993.

MARKS, G.; MOHIUDDIN, M.; EITAN, A. Sphincter preservation surgery for rectal-cancer utilizing high-dose preoperative radiation. *Lyon Chirurg.*, v. 87, p. 25-28, 1991.

MASASHIGE S. Functional Magnetic Particles for Medical Application: Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 606-613, 2002.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociência e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, n. 18, p. 09-21, 2004.

MEDEIROS, E.L.; PATERNO, L.G.; MATTOSO, L.H.C. Nanotecnologia. *In.*: DÚRAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. Nanotecnologia:. Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber Editora, p. 13-29. 2006.

MINAMIMURA, T.; SATO, H.; KASAOKA, S.; SAITO, T.; ISHIZAWA, S.; TAKEMORI, S.; TASAWA, K.; TSUKADA, K. Tumor regression by inductive hyperthermia combined with hepatic embolization using dextran magnetite incorporated micro spheres in rats. **International Journal of Oncology**, v.16, n.6, p. 1153-1158, 2000.

MOGHIMI, S.M.; PATEL, H.M. Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. *Biochimica et Biophysica acta*, v. 984, p. 384-387, 1989a.

MOGHIMI, S.M.; PATEL, H.M. Serum opsonins and phagocytosis of saturated and unsaturated phospholipid liposome. *Biochimica et Biophysica acta*, v. 984, p. 384-387, 1989b.

MORAIS, P.C.; LIMA, E.C.O. Técnicas de preparação de nanopartículas magnéticas e fluidos magnéticos. *In.*: DÚRAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber Editora, p. 83-99. 2006.

MORALES, M.M. **Terapias Avançadas**. São Paulo: Editora Atheneu. 2007. 335p.

MORALES, T.J.; DOWNEY, P. Neutrophil cell signaling in infection: role of phosphatidylinositide 3-kinase. **Microbes and Infection**. V. 5, p. 1293-1298, 2003.

MORAIS, P.C.; GARG, V. K.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA L. P. AZEVEDO, R. B.; SILVA, A.M. L.; LIMA, E. C. D. Synthesis and characterization of size-controlled cobalt – ferrite – based ionic ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, n. 1-2, p. 37 – 40, 2001.

MOROZ, P.; JONES, S.K.; GRAY, B.N. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. **International Journal of Hyperthermia**, v. 18, p. 267–84, 2002.

MULLER, R. H.; KECK, C. M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 151–170, 2004.

NASCHIE, M. S. E. Nanotechnology for the developing world. **Chaos, Solitons and Fractals**, Cobham, v. 30, p. 769–773, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (US). Closing in on cancer solving a 5000 years-old mystery. Bethesda: NCI; 1998 (NIH Publication, n. 98 - 2955)

NASCIMENTO, F.R.F.; CRUZ, G.V.B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AZEVEDO, A.P.S., BARROQUEIRO, E.S.B; GUERRA, R. N.M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v. 78, p. 2650 – 2653, 2006.

NEILSEN, O. S.; HORSMAN, M.; OVERGAARD, J. A future hyperthermia in cancer treatment? **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 1587–1589, 2001.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, p. 622-627, 2006.

NEUHAUS, S. J.; WATSON, D. I. Pneumoperitoneum and peritoneal surface changes. **Surgical Endoscopy**, v.18, p. 1316-1322, 2004.

NEW, R.R.C. Liposomes: a practical approach. The Practical approach series. New York: IRL Press, Ed. Oxford. 1990.

NORPPA, H.; FALCK, G. C. M. What human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v. 18(3), p. 221-233, 2003.

OKUNO, E.; CALDAS, I.L.; CHOW, C. Aplicações das radiações em Biologia e Medicina. *In: Física para Ciências Biológicas e Biomédicas*. 3 ed. São Paulo: Editora HARBRA LTDA, p. 55-54 / 292-293, 1986.

OLIVEIRA, D.M. **Estudos sinérgicos de fármacos fotossensibilizadores utilizados na Terapia Fotodinâmica e fluidos magnéticos utilizados em Hipertermia celular**. Tese de Doutorado em Química, USP – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2006. 162 p.

OLIVEIRA, D. M.; LACAVAL, Z. G. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. **Zinc phthalocyanine/ magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment.** *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6, p. 2432–2437, 2006.

PAGE, D.L. Prognostic and breast-cancer recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am. J. Surg. Pathol.*, **15**: 334-349, 1991.

PANKHURST, Q.A.; CONNOLLY, J.; JONES, S.K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics and Applied Physics*, p. 167-181, 2003.

PEIXOTO, D. L. G. **Avaliação da biocompatibilidade do fungicida anfotericina b em duas formulações: livre e associado com nanopartículas magnéticas.** . Brasília, 2008. 112f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

PEREIRA, M. C. PEREIRA, M. L. SOUSA, J.P. Histological effects of iron accumulation on mice liver and spleen after administration of a metallic solution. *Biomater.*, v. 20: 2193-2198, 1999.

PISON, U.; WELTE, T.; GIERSIG, M.; GRONEBERG, D. A. **Nanomedicine for respiratory diseases.** *European Journal of Pharmacology*, v.533, p. 341–350, 2006.

PORTILHO-CORRÊA, F.A. **Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos.** Brasília, 2007, 74f. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.

QIN, X.Y.; KIM, J.G.; LEE, J.S. Synthesis and magnetic properties of nanostructured g-Ni-Fe alloys. *Nanostruct Mater.* v. 11, n. 2, p. 259–70, 1999.

RABELLO-GAY, M. N. Teste de micronúcleo em medulla óssea. *In*: Rabello-Gay, M.N.; Rodrigues, M. A.; Montleone-Neto, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.** Soc. Bras. Gen. Ed. São Paulo. P 83 – 90, 1991.

RACUCIU, M.R.; CREANGA, D.E.; DESCU, V.P.; SULITANU, N. Microstructural investigation of some biocompatible ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials.** V. 316, p. e772-e775, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia.** 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p.789-809, 2004.

RAU, B.; WUST, P.; HOHENBERGER, P.; LÖFFEL, J.; HÜNERBEIN, M.; BELOW, C.; GELLERMANN, J.; SPEIDEL, A.; VOGL, T.; RIESS, H.; FELIX, R.; SCHLAG, P.M. Preoperative hyperthermia combined with radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer: a phase II clinical trial. **Annals of Surgery**, v. 227, n. 3, p. 380–389, 1998.

RIBEIRO, L.R. **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo.** *In*: Mutagênese Ambiental (Eds RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.) Editora ULBRA, p. 173-200, 2003.

RIBEIRO, J.N.; JORGE, R.A.; SILVA, A.R.; FLORES, A.V., RONCHI, L.M., TEDESCO, A. C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Eclética Química**, v.32, n. 1, p. 07-14, 2007.

RIVIERE, C.; MARTINA, M.S.; TOMITA, Y.; WILHELM, C.; DINH, A.T.; MÉNAGER, C.; PINARD, E.; LESIEUR, S. GAZEAU, F.; SEYLAZ, J. Magnetic Targeting of nanometric magnetic fluid-loaded liposomes to specific brain intravascular areas: a dynamic imaging study in mice. **Radiology**. v. 244, p. 439-448, 2007.

ROACH, P. EGLIN, D. ; ROHDE, K.; PERRY, C.C. Modern biomaterials : a review-bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of Materials Science : Materials in medicine*, v. 18 ; p. 1263-1277, 2007.

ROSENSWEIG, R.E. **Ferrohydrodynamics**. Cambridge University Press, NY, 1985.

ROSSI-BERGMANN; FRÉZARD. Aplicação da nanotecnologia para tratamento e vacinação da Leishmaniose. *In.: Terapias Avançadas*. P.265-277, 2007.

ROMBERG, B.; OUSSOREN, C.; SNEL, C. J.; HENNINK, W. E.; STORM, G. Effect of Liposome Characteristics and Dose on the Pharmacokinetics of Liposomes Coated with Poly(amino acid)s. **Pharmaceutical Research**, v. 24 (12), p. 2394-2401, 2007.

ROTHENBERG, M. L.; CARBONE, D. P.; JOHNSON, D. H. Improving the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p. 303-309, 2003.

SADEGHIANI, N. **Avaliação in vivo da biocompatibilidade/ toxicidade e biodistribuição de fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico**. Brasília, 2004. 90f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

SAHU, R. K.; BASU, R.; SHARMA, A. Genetic toxicological testing of some plant flavonoids by the micronucleus test. **Mutation Research**, v. 89, p. 69 – 74, 1981.

SCOTT, A.M.; WELT, S. Antibody-based immunological therapies. **Cur. Opin. Immunol.**, v. 9, p. 717-722, 1997.

SAWADA, N.O; ZAGO, M.M.F.; GALVÃO, C.M.; BARICHELLO, E. Complicações pós-operatórias nas laringectomias totais: um estudo retrospectivo. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 44, n. 1, p. 34-41, 1998.

SCHÜTT, W.; GRÜTTNER, C.; HAFËLLI, U. et al. Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy – possibilities and limitation: a mini review. **Hybridoma**, **16**: 109-117, 1997.

SCHEU, M.; VEEFKIND, V.; VERBANDT, Y.; MOLINA GALAN, E.; ABSALOM, R.; FORSTER, W. **Mapping nanotechnology patents: The EPO approach**. World Patent Information, v. 28, p. 204–211, 2006.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9 – 15, 1975.

SENGER, D.R.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascitic fluid. **Science**, v.219, p.983-985, 1983.

SESTIER, C.; LACAVAL, Z. G. M.; LACAVAL, L. M.; DA SILVA, M. F.; AZEVEDO, R. B.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P. C.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; SABOLOVIC, D. **In vitro toxicity of magnetic fluids evaluated for macrophage cell lines**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 252, p. 403–405, 2002.

SILVA, A. E. **Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich na deficiência ou suficiência dos esteróides sexuais femininos**. 2003. 85p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG.

SILVA, A. E.; FERREIRA, E.; OCARINO, M.N.;MORAES, J.R.C.; CASSALI, G.D.; SERAKIDES, R. Effect of Hypothyroidism on Growth, Viability, and Characteristics of Ascitic Ehrlich Tumor Cells in Ovariectomized and Non-ovariectomized Mice. **The Journal of Applied Research**, v. 7, n. 2, p. 158-166, 2007.

SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. DNA micro-particulado como vacina contra câncer e tuberculose. *In.*: Terapias Avançadas. P.279-288, 2007.

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

SHINKAI, M.; UEDA, K.; OHTSU, H; Honda, H; Kohri, K.; Kobayashi, T. Effect of functional magnetic particles on radiofrequency capacitive heating. **Jpn. J. Cancer Res.,** **90**: 699-704, 1999.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. **Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos**. Química Nova, v. 25(5), p. 801-807, 2002.

SUZUKI, M.; SHINKAI, M.; YANASE, M.; ITO, A.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Enhancement of uptake of magnetoliposomes by magnetic force and hypertermic effect on tumor. **Jpn. J. Hypertermic Oncol**, **15**: 78-87, 1999.

TAPAJÓS, E.C.C. **Efeitos da Terapia Fotodinâmica mediada por alumínio-cloro ftalocianina (AlClPc) em células de carcinoma bucal**. Tese de Mestrado em Ciências da Saúde - UnB, 2005. 54 p.

TEDESCO, A.C .; ROTTA, J.C.G.; LUNARDI, C.N. Synthesis, Photophysical and Photochemical aspect of phthalocyanines for photodynamics therapy. **Current Organic Chemistry**, v. 7, p. 187-196, 2003.

TEDESCO, A. C.; OLIVEIRA, D. M.; LACAVALA, Z. G. M.; R. B. Azevedo; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P.C. Investigation of the binding constant and stoichiometry of biocompatible cobalt ferrite-based magnetic fluids to serum albumin. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272, p. 2404-2404, 2004.

TEDESCO, A.C.; SIMIONI, A. R.; PRIMO; PRIMO, F.L. (2007) –. Introdução à Nanotecnologia. *In.*: Terapias Avançadas. P.237-246, 2007.

TARTAJ, P.; MORALES, M.P.; GONZÁLEZ-CARREÑO T.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER S.; SERNA, C.J. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 290-291, p.28-34, 2005.

TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S. GONZÁLEZ-CARREÑO, T; SERNA, C. J. **The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine**. Journal Physic D: Applied Physic, v. 36, p. R182-R197, 2003.

THURMAN, J.M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. Clinical Immunology, 2006.

TOLOSA et al., 2003 Livro de técnicas Histológicas do Sacha

TOMA, H.E. O mundo nanométrico:dimensão do novo século. São Paulo: Editora Oficina de texto. 2004. 102p

TOSTA, C. E. Métodos de estudo de macrófagos. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, 1992. 98p.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, p.127–131, 2000.

TRONCONIA, A.L.; OLIVEIRA, A.C.; LIMAB, E.C.D.; MORAISA, P.C. Photoacoustic spectroscopy of cobalt ferrite-based magnetic fluids *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* v. 272–276, p. 2335–2336, 2004.

VAN DER ZEE, J.; GONZALES, G. D.; VANRHOOU, G.C. Comparison of radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomized, multicenter trial. ***Lancet Oncological***, v. 335, p. 1119-1125, 2000.

VERÇOSA JÚNIOR, D.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; CASSALI, G.D.; RIBEIRO, E.L., ZANI, C.L.; MELO, E M.M. Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo ***Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.***, v.58, n.5, p.788-798, 2006.

WUST, P.; HILDEBRANDT, B.; SREENIVASA, G.; RAU, B; GELLERMAN, J.; REISS H. FELIX, R.; SCHIAG, P. M. Hyperthermia in combined treatment of cancer. ***Lancet Oncological***, v. 3, p. 487-497, 2002.

YAN, S.; ZHANG, D.; GU, N.; ZHENG, J.; DING, A.; WANG, Z.; XING, B.; MA, M.; ZHANG, Y. **Therapeutic effect of Fe₂O₃ nanoparticles combined with magnetic fluid hyperthermia on cultured liver cancer cells and xenograft liver cancers.** *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 5, p. 1185-1192, 2005.

YANASE, M.; MASASHIGE, S.; HIROOYUKI, H; WAKABAYASHI, T.; YOSHIDA, J.; KOBAYASHI, T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: ex vivo study. *Jnp. J. Can. Res.*, v. 88, p. 630-632, 1997.

YUN, Y.; DONG, Z.; SHANOV, V.; HEINEMAN, W. R.; HALSALL, H. B.; BHATTACHARYA, A.; CONFORTI, L.; NARAYAN, R. K.; BALL, W. S.; SCHULZ, M. J. **Nanotube electrodes and biosensors.** *Nanotoday*, v. 2(6), p. 30-37, 2007.