

O uso do teste AgNOR possibilitou a contagem de pontos marrons correspondentes às Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR) (Fig. 47).

Resultados obtidos demonstraram uma diminuição significativa de Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR) nos grupos tratados com FM e FM+CMA3x. Nos grupos tratados com FM e expostos ao CMA houve uma diminuição significativa entre o grupo que foi submetido ao CMA uma vez e o grupo submetido três vezes (Fig. 48).

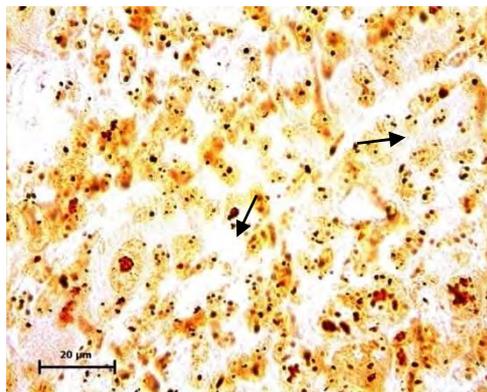


Figura 47 – Fotomicrografia do TSE corado pela coloração AgNOR, os pontos marron apresenta os NOR (setas)

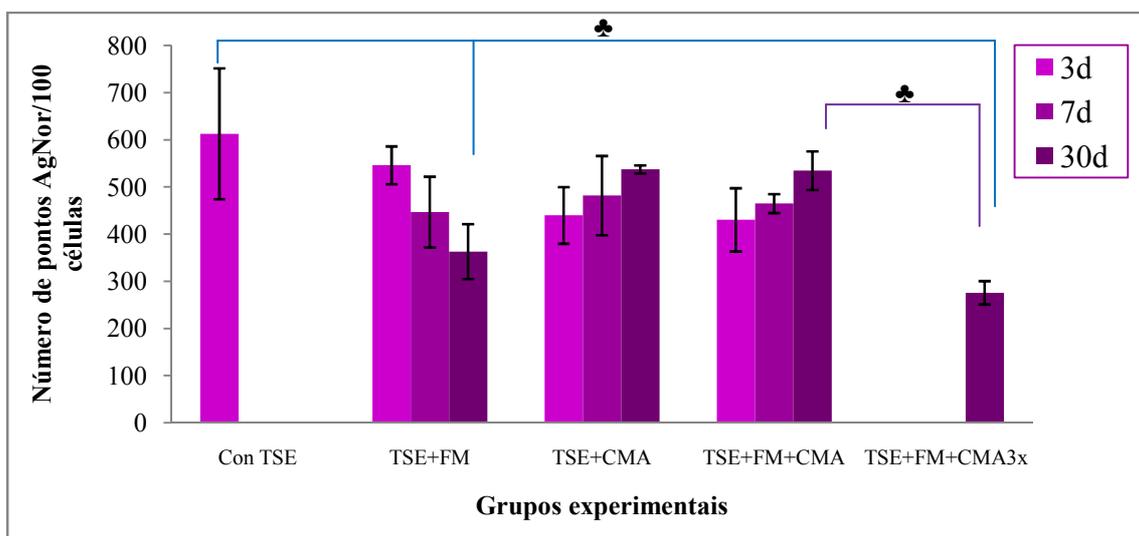


Figura - 48: Efeito da administração intratumoral de 100µL do FM-PAS-2 no número de pontos AgNor no núcleo de 100 células tumorais na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado, 3x = exposição ao CMA por 3 vezes cada 24h.

4.4.4 – Análise de proliferação celular pelo teste de índice mitótico (IM)

A análise demonstrou uma diminuição significativa no número de células em mitose nas diferentes fases (**Fig. 49**) no grupo TSE+FM+CMA3x em relação com grupo de controle TSE (**Fig. 50**).

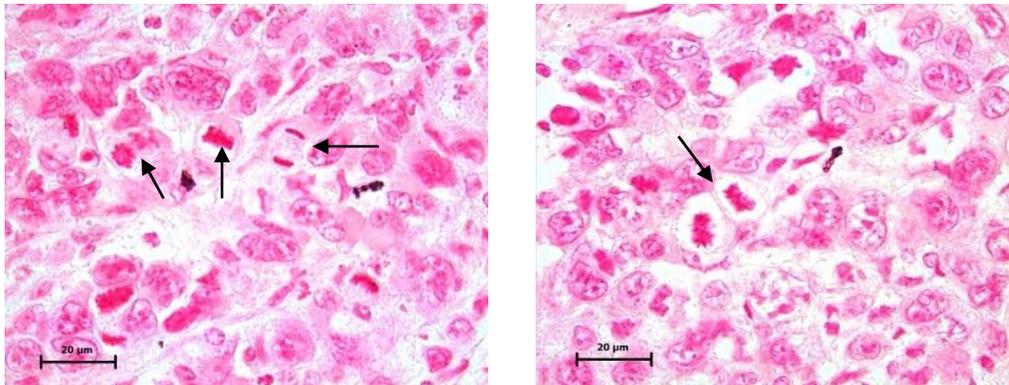


Figura 49 – Fotomicrografia do TSE corado pela coloração Perls para realizar contagem de células em mitose, as setas apontam as células mitóticas e os cromossomos.

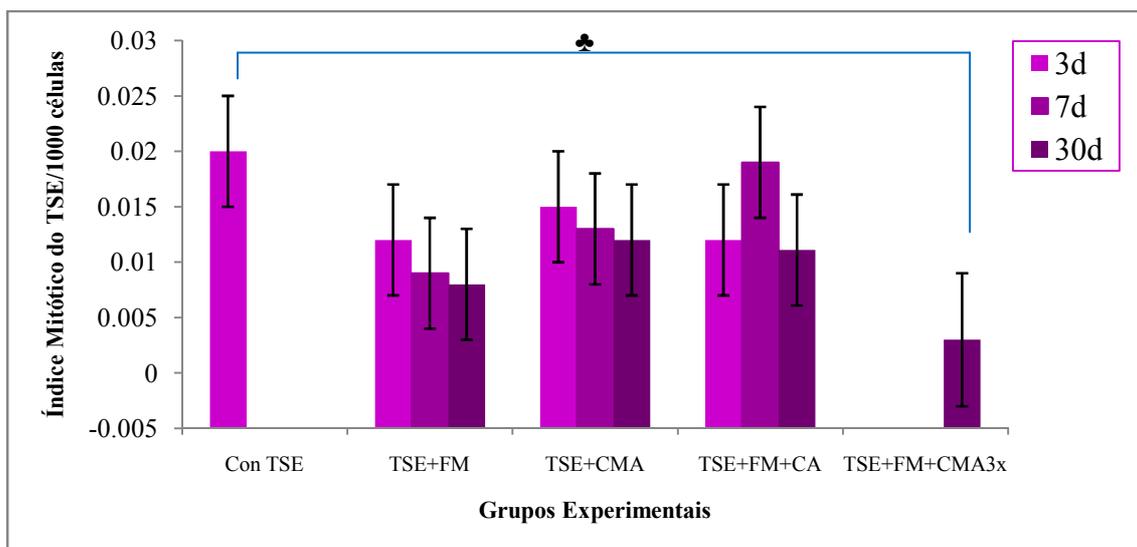


Figura - 50: Efeito da administração intratumoral de 100µL do FM-PAS-2 no índice mitótico do em 1000 células tumorais na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado, 3x = exposição ao CMA por três vezes cada 24h. ♣ aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

4.4.5 – Análise de volume da massa tumoral

Para avaliar o efeito dos tratamentos no crescimento da massa tumoral, o volume tumoral foi calculado a partir de medidas realizadas em dois momentos: no dia do tratamento, identificado como T, e no dia da coleta, como C (**Fig. 52**). O volume tumoral teve um aumento significativo em todos os grupos avaliados aos trinta dias de tratamento, sejam eles apenas tratados com FM-PAS (TSE+ FM-C), com o campo magnético (TSE+CMA-C) ou com ambos, FM mais o campo magnético (TSE+FM+CMA-C), em relação ao seu próprio grupo experimental no dia do tratamento (T), ao seu grupo em tempos diferentes (3d e 7d) e também em relação ao grupo tratado com FM e exposto 3 vezes ao CMA (FM+CMA3×-C-30d). O volume tumoral está ilustrado na **figura 51** que mostra tumores com tratamentos diferentes sete dias após o tratamento, todos inoculados no mesmo dia. Os tumores um e cinco pertenciam a animais do grupo controle TSE, o segundo tumor era de TSE tratado com FM+CMA, o terceiro tumor de TSE tratado com FM (**Fig. 51 (3)**) e o tumor quatro de animal exposto ao CMA. No animal TSE+FM exposto ao CMA, como mostrado na **figura 51 (2)**, as nanopartículas estão mais concentradas, atraídas para o local da aplicação do campo. Ao contrário, as nanopartículas ficaram mais aglomeradas no centro, a parte mais necrosada do tumor (**Fig. 51 (2 e 3)**). Na **figura 51 (4)**, o tumor de um animal do grupo TSE exposto apenas ao CMA. A superfície do tumor sem tratamento apresenta-se mais regular e lisa. Os animais, possivelmente por não serem isogênicos, desenvolveram tumores com diferentes tamanhos (**Fig. 51 (1 e 5)**).

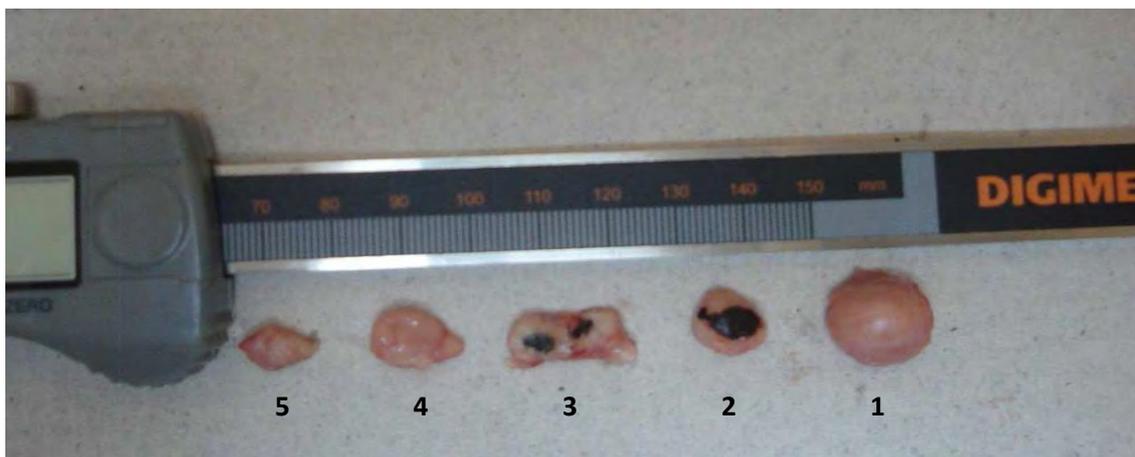


Figura 51: Tamanho do tumor sete dias após o tratamento com tratamentos diferentes. 1 e 5 = Controle TSE, 2 = TSE+FM+CMA, 3 = TSE+FM e 4= TSE+CMA

4.4.6 – Avaliação do peso animal

Avaliação do peso animal no dia de tratamento e dia da coleta entre os diferentes grupos (**Fig. 53**) demonstrou um aumento significativo do peso animal do grupo TSE+FM-C-30d em comparação com grupo controle ST-30d e os mesmos grupos de tratamento embora com tempo 3 e 7 dias e com seu grupo no dia de tratamento (TSE+FM-T-30d). Esse aumento foi observado também no grupo TSE+CMA-C-30d em relação com grupos ST-C-30d, TSE+CMA-C-3d, TSE+CMA-C-7d e TSE+CMA-T-30d. Não houve diferenças significativas estatisticamente entre outros grupos de tratamento.

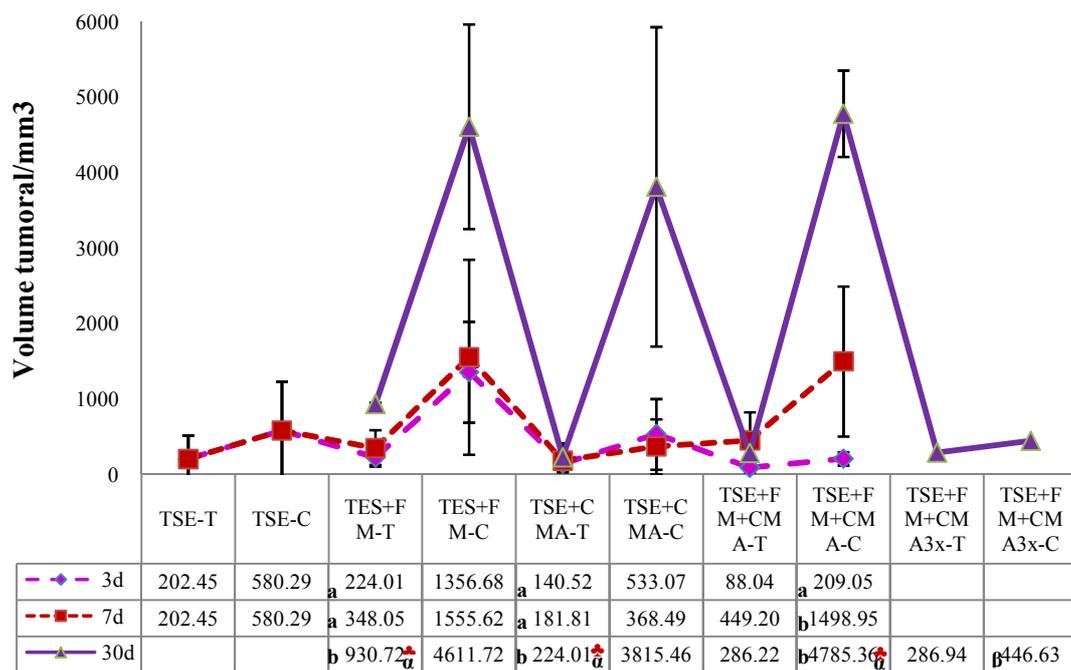


Figura 52: Volume tumoral de camundongos controle TSE e com TSE tratados com FM-PAS-2 na presença ou ausência do CMA ou expostos ao CMA nos dias do tratamento e da coleta. T = Tratamento, C = Coleta, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, FM = Fluido Magnético, CMA = Campo Magnético Alternado. ♣ aponta diferenças significativas estatisticamente entre grupos T e C no mesmo tempo. As letras (a,b,c) apontam a diferenças entre mesmos grupos de tratamento nos tempos diferentes. As letras α e β apresentam diferenças entre grupos diferentes em 30 dias. ($p < 0,05$).

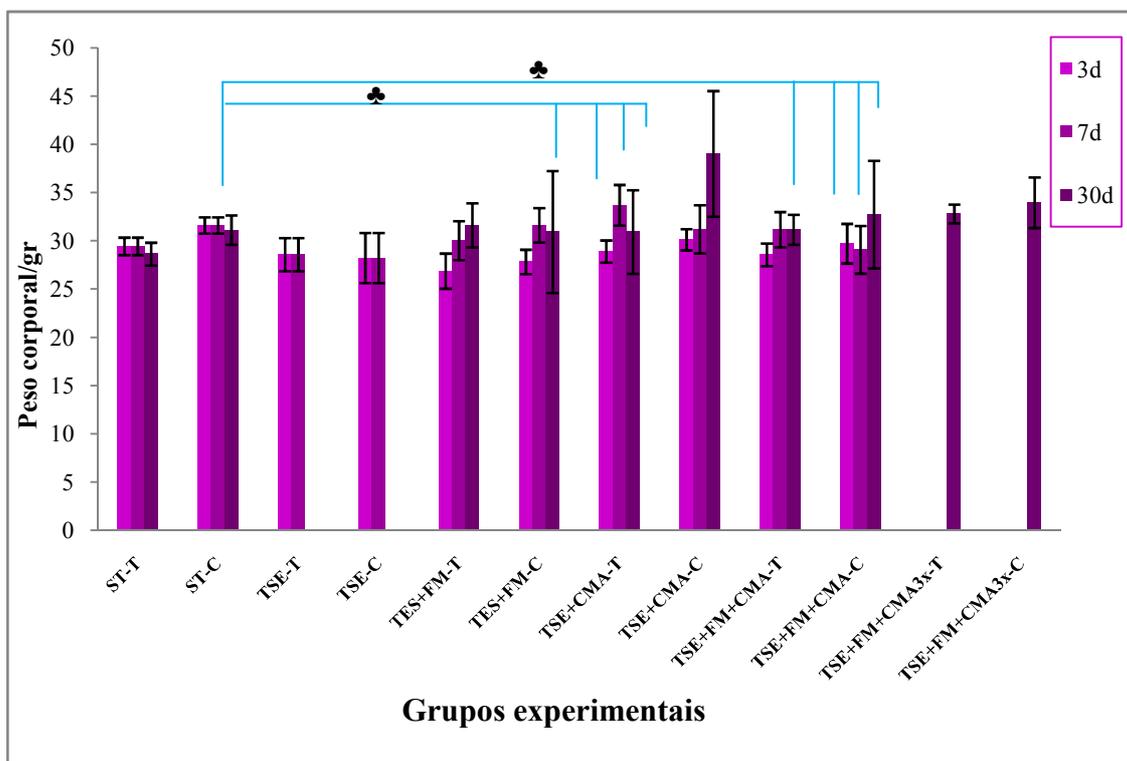


Figura 53: Peso corporal de camundongos sadios sem tratamento, controle TSE e com TSE tratados com FM-PAS-2 na presença ou ausência do CMA ou expostos ao CMA, nos dias do tratamento e da coleta. ST = Sem Tratamento, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, FM = Fluido Magnético, CMA = Campo Magnético Alternado, T = Tratamento, C = Coleta. ♣ aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

4.4.7 – Observações clínicas

✓ Durante todo o tratamento os animais apresentaram os aspectos clínicos normais sem complicações tais como letargia, diarreia ou problemas cardiorrespiratórios.

✓ Os animais do grupo TSE+FM 3d e 30 dias apresentaram fraqueza com pelos arrepiados que não foram muito evidente no sete dias.

✓ Na região das aplicações do CMA nos animais tratados com **FM-PAS-2**, intratumoralmente, em baixo da pele houve acúmulos das nanopartículas atraídas pelo campo magnético alternado (**Fig. 54a**).

✓ Alguns animais tratados desenvolveram o tumor secundário ao lado do primeiro, demonstrando a agressividade e a resistência das células tumorais ao tratamento (**Fig. 54b**).



Figura 54 – Fotografias dos camundongos com TSE, a = as nanopartículas retraídas pelo CMA e acumuladas na parte interior da pele e superfície do tumor (seta), b = animal com tumor secundário (seta).

✓ Com aumento do tamanho do tumor o centro do tumor ficou mais líquido apresentando muitas células mortas e tecido necrosado com odor desagradável.

4.5 - Resultados da Etapa 4

A análise de Ressonância Magnética dos tumores tratados com **FM-PAS-1**, endovenosamente, e submetido ao CMC utilizando o eletroímã (Equip. II) não detectou a presença de NPM nos mesmos (dados não mostrados). A análise histopatológica dos tumores também não mostrou a presença de aglomerados das nanopartículas (dados não mostrados).

5 - Discussão

Neste trabalho foram investigados os efeitos biológicos de amostra de fluido magnético constituído por nanopartículas magnéticas recobertas por ácido poliaspártico, administrada por diferentes vias em camundongos, e seu papel nos processo de Magnetohipertermia (MHT) em portadores de Tumor Sólido de Ehrlich (TSE).

O trabalho foi desenvolvido em quatro etapas, sendo a primeira delas a avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de FM-PAS administrada endovenosamente em animais saudáveis. A etapa dois teve como objetivo verificar a biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de FM-PAS administrada intraperitonealmente em animais saudáveis, na presença ou ausência de campo magnético de frequência alternada. A terceira etapa teve como objetivo testar os efeitos de FM-PAS em animais portadores de Tumor Sólido de Ehrlich submetidos ou não ao campo magnético AC, verificando os efeitos da MHT sobre a remissão tumoral. Por último, na quarta etapa foram realizados testes com um novo equipamento gerador de campo DC para verificar seu potencial em atrair para o tumor nanopartículas magnéticas administradas endovenosamente.

5.1 – Considerações sobre a amostra FM-PAS

A amostra FM-PAS, fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas por ácido poliaspártico, foi escolhida para realizar os testes deste trabalho devido aos resultados obtidos em trabalhos prévios (SADEGHIANI, 2004) que, ao utilizarem amostra estabilizada em meio alcalino, sugeriam biocompatibilidade e biodistribuição adequada para aplicações biomédicas. Para aumentar este potencial sugeriu-se o desenvolvimento de uma nova amostra de FM-PAS estabilizada em meio aquoso e pH fisiológico e testá-la fez parte do objetivo deste trabalho.

A biocompatibilidade dos fluidos magnéticos depende de muitos fatores. Os parâmetros físicos e químicos das nanopartículas, tais como tamanho, cobertura e constituição química, apresentam grande importância na determinação de seu comportamento e eficiência em aplicações biomédicas (BAHADUR; GIRI, 2003). O diâmetro médio das partículas pode influenciar diretamente em parâmetros como o tempo de permanência das mesmas no organismo, a velocidade com que atravessam a barreira endotelial e seu reconhecimento pelo sistema reticulo endotelial (SRE) (HALBREICH *et al.*, 1998; BERRY; CURTIS, 2003).

Além da microscopia de força atômica e da ressonância magnética (LACAVA *et al.*, 2001; SADEGHIANI *et al.*, 2005), a microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica adequada para a determinação do diâmetro das partículas de um fluido magnético. Ao ser usada neste trabalho, a MET mostrou que as nanopartículas de FM-PAS possuem diâmetro médio de 7,9nm . Tamanhos reduzidos e monodispersão, outra característica das nanopartículas investigadas, podem facilitar a rápida distribuição do material magnético pelo organismo. Em acordo com essa premissa, as partículas do FM-PAS apresentaram rápida distribuição, pois cerca de 30 minutos após administração não foram mais detectadas no sangue, como verificado por estudos de ressonância magnética (dados não mostrados). Ainda em relação ao tamanho das partículas, foi observado que aquelas com diâmetro de 9 nm podem se distribuir rapidamente pelos espaços intracelulares, ao contrário de partículas com tamanhos de 50 a 100 nm, que permanecem na circulação ou nas paredes do sistema vascular por não serem difundidas por esta via (BRIGHTMAN, 1965).

Embora tenha sido evidenciada a importância de que as partículas magnéticas tenham tamanho bastante reduzido, Ma e colaboradores (2004) mostraram que partículas com tamanho inferior a 4 nm perdem suas propriedades magnéticas e, conseqüentemente, sua capacidade de responder ao campo magnético alternado,

resposta esta essencial para a realização da magnetohipertermia. De acordo com estas investigações, **FM-PAS-1** satisfaz os critérios de tamanho ideais para aplicações biomédicas.

A natureza química das partículas constituintes de um material magnético é responsável por diversos comportamentos observados em diferentes amostras, como FM composto de nanopartículas de ferrita de manganês (LACAVA, *et al.*, 1999 a, b), de magnetita (GARCIA, *et al.*, 2002 a, b) e de ferrita de cobalto (KUCKELHAUS, *et al.*, 2003) e de maghemita (BRUGIN, 2007), todas essas amostras foram recobertas pelo mesmo material, o ácido cítrico. Cada uma destas amostras causou efeitos biológicos diferentes. A amostra baseada em nanopartículas de ferrita de manganês induziu morte celular, genotoxicidade e reações inflamatórias severas. As nanopartículas de magnetita não apresentaram alta genotoxicidade e citotoxicidade, apenas um leve processo inflamatório. A amostra à base de ferrita de cobalto não provocou genotoxicidade, mas apresentou citotoxicidade e processo inflamatório, embora essas reações tenham sido muito brandas. Por sua vez, as nanopartículas à base de maghemita apresentaram alta biocompatibilidade. Estes resultados sugerem que os efeitos biológicos obtidos são, provavelmente, devido à composição química distinta das nanopartículas. Em particular, a magnetita tem sido apontada como possível constituinte de agentes de contraste para imagens de ressonância magnética devido ao fato de aparentemente não possuir toxicidade, mesmo na ausência de recobrimento (MULLER *et al.*, 1996; HILGER *et al.*, 2003, 2005).

A cobertura das partículas magnéticas é um fator estabilizante para os fluidos, característica que faz com que as partículas não formem agregados e não precipitem em meio líquido. Resultados prévios revelaram que fluidos magnéticos à base de nanopartículas de magnetita podem ter efeitos biológicos diversos quando estas partículas possuem diferentes coberturas. As nanopartículas de magnetita recobertas

com dextrana possuem afinidade maior pelo fígado e baço (LACAVA *et al.*, 2002).

As partículas de magnetita recobertas com ácido dimercaptosuccínico (DMSA) têm uma grande afinidade pelo pulmão, levando a um processo inflamatório agudo nesse órgão (CHAVES *et al.*, 2002). Amostras em que as nanopartículas de magnetita são recobertas com ácido cítrico ou ácido glucônico mostram preferência pelo fígado, baço e pulmão, mas enquanto a amostra com ácido cítrico não causa efeitos biológicos tóxicos severos (GARCIA *et al.*, 2002 a, b), a amostra com ácido glucônico apresenta alta genotoxicidade, citotoxicidade e alterações morfológicas bastante significativas, principalmente no pulmão (BARBOSA, 2004). Estes estudos evidenciam que a natureza química do estabilizador também influencia no comportamento diferenciado das partículas em testes biológicos, ressaltando que a cobertura tem um papel importante na propriedade dos materiais magnéticos. No presente trabalho, investigou-se uma amostra de fluido magnético também à base de nanopartículas de magnetita, mas recobertas com ácido poliaspártico, o FM-PAS. Utilizado como cobertura de nanopartículas de magnetita, o ácido poliaspártico conferiu, em vários dos testes biológicos realizados previamente (SADEGHIANI, 2004) comportamento biológico e graus de biocompatibilidade suficientes para que a amostra **FM-PAS-1** fosse investigada no processo de magnetohipertermia para tratamento do tumor sólido de Ehrlich (TSE). O ácido aspártico é um aminoácido glicogênico secretado pelas células neuroendócrinas e presente na estrutura de enzimas como tripsina, quimotripsina e elastase, secretadas pelo pâncreas. Como catalisador, participa da primeira etapa de síntese de pirimidinas, além de ser intermediário nos ciclos de ácido cítrico e uréia (MITROVIC *et al.*, 1999). Além da participação nos ciclos metabólicos, algumas classes destas enzimas proteolíticas são constituídas pelo ácido aspártico, como a pepsina no estômago, a renina, que participa na transformação do angiotensinogênio em angiotensina, e a quimosina ou caseinase, que existe no estômago de bovinos e que por

muito tempo foi empregada na fabricação de queijos (NELSON; COX, 2005). Esses grupos de enzimas agem como um fator essencial da replicação do vírus HIV-1 e são utilizados pelos fungos para digerir material vegetal em decomposição. Por estas características, o ácido poliaspártico tem, por si só, atividade anti-tumoral (MOORE *et al.*, 1982; NOORDHUIS *et al.*, 1996, KÖHNE *et al.*, 1997).

A amostra FM-PAS estabilizada em pH fisiológico, teve, como mostrado, ampla distribuição por todos os órgãos investigados, diferindo de amostra anteriormente estudada (SADEGHIANI, 2004) que, embora com nanopartículas de magnetita também recobertas por ácido poliaspártico foram encontradas apenas no fígado, pulmões e baço. Nesse caso o fluido magnético estava estabilizado em meio alcalino, único aspecto a explicar a diferença na biodistribuição observada.

A amostra **FM-PAS-1** também não induziu efeitos colaterais, como dificuldade respiratória, letargia, diarreia e perda de apetite. Os animais tratados com amostra **FM-PAS-1** apresentaram-se apáticos, deprimidos e com diminuição de apetite apenas nas primeiras 12 horas após a injeção. O fato de não terem ocorrido óbitos durante as aplicações ao longo dos tratamentos, até o dia de coleta, impediu a determinação do índice da DL-50, observação similar à realizada por Babincova e colaboradores (2000) e Lacava (2004 a, b) realizadas com partículas de magnetita associadas à dextrana. Estes dados representam um outro indício da biocompatibilidade da amostra.

O conjunto das características – tamanho, composição química e cobertura das nanopartículas – além dos fatores inerentes ao próprio processo de síntese, certamente contribuíram para determinar o padrão de comportamento da amostra como altamente biocompatível e promissora no tratamento de câncer.

5.2 - Considerações sobre os testes biológicos

Os avanços acelerados da nanobiotecnologia têm demandado conhecimentos aprofundados sobre o mecanismo de ação das nanopartículas, sua interação com células e tecidos, na esfera do que se denomina nanotoxicologia. Além disso, para aprovação de novas formulações para diagnóstico e tratamento de doenças é necessária a realização de variados testes, a fim de prover informações de eficácia e segurança junto aos órgãos regulatórios. Os testes envolvem 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 que verificam a existência e extensão de alterações de componentes do sangue na presença de material exógeno, como a citometria de leucócitos, teste de viabilidade celular e teste de micronúcleo.

A análise citométrica constitui 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).

Neste experimento, os animais controle apresentaram contagem global de leucócitos sangüíneos em acordo com a literatura, enquanto os animais tratados com amostra **FM-PAS-1**, via endovenosa, apresentaram diminuição temporária (12h-1dia) da população total de leucócitos.

Também em acordo com dados da literatura, a população de linfócitos é a mais abundante no sangue dos camundongos (ROBINSON, ROITT, 1974). Ainda que as populações de outros tipos leucocitários tenham apresentado alteração em algumas das observações realizadas, é a população de linfócitos a responsável pelas alterações significativas na população total de leucócitos.

Os neutrófilos são a principal população celular na resposta inflamatória aguda. Eles respondem rapidamente a estímulos quimiotáticos, fagocitam e auxiliam na eliminação de partículas estranhas (FELDMAN *et al.*, 1999). Em consonância com estes dados, em nossos experimentos a frequência de neutrófilos aumentou no sangue de animais tratados com **FM-PAS-1** (intervalo entre 12 horas e um dia). Em ambos os tratamentos a frequência destas células estava normalizada a partir de sete dias após o tratamento. Estes dados denotam um ligeiro processo inflamatório, comum na presença de agentes estranhos. Confirma essa idéia a ausência de observações relacionadas a processos inflamatórios constatada na análise morfológica dos órgãos dos animais tratados.

Os mecanismos de produção e sobrevivência de eosinófilos são muito semelhantes aos dos neutrófilos. Quase todos os tipos de reações inflamatórias apresentam, na fase tardia, um certo grau de eosinofilia que para muitos pesquisadores é uma resposta não específica, mas para outros, uma reação alérgica altamente específica (ANSARI, WILLIAMS, 1976; GEPPETTI, 1998). De qualquer forma, os grânulos presentes nestas

células contêm toxinas com capacidade para destruir patógenos e um aumento nessas populações pressupõe a necessidade de defesa do organismo. No presente trabalho, a amostra **FM-PAS-1** não induziu aumento na população de eosinófilos no intervalo de 12 horas a sete dias após o tratamento.

Nas investigações de nanoestruturas magnéticas tem sido relatada uma gama muito variável de intensidade de reações citométricas. De forma geral, entretanto, estas reações representam processos inflamatórios brandos que ocorrem de maneira tempo e dose-dependentes (BRUGIN, 2007; PORTILHO-CORRÊA, 2007).

De forma similar, as interações entre células e nanopartículas podem também ser avaliadas por citometria das células peritoneais. Entretanto, ao contrário dos resultados na contagem total de leucócitos após administração via endovenosa de FM-PAS, a administração intraperitoneal da mesma amostra e em concentração igual não induz alterações na citometria leucocitária no sangue. Este fato é importante na compreensão dos efeitos das nanopartículas administradas por diferentes vias.

Sabe-se que a célula predominante na cavidade peritoneal de camundongos Swiss é o macrófago (LEIBOVICH, ROSS, 1975; LACAVA *et al.*, 1999), célula que secreta interleucinas, importante fator das reações inflamatórias responsável pelos eventos que alteram as populações peritoneais (GARCIA *et al.*, 2002). Por fazerem parte do sistema mononuclear fagocitário, têm papel importante na resposta primária gerada na cavidade abdominal em resposta a agentes estranhos, como é o caso das nanopartículas magnéticas (NEUHAUS, WATSON, 2004). Estudos *in vivo* com nanopartículas variadas mostram que os macrófagos fagocitam essas nanopartículas (LACAVA *et al.*, 1999b; 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. Evidências de processo inflamatório foram evidenciadas, entre outros, 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).

Também relevante, o teste de micronúcleo tem sido amplamente utilizado como um marcador para a detecção de alterações citogenéticas produzidas por agentes clastogênicos, mutagênicos e, mais recentemente, para nanomateriais (PEACE; SUCCOP, 1999, GUEDES, 2004). Micronúcleo (Mn) é o nome dado aos fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que permanecem na célula quando, no processo de maturação do eritrócito, o núcleo principal é expelido (SCHMID, 1975). Eritrócitos policromáticos anucleados (PCE) têm normalmente menos que 30 horas de idade e se coram diferentemente de células mais velhas, conhecidas por eritrócitos normocromáticos (NCE). Além da vantagem de ser executado rapidamente, o teste de MN possibilita tirar conclusões sobre o estágio proliferativo na medula óssea e o tempo específico de ação do mutágeno no ciclo celular (MAIER, SCHMID, 1976).

Neste experimento, a investigação de MN foi realizada em camundongos fêmeas jovens. Segundo Rabello-Gay (1991), o teste de MN deve ser aplicado em animais jovens de ambos os sexos. Entretanto, Holmstrom (1988) relatou indução similar de Mn em ambos os sexos para a maioria de mutágenos. Além disso, em estudos de monitoramento de população humana exposta a mutágenos, normalmente não são encontradas diferenças sexuais quanto à frequência de alterações genéticas (BONASSI *et al.*, 1994; CRUZ *et al.*, 1994). Estas referências justificam o uso exclusivo de animais fêmeas em nosso trabalho.

Nos controles e após tratamentos que não afetam o estágio proliferativo das células da medula óssea, a relação esperada entre PCE e NCE é de aproximadamente 1:1 (SCHMID, 1975; RABELLO-GAY, 1991) e qualquer desvio desta proporção pode significar efeito citotóxico do tratamento (SAHU *et al.*, 1981).

O **FM-PAS-1** induziu nos animais tratados a citotoxicidade e não genotoxicidade, pois as frequências de MN obtidas estão muito próximas aos valores considerados normais (até três MN em 1000 eritrócitos). A alta concentração de partículas magnéticas administradas no sangue, entretanto, induziu uma ligera citotoxicidade não duradoura constatada pela percentagem de PCE após a injeção da amostra **FM-PAS-1**.

É interessante observar que, enquanto a citometria diferencial das células sanguíneas não se altera de modo diferente com vias de administração diferentes, a frequência de MN se comporta de forma diferente: diminui quando o FM é administrado endovenosamente e aumenta significativamente, se administrado por via intraperitoneal.

O teste de viabilidade celular, realizado *in vivo* ou *in vitro*, constitui uma outra 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, DMSA ou ácido cítrico (Kuckelhaus *et al.*, 2003).

Estes testes, juntamente com testes histológicos, formam um conjunto que avalia com sucesso materiais nanoestruturados. Entre as várias metodologias utilizadas para

investigar as interações nanopartículas e tecidos e seus 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 histopatológica dos órgãos de camundongos tratados com nanopartículas magnéticas é usualmente realizada no fígado, baço e pulmões e neste trabalho foram investigados o fígado, baço, pulmões, pâncreas, coração e rins.

As análises histopatológicas realizadas mostraram que as NPM de magnetita recobertas com ácido poliaspártico se dirigem para o fígado, baço, pulmões, rins, pâncreas e coração, embora com concentração diferente em cada órgão. A maior afinidade das nanopartículas foi observada no fígado e baço primeiramente e em seguida nos pulmões, pâncreas, rins e coração. Assim como o **FM-PAS-1**, nanopartículas de magnetita recobertas com ácido cítrico também apresentam maior afinidade pelo fígado, baço e pulmão (GARCIA, 2002 a, b), enquanto as recobertas por DMSA apresentam maior afinidade pelo pulmão (CHAVES *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2004) e, subseqüentemente, pelo fígado, mas, diferentemente daquelas amostras, não foram detectadas no baço. Por outro lado, nanopartículas de magnetita recobertas com dextrana se dirigem essencialmente para o fígado e o baço, mas são também detectadas na medula óssea (LACAVA *et al.*, 2002). Estas diferenças na biodistribuição das NPM são interessantes, pois oferecem a possibilidade de tratamentos sítio-específicos.

É relevante observar que embora agregados de NPM das amostras **FM-PAS-1** sejam encontrados em órgãos analisados até sete dias após o tratamento, nenhuma alteração morfológica foi encontrada nos mesmos. A longa permanência de agregados de NPM no fígado e baço sem efeitos morfológicos (SADEGHIANI, 2004), inclusive

ao microscópio eletrônico, foi também observada por LACAVA (2004) em estudos de NPM de magnetita recobertas por dextrana realizada até seis meses após o tratamento.

Este conjunto de testes biológicos que fornece informações sobre o grau de biocompatibilidade/toxicidade de amostras magnéticas e também parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos reconhecidos como instrumentos altamente promissores no processo de racionalizar e acelerar o desenvolvimento de drogas (LIN, LU, 1997; MEIBOHM, DERENDORF, 2002) tem sido realizado rotineiramente por pesquisadores do Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia (CNANO) do Instituto de Ciências Biológicas – UnB, para avaliar a biocompatibilidade de diversas amostras de FM e de magnetolipossomas 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 a, b); (2) NPM à base de ferrita de cobalto recobertas com ácido cítrico ou encapsuladas em lipossomas associados a polietilenoglicol (Kückelhaus, 2003; BARBOSA, 2008); (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).

Baseados nestes testes biológicos foi concluído que algumas destas formulações, inclusive a deste trabalho, apresentam resultados promissores para futuras aplicações biomédicas (CHAVES *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2002; KÜCKELHAUS, 2003;

GUEDES *et al.*, 2005; BRUGIN, 2007; PORTILHO-CORRÊA, 2007; BARBOSA, 2008; COELHO, 2008; ESTEVANATO, 2008; PEIXOTO, 2008), enquanto outras amostras demonstraram alta toxicidade e mutagenicidade, dose e tempo dependentes (LACAVAL *et al.*, 1999a; FREITAS *et al.*, 2002; CHAVES *et al.*, 2002; BARBOSA, 2004).

5.3 - Considerações sobre o Tumor

O tumor de Ehrlich (TAE) foi introduzido por Paul Ehrlich (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.*, 2004). LOEWENTHAL e JAHN (1932) introduziram a forma ascítica, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com as células tumorais (DAGLI, 1989). O TAE tem sido extensamente utilizado em estudos oncológicos devido a sua grande facilidade de manipulação experimental (MATSUZAKI *et al.*, 2003; SAAD-HOSSNE *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2006). Pode ser induzido, 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). Em nossos experimentos foram realizadas várias tentativas de implante do TSE nas mais variadas

partes do camundongo e foi concluído que o local mais adequado para posterior tratamento com campo magnético seria a região lombar traseira.

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 FM-PAS e à exposição ao campo magnético. 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 (TRERÉ, 2000; FILIPPIN *et al.*, 2006).

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) (BANKFALVI *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, 1994). Essas proteínas associadas às regiões organizadoras do nucléolo têm grande afinidade pela prata (UNDERWOOD, GIRI, 1988), sendo chamadas AgNOR (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, TRERÉ, 1994; DERENZINI, 2000; PICH *et al.*, 2000).

O aumento da síntese protéica constitui uma das alterações que ocorrem no processo de transformação neoplásico. Nas Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR) encontram-se os loci dos genes para RNA ribossômico (RNAr). As NORs apenas apresentam afinidade pela prata quando transcricionalmente ativas, sendo então denominadas AgNOR (RODRIGUES *et al.*, 1997). A técnica de AgNOR é um método histoquímico que evidencia as Regiões organizadoras de nucléolo (NOR), sendo considerado um bom marcador de proliferação celular e conseqüentemente pode ser usado para avaliar malignidade.

A técnica de AgNOR marca as regiões organizadoras de nucléolo (NOR) e foi descrita por Heintz (1931) e por McClintock (1934) e posteriormente modificada por Derenzini (2000). As NOR podem ser facilmente identificadas em microscópio de luz mediante a impregnação por prata coloidal (AgNOR). São produzidas por proteínas nucleolares facilmente identificáveis pela impregnação por prata e visualizados em regiões secundárias dos cromossomos (EGAN, 1988; CROKER e EGAN, 1988; SOOMRO *et al.*, 1991).

Embora não tenha sido realizada uma análise morfométrica após o teste AgNOR, foi possível constatar redução significativa da atividade proliferativa no tumor,

evidenciada pela diminuição de pontos AgNOR, 30 dias após o tratamento intratumoral com a amostra FM-PAS. A redução foi ainda mais expressiva 30 dias após tratamento com o FM e exposição por três dias subsequentes ao campo AC.

Outros parâmetros também foram avaliados, tais como o peso corpóreo, viabilidade celular. Todos esses parâmetros foram eficientes em fornecer dados que ajudam na análise da eficiência dos procedimentos de MHT no tratamento do TSE.

O fato do tratamento com FM ter levado por si só à redução da atividade proliferativa do tumor, enquanto tinha aparente biocompatibilidade com células normais poderia ser explicado por uma série de fatores, como: o ácido poliaspártico inibir a síntese de pirimidinas e purinas, o fato do ferro ser muito tóxico para células mesenquimais (H. Friedman, informação pessoal). Além destes, 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 efeitos antitumorais do campo magnético ficam bastante evidenciados 30 dias após tratamento com o FM e exposição por 3 dias subsequentes ao campo AC, tanto na redução dos pontos AgNOR, como nas análises histopatológicas realizadas. Nestas é visível grandes áreas necrosadas no interior do tumor e também áreas caracterizadas por fibrose, nos tecidos imediatamente subjacentes ao campo magnético AC. Esta fibrose do tecido tumoral só é observada nos tumores expostos ao campo AC, tenha ou não tratamento com FM-PAS. Por sua vez, as áreas necrosadas podem refletir processos comuns em tumores de grande tamanho, como também a presença de alta concentração de ácido poliaspártico e de grande quantidade de neutrófilos,

características que aumentam a acidez do meio e fazem com que o tecido tumoral seja liquefeito.

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 neutrófilos 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 neutrófilos em todos os tratamentos testados (**FM-PAS**, submetidos subseqüentemente ao campo AC), realçando o papel dos tratamentos efetuados.

5.4 - Considerações sobre a Magnetohipertemia

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 (NPM) biocompatíveis. Assim que as nanopartículas são capturadas pelas células cancerígenas, são submetidas a um campo magnético 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 (o que foi investigado pelo uso do Equip II) 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, como a terapia fotodinâmica (BARBOSA, 2008) tem sido de grande interesse, pois pode potencializar o efeito terapêutico, possibilitando resultados satisfatórios.

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, conforme já relatado anteriormente.

Considerando que o ácido poliaspártico utilizado na cobertura das partículas, por si só, tem atividade comprovadamente anticancerígena e ainda que, mesmo tendo formado aglomerados de NPM nos órgãos até sete dias após o tratamento, não houve danos teciduais, a amostra FM-PAS pode ser indicada para carreadores de drogas diretamente até os órgãos alvo (fígado, baço e pulmão, principalmente) ou ser usada no tratamento específico destes órgãos. Caso anticorpos monoclonais sejam associados às NPM, estas estruturas poderão ser dirigidas para outras regiões do corpo e serem empregadas na magnetohipertermia.

Na avaliação do potencial tóxico da amostra **FM-PAS-1** na presença ou ausência do CMA realizada na cavidade peritoneal foi possível constatar um moderado grau de toxicidade revelado pela alta taxa de morte celular. Enquanto nos controles as células mortas representavam 15% do total de células peritoneais, nos tratados este valor ficou em torno de 30% em dois momentos apenas: cinco minutos e sete dias após o tratamento. Embora aumentadas também 30 minutos, um e dois dias após a injeção, nestes momentos a quantidade de células vivas estava aumentada muitas vezes, fazendo com que a proporção de células mortas no peritônio ficasse ainda menor do que o observado no controle. As partículas magnéticas recobertas com ácido poliaspártico são reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear e por meio de uma série de sinais

induzidos após a ligação a receptores específicos na membrana celular, cuja afinidade pelo ácido poliaspártico está aumentada pela presença de ferro, favorecem a migração das células do sangue periférico para a cavidade peritoneal. Por ser hidrofílico, o ácido poliaspártico absorve grande quantidade de água, conseguindo passar certo tempo não percebido pelo sistema fagocitário mononuclear, o que pode explicar a migração tardia (principalmente a partir de 24 horas do tratamento) de leucócitos para o peritônio. Isto poderia também explicar não ter havido indução de aderência dos órgãos na cavidade após administração do FM via intraperitoneal, como verificado pelo teste de viabilidade.

A análise histopatológica mostrou que os efeitos do CMA foram mais observados na região subjacente à aplicação do campo magnético, evidenciando que o campo

Outras considerações

Nos últimos anos grandes investimentos têm sido feitos para obtenção de novas alternativas para tratamento do câncer, entre as quais se encontra a magnetohipertermia. Os testes pré-clínicos para realização deste procedimento demandam (1) animais portando tumor sólido, (2) amostra de FM biocompatível que seja responsiva a um campo magnético e (3) equipamento gerador de campo AC. Os experimentos realizados neste trabalho tinham o objetivo principal de tratar tumor sólido de Ehrlich por magnetohipertermia. Os três itens citados acima foram usados após administração intratumoral de FM-PAS e mostram perspectivas favoráveis ao tratamento do tumor por esse procedimento. Na tentativa de atrair ao tumor nanopartículas administradas por via endovenosa foi construído um equipamento gerador de campo DC que, entretanto, não foi eficaz nesta atividade, pois não foi

constatada a presença das nanopartículas no tumor. Este fato pode ter acontecido pela falta de condições ideais do equipamento II que impediram essa atração. Por outro lado, pode também ter ocorrido em decorrência de que as nanopartículas da amostra FM-PAS deixam rapidamente a corrente sanguínea, como determinado por ressonância magnética e assim não passam pelo local do tumor para que ali fossem retidas. Outros experimentos devem ser feitos no sentido de viabilizar a magnetohipertermia após administração endovenosa da amostra magnética.

6 – CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho que teve como objetivo investigar o tratamento de tumor sólido de Ehrlich por magnetohipertermia promovida pela amostra **FM-PAS** e CMA permitem concluir que, nas condições experimentais utilizadas:

- (6) As nanopartículas magnéticas da amostra **FM-PAS-1** possuem diâmetro médio de 7,9nm e são monodispersas, parâmetros importantes para aplicações biomédicas;
- (7) A amostra **FM-PAS-1** (fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas por ácido poliaspártico) induziu, tanto após administração endovenosa, como intraperitoneal, apenas alterações ligeiras e temporárias na citometria das células sanguíneas ou peritoneais ou na genotoxicidade das células da medula óssea, além de não ter provocado alterações histopatológicas nos vários órgãos estudados, características que permitem classificá-la como amostra biocompatível;
- (8) As nanopartículas da amostra **FM-PAS-1** apresentam ampla biodistribuição pelos órgãos estudados, o que provavelmente está relacionado com sua cobertura de ácido poliaspártico;
- (9) A exposição ao CMA gerado pelo **Equip.I** de animais tratados, via intraperitoneal, com a amostra **FM-PAS-1**, protegeu as células sanguíneas de alterações citométricas, e não ocasionou quaisquer alterações citométricas nas células peritoneais, sugerindo papel do campo na atração das partículas e conseqüentemente menor disponibilidade das mesmas;
- (10) O Tumor Sólido de Ehrlich (TSE) implantado no Laboratório de Genética apresenta alta capacidade proliferativa, comportamento agressivo, razões que podem justificar a não remissão do tumor nos experimentos de magnetohipertermia realizados;

- (11) Os tratamentos do TSE com **FM-PAS-2** e com **FM-PAS-2** associado à exposição tripla ao CMA induziram diminuição do volume tumoral e interferiram na atividade proliferativa do tumor, como mostrado pela diminuição dos pontos NOR;
- (12)As nanopartículas magnéticas administradas por via endovenosa não foram atraídas para o tumor sólido pelo eletroímã (**Equip.II**) gerador de campo magnético de frequência contínua (DC), mostrando que o mesmo não tem as especificações necessárias para a ação ou que as nanopartículas ficaram muito pouco tempo na circulação sanguínea não viabilizando a atração magnética.
- (13)O conjunto de experimentos realizados demonstra que a amostra **FM-PAS** é biocompatível e tem alto potencial para ser empregada em testes de magnetohipertermia, desde que seja injetada intratumoralmente.

7 - PERSPECTIVAS FUTURAS

Um outro aparelho com o mesmo fim, mas usando estratégia diferente (**Equip III**) (**Fig. 54**), foi desenvolvido com a colaboração de Leandro Figueiredo (IF, UnB), com corrente, potência e frequência reguláveis. O equipamento possui fonte CMC (campo magnético continua), corrente de 0-2 A, voltagem de 0-20 Volts, gerador de sinal: frequência de 0-700 kHz, amplificador de sinal de 220 Watts e conjunto de bobinas de Helmholtz, gerando campo magnético AC de 0-150 Oe. O gerador emite um sinal na frequência pré-definida. Este sinal ganha potência no amplificador e depois é enviado ao conjunto de bobinas, produzindo o campo magnético oscilante (alternado) na frequência escolhida. O Equip III está sendo testado e ajustado para análises biológicas.

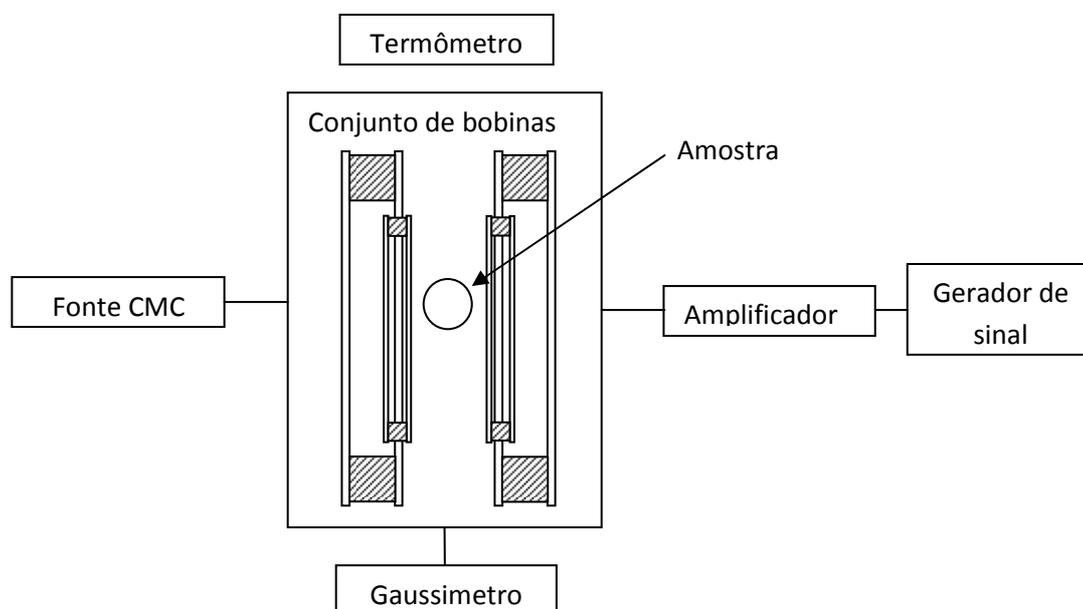


Figura 54: Equip III, bipolar, gerador de campo magnético alternado com corrente, potência e frequência reguláveis.

Estas características, corrente, potência e frequência reguláveis, possibilitam ajustar o aparelho nas condições diferentes para amostras diferentes com tempo de magnetização ou susceptibilidade magnética diferentes que, por sua vez, dependem do tipo de cobertura e composição química das nanopartículas magnéticas, entre outros. A bipolaridade induz um campo magnético homogêneo com uma área de atuação de 1-1,5 mm³ e melhor penetração na massa tumoral, evitando a aglomeração das nanopartículas no local da ponteira, como mostraram os resultados obtidos pelo uso do equipamento I.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSARI, A.; WILLIAMS, JF. **The eosinophilic response of the rat to infection with taenia taeniaeformis.** J Parasitol., v. 62, p. 728-36, 1976.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Medicamentos: pesquisa clínica.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>>. Acesso em: 15 out. 2008.

ARVING, C.; SJODÉN, P.; BERGH, J.; LINDSTROM, A. T.; WASTESON, E.; GLIMELIUS, B.; BRANDBERG, Y. **Satisfaction, utilisation and perceived benefit of individual psychosocial support for breast cancer patients—A randomized study of nurse versus psychologist interventions.** Patient Education and Counseling. v. 62 p. 235–243, 2006.

AVILÉS, M., O.; EBNER, A. D.; RITTER, J. A. **In vitro study of magnetic particle seeding for implant assisted-magnetic drug targeting.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials v. 320, p. 2640–2646, 2008.

BABINCOVA, M., SOURIVONG, P., LESZCZYNSKA, D., BABINEC, P. **Blood-specific whole-body electromagnetic hyperthermia.** Med. Hypoth., v. 55, p. 459-460, 2000.

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. Häfeli and M. Zborowsky, eds.) Plenum Publishing Corp., New York, p 597-606, 1997.

BAHADUR, D., GIRI, J. **Biomaterials and magnetism.** Sādhanã, v. 28, p. 639-656, 2003.

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.; LACAVA, Z. G. M. **Effects of magnetic field and magnetoliposomes on mice: citotoxicity and genotoxicity tests.** IEEE Transactions on Magnetics, v. 42 (10), p. 1-3, 2006.

BARBOSA, L.S. **Avaliação *in vivo* da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico.** 2004. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

BARBOSA, L.S. **Estudos dos Processos de Magnetohipertermia e Terapia Fotodinâmica Mediados Por Magnetolipossomas Fotossensibilizados em Camundongos.** 2008. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

- BAYREUTHER, K., **Der chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus.** *Z. Naturforsch.*, v.7, p. 554- 557, 1952. Apud NIELSÉN.
- BERRY, C.C.; CURTIS, A.S.G. **Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine.** *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 36, p. R198-R206, June 2003.
- BRUGIN, A. **Avaliação da biocompatibilidade / toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss.** 2007. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- BLUMS E, MEZULIS A, MAIOROV M, KRONKALNS G. **Thermal diffusion of magnetic nanoparticles in ferrocolloids: Experiments on particle separation in vertical columns.** *J. Magn. Magn. Mater.*, v. 169, p. 220-228, 1997.
- BONASSI, S.; CEPPI, M.; FONTANA, V.; MERLO, F. **Multiple regression analysis of cytogenetic human data.** *Mut. Res.*, v. 313, p. 69 – 80, 1994.
- BONIN-DEBS, AL.; BOCHE, I.; GILLE, H.; BRINKMANN, U. **Development of secreted proteins as biotherapeutic agents.** *Expert Opin Biol Ther.*, v.4, p. 551-8, 2004.
- BORIS, M., V. G. **Magnetic Fluids and Application Handbook.** Series of Learning Materials, 1996.
- BRIGHTMAN, M. W. **The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments : II.** Parenchymal distribution. *Am. J. Anat.*, v. 117, p. 193-220, 1965.
- BRIZEL, DODGE, D.M.; R.K.; CLOUGH, R.W.; DEWHIRST, M.W.; **Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome,** *Radiother. ncol.* v.53 (2), p. 113–117, 1999.
- BUSKE, N.; SONNTAG, H.; GÖTZ, T., **Magnetic fluids- their preparation, stabilization and applications in colloidal science.** *Colloids and surface.* v. 12, p. 195-202, 1984.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**, 3 ed. São Paulo, Artmed, 2006.
- CHAVES, S.B.; LACAVALA, L.M.; LACAVALA, 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.*, v. 38, p. 3231–3233, 2002.

- CLETON, F. J. **Chemotherapy general aspect.** In: PEKHHAN, M.; PINEDO, H. M.; VERONESI, U. *Oxford Textbook of Oncology.*, v.3, p. 445- 468, 1995.
- CLINE, M. J., HASKELL, C. M. **Introduction to Chemotherapy.** In: *Cancer Chemotherapy.* (Cline & Haskell, eds.) 3rd ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, p 1-12, 1980.
- 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 Medicina, Universidade de Brasília.
- COHEN-JONATHAN, E., BERNHARD, E. J., MCKENNA, W. G. **How does radiation kill cells?** *Cur. Opin. Chem. Biol.*, v. 3, p. 77-83, 1999.
- COOPER, L.; FOSTER, I. **The use of music to aid patients' relaxation in a radiotherapy waiting room.** *Radiography.* v.14, p.184-188, 2008.
- CRUZ, A. D.; MCARTHUR, A. G.; SILVA, C. C.; CURADO, M. P.; GLICKMAN, B. W. **Humam micronucleus counts are correlated with age, smoking and cesium – 137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident.** *Mut. Res.* v. 313, p. 57–68, 1994.
- DASILVA, L.; ALBANO, F.; LOPESDOS SANTOS, L. R.; TAVARES; FELZENZWALLO; A. D. **The effect of electromagnetic field exposure on the formation of DNA lesions.** *Redox Report: Communications in Free Radical Research.* v. 5 (5), p. 299–301, 2000.
- 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.Häfeli and M.Zborowsky, eds.) Plenum Press. New York, p. 171-176, 1997a.
- DA SILVA, M.F.; SHÜTT,W.; TELLER,J.; HAFELI,U.; ZBOROWSKY, M. **Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: An Overview.** Eds. Plenum Publishing Corp 597, Ed. Häfeli et al. Plenum Press, New York, p 597, 1997b.
- DERENZINI, M. **The AgNORs.** *Micron*, v.31, p.117–120, 2000.
- DERENZINI, M., SIRRI, V., TRERE', D. **Nucleolar organizer regions intumor cells.** *Cancer J.* v. 7, p. 71–77, 1994.

DUNIN-BORKOWSKI, R. E.; MCCARTNEY, M R.; PÓSFAL, M.; FRANKEL, R.B.; BAZYLINSKI, D. A.; BUSECK, P. R. **Off-axis electron holography of magnetotactic bacteria: magnetic microstructure of strains MV-1 and MS-1.** Eur. J. Mineral. v. 13, p. 671.

EAGLE, D. F.; MALLINSON, J. C. **On the coercivity of γ -Fe₂O₃ particles.** J. Appl. Phys, v. 38, p. 995-997, 1967.

FAYCHTING, M. **Health effects of static magnetic fields—a review of the epidemiological evidence.** Progress in Biophysics and Molecular Biology V. 87, P. 241–246, 2005.

EHRlich, P. and APOLANT H., **Beobachtungen über maligne Mäusetumoren,** Berl. Klin. Wochenschr, v. 28: p. 871-847, 1905. Apud NIELSEN.

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

ESTEVANATO, L. L. C. **Investigação da biocompatibilidade de polímeros de albumina magnéticos em camundongos.** Brasília, 2008. 102f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

FANN, J. R.; THOMAS-RICH, A. M.; KATON, W. J. ; COWLEY, D.; PEPPING, M.; MCGREGOR, B. A.; GRALOW, J. **Major depression after breast cancer: a review of epidemiology and treatment.** General Hospital Psychiatry. v.30, p. 112–126, 2008.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's **Veterinary Hematology.** Ed Lippincott Williams & Williams. Philadelphia. 5^a Edition, 1999.

FIELD, S.B., **Hyperthermia in the treatment of cancer,** Phys. Med. Biol. v. 32 (7), p. 789–811, 1987.

FILIPPIN, C.; CHISTOFOLETTI, L. D.; RIBEIRO, M.C.M.; VITURI, .C.L. **Determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) em lesões do epitélio cervical uterino.** RBAC, v. 38, n. 3, p. 133-139, 2006.

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: 396–398, 2002.

GARCIA, M. P. **Estudo in vivo dos efeitos sub-crônicos e crônicos de nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com DMSA**, 2005. Tese de Doutorado em Ciências da Saúde Universidade de Brasília, Brasil, 2005.

GARCIA, M. P. ; CHAVES, S. B. ; PARCA, R. M. ; BARCELLOS, N. M. ; LACAVAL, Z. G. M. ; THORSTEINSDOTTIE, S. ; SILVA, O. ; PELEGRINI, F. ; MORAIS, P. C. ; AZEVEDO, R. B. . **Effects of MF DMSA in mice lung, Magnetic resonance and light microscopy investigation. In: 10 th International Conference on Magnetic Fluids**, 10 th International Conference on Magnetic Fluids-Abstracts, v. 1. p. 69, 2004.

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

GARCIA, V. A. P. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos**. 2002. Tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2002b.

GEPPETTI, P. **Neuropeptides and kinins in airway allergy**. Res. Immunol. v. 149, p. 215-218, 1998.

GENEVECKOW, U; et al. **Description and characterization of the novel hyperthermia- and thermoablation system**. Med Phys., v. 31, p. 1444-1451.

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.

GOBBA F, et al, **Extremely Low Frequency-Magnetic Fields (ELF-EMF) occupational exposure and natural killer activity in peripheral blood lymphocytes**, Sci Total Environ (2008), doi:10.1016/j.scitotenv.2008.08.012.

GOGVADZE V, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, **Mitochondria as targets for cancer chemotherapy**, Seminars in Cancer Biology. doi:10.1016/j.semancer.2008.11.007 (2008).

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

GRIGSBY, P. W.; RUSSELL, A. R.; BRUNER, D.; EIFEL, P.; KOH, W.; SPANOS, W.; STETZ, J.; ATITT, J. A.; SULLIVAN, J. **Late injury of cancer therapy on the female reproductive tract.** *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, v. 31, No. 5, p. 1281-1299, 1995.

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.

HALL, E.J.; ROIZIN-TOWLE, L., **Biological effects of heat,** *Cancer Res.* v. 44 p. 4708s-4713s, 1984.

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.

HARTL, D. L.; JONES, E. W. **ESSENTIAL GENETICS A GENOMICS PERSPECTIVE.** 3. ed., Canada, Jones and Bartlett, 2002

HAWKINS, L. K.; LEMONIE, N. R.; KIM, D. **Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform.** *THE LANCET Oncology.* v. 3 January 2002.

HIERGEIST, R.; ANDRAK, W.; BUSKE, N.; HERGT, R.; HILGER, I.; RICHTER, KAISER, U.W. **Application of magnetite ferrofluids for hyperthermia.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* v. 201: p. 420-422, 1999.

HEREDIA-ROJAS, J.A., RODRIGUEZ DE LA FUENTE, A.O., VELAZCO CAMPOS, M.R., LEAL-GARZA, C.H., RODRIGUEZ-FLORES, L.E., DE LA FUENTE-CORTEZ, B. **Cytological effects of 60 Hz magnetic fields on human lymphocytes in vitro: sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic rate.** *Bioelectromagnetics.*v. 22, p. 145–149, 2001.

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.

HILGER, I; FR.UHAUFA, S.; WERNER LIN, B.; HIERGEISTC, R.; WILFRIED, A., HERGT, R.; WERNER A. K. **Cytotoxicity of selected magnetic fluids on human adenocarcinoma cells.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* v. 261, p. 7-12, 2003.

HILGER, I; HERGT, R.; WERNER A. K. **Towards breast cancer treatment by magnetic heating.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials. v. 293, p. 314-319, 2005.

HOLMSTROM, M. **Sex differences in the micronucleus test: true or false.** Mutagenesis, v. 3; p.177-118, 1988.

HSIEH, C.-H.; LEE, M. C.; TSAI-WU, J. J.; CHEN, M. H.; LEE, H. S. CHIANG, H.; WU, C. H. H.; JIANG, C. C. **Deleterious effects of MRI on chondrocytes.** Osteoarthritis and Cartilage. v. 16, p. 343-351, 2008.

HUNG, C.W.; HOLOMANA, T.R.P.; KOFINAS, P.; BENTLEY, W.E.; Towards oriented assembly of proteins onto magnetic nanoparticles, Biochem. Eng. J. v. 38 p. 164-170, 2008.

IARC-International Agency For Research On Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Non-ionizing radiation, part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields,** vol. 80. Lyon:IARC; 2002.

ICNIRP-International Commission on Non Ionizing Radiation Protection. **Standing committee on epidemiology: review of the epidemiologic literature on EMF and health.** Environ Health. Perspect;109:911-33, 2001.

ITC, **Instituto Tratamento do Câncer.**

Disponível em: http://www.itcancer.com.br/index_arquivos/page0018.htm

Acesso em: 15 out. 2008, 12:00.

JIM, J.; LI, Y.; WANG, J.; WANG, W.; LIU, Y.; WANG, K.; FANG, H.; AHOU, Z.; ZHOU, A.; YU, Z. **Phase I study of oxaliplatin in combination with capecitabine and radiotherapy as postoperative treatment for stage ii and iii rectal cancer.** Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., v. 72, No. 3, p. 671-677, 2008.

KHANDAKER, MH.; KADHIM, SA.; ICHIM, TE.; HOWSON-JAN, K.; CHIN, J.; SINGHAL, SK. **Prevention of bladder tumor formation in mice by a novel bone marrow-derived factor retimed.** Anticancer Res., v. 20, p. 183-189, 2000.

KITTEL, C.- **Introdução à Física do Estado Sólido,** Quinta edição, 1978, Ed. Guanabara Dois.

KONTZOGLOU G, TRIARIDIS S, NOUSSIOS G, VALERI R, NANAS CH. Subglottic hemangioma treated with interferon alpha 2A. **Acta Otorhinolaryngol Belg.** 56:83-5, 2002.

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.

KÖHNE, C.-H.; HARSTRICK A.; HIDDEMANQ,W.; SCHGFFSKI, P.; WILKE, H.; BOKEMEYER,C.; DÖRKEN, B.; SCHMOLL, H-J. **Modulation of 5Fluorouracil with Methotrexate and Low-dose N-(phosphonacetyl)-L-aspartate in Patients with Advanced Colorectal Cancer.** Results of a Phase II Study. *European Journal of Catlcer*, v. 33, No. 11, p. 189-11399, 1997.

KUCKELHAUS, S. A. S. GARCIA, V. A. P.; LACAVA, L. M.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M.; SILVA, O.; LIMA,; E. C. D.; FIGUEIREDO, F.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C. **Biological investigation of a citrate-coated cobalt-ferrite-based magnetic fluid.** *J.Appl. Phys.*, 93, 6707 – 6708, 2003 a.

KÜCKELHAUS, S. **Avaliação biológica de materiais magnéticos à base de ferrita de cobalto desenvolvidos para tratamento alternativo do câncer.** Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília, 2003 b.

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, L. M.; AZEVEDO, R. ; LACAVA, Z.; BUSKE, N.; TRONCONI, A.; MORAIS, P. C. **Nanoparticle sizing: A comprative study using atomic force microscopy, transmission electron microscopy, and ferromagnetic resonance.** *J. Magn. Magn. Mater.*, 225, 79-83, 2001.

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, 2004a.

LACAVA, L. M.; **Estudos de Biodistribuição e toxicidade de fluido magnético à base de partículas de magnetita recobertas por Dextran em camundongos.** Brasília, 2004b. 105f. Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

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.

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

LACAVAL, 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.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. **The role of the macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and antimacrophage serum.** Am J Pathol.; 78:71–100, 1975.

LIBOFF, A.R., WILLIAMS, T., STRONG, D.M., WISTAR, R., 1984. **Time-varying magnetic fields: effect on DNA synthesis.** Science. v. 223, p. 818–820.

LING, C.; YI, W.; XINRONG, L.; SHUPING, D.; GUOZHENG, L.; HNATOWICH, D., J.; RUSCKOWSKI, M. **A new TAG-72 cancer marker peptide identified by phage display.** Cancer Letters. v.272, p.122–132, 2008.

LIN, J. H., LU, A. Y. H. **Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development.** Pharmacol. Rev., v. 49, p. 403-449, 1997.

LOWENTHAL, H. and JAHN, G., **Übertragungsversuche mit carcinomaöser Mäuse-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen.** Z. Krebsforsch. v. 7, p. 439-447, 1932. Apud NIELSEN.

LYLE, D.B., WANG, X., AYOTTE, R., CHOPART, A., ADEY, W.R. **Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields.** Bioelectromagnetics.v.12, p 145–156, 1991.

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.

MAHJOOB, S.; VAFAI, K.; **Analytical characterization of heat transport through biological media incorporating hyperthermia treatment.** Int. J. Heat Mass Transfer., doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer, 2008.07.038, 2008 a. (in press)

MAHJOOB, S.; VAFAI, K., **A synthesis of fluid and thermal transport models for metal foam heat exchangers,** International Journal of Heat and Mass Transfer. v.51, p. 3701–3711, 2008 b.

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.

MARRON, M.T., GOODMAN, E.M., SHARPE, P.T., GREENEBAUM, B., **Low frequency electric and magnetic fields have different effects on the cell surface.** FEBS Letters. v. 230, p. 13–16. 1988.apud, Rodriguez-De la Fuente 2008

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S.C.S. et al. **Effect of *Pfaffia paniculata* (Brasilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form.** *Life Sci.*, v.74, p.573-579, 2003.

McKINNE apud. YOUNG, A.; ROWETT, L. **Cancer biotherapy: an introductory guide.** David Kerr (Eds), Oxford University Press, 2006.

MEIBOHM, B., DERENDORF, H. **Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies in drug product development.** *J. Pharm. Sci.*, v. 91, p. 18-31, 2002.

MITROVIC, A. D.;MADDISON, J. E.; JOHNSTON G. A. R. **Influence of the oestrous cycle on L-glutamate and L-aspartate transport in rat brain synaptosomes.** *Neurochemistry International.* v. 34, p. 101-108, 1999.

MÖNCH, I.; MEYE, A.; LEONHARDT, A.; KRÄMER, K.; KOZHUHAROVA, R. GEMMING, T.; WIRTH, M. P.; BUCHNER, B. **Ferromagnetic filled carbon nanotubes and nanoparticles: synthesis and lipid-mediated delivery into human tumor cells.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* v.290, p. 276–278, 2005.

MOORE, E. C.; FRIEDMAN, JACQUELINE; VALDIVIESO, MANUEL; PLUNKETT, WILLIAM; MARTI, JOSE R.; RUSS, JOSEPH; LOO, TI LI. **Aspartate carbamoyltransferase activity, drug concentrations, and pyrimidine nucleotides in tissue from patients treated with N-(phosphonacetyl)-L-aspartate.** *Biochemical Pharmacology*, v. 31, Issue 20, p. 3317-3321, 1982,

MORAIS, P. C; SANTOS, R.L.; PIMENTA, A. C. M.; AZEVEDO, R.B; LIMA, E.C.D. **Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles.** *Thin Solid Films* v. 515, P. 266–270, 2006.

MORAIS, P. C.; SKEFF NETO, K.; GRAVINA, P. P.; FIGUEIREDO, L.C.; DA SILVA, M. F.; LACAVAL, Z. G. M.; AZEVEDO, R.B.; SILVA, L. P.; DE CUYPER, M. **Birefringence and transmittion electron microscopy of monolyer and bilyer magnetoliposomes.** *J. Mag. Magm.Mat.* v. 252: p. 418-420, 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.

NAKASONO, S.; IKEHATA, M.; DATEKI, M.; YOSHIE, S.; SHIGEMITSU, T.; NEGISHI, T. **Intermediate frequency magnetic fields do not have mutagenic, co-**

mutagenic or gene conversion potentials in microbial genotoxicity tests. *Mutation research*, v. 649, p. 167-200, 2008.

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.

NELSON, D. L., COX, M. M., "**Lehninger Principles of Biochemistry**", 4ª edição, W. H. Freeman, 2005,

NIELSÉN, K., **A hexaploid Ehrlich-Lettré mouse tumor line with low sensitivity to colchicine.** *Hereditas*, v. 83 p. 105-122, 1976. (O artigo foi disponibilizado por profa Helena).

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

NOORDHUIS, P.; KAZEMIERI, K. M., GERT-JAN L.; KASPERST; GODEFRIDUS J. P. **Modulation of metabolism and cytotoxicity of cytosine arabinoside with n-(phosphon)-acetyl-l-aspartate in human leukemic blast cells and cell lines.** *Leukemia Research*. v. 20, No. 2, p. 127-134, 1996.

NRPB-National Radiological Protection Board. Documents of the NRPB. **ELF electromagnetic fields and the risk of cancer: report of an advisory group on non-ionizing radiation.** NRPB, vol. 12. Didcot, Oxon, UK: Chilton; 2001. Available at the Internet site:
<http://www.nrpb.org/>.

NYGREN P, LARSSON R. **Overview of the clinical efficacy of investigational anticancer drugs.** *J Intern Med.*, v. 253, p. 46-75, 2003.

O'CALLAGHAN, C.; MCDERMOTT, F. **Discourse analysis reframes oncologic music.** *The Arts in Psychotherapy*. v.34, p. 398–408, 2007.

ODENBACH, S. **Ferrofluids - magnetically controlled suspensions.** *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.217, p.171-178, 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.

OVERGARD, M.; ANGELSEN, A.; LYDERSEN, S.; MORKVED, S. **Does Physiotherapist-Guided Pelvic Floor Muscle Training Reduce Urinary Incontinence After Radical Prostatectomy? A Randomised Controlled Trial.** *European urology*. v.54 p. 438–448, 2008.

- PAGE, D.L. **Prognostic and breast-cancer recognition of lethal and favorable prognostic types.** *Am. J. Surg. Pathol.*, v. 15 p. 334-349, 1991.
- PEACE, B.E. & SUCCOP. **Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values?** *Mut. Res.*, v. 425, p. 225-230, 1999.
- 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 Medicina, Universidade de Brasília.
- PENNES,H.H.; **Analysis of tissue and arterial blood temperature in the resting human forearm**, *J. Appl. Physiol.* v.1 p. 93–122, 1948.
- PERLS, M. **Nachweis Von Eisonoxyde in Pigmenten.** *Virchow. Arch. Path. Ant.*, v.32, n. 2, p.24–28, 1867.
- PLOTON, D.; MANEGER, M.; ADNET, J. **Simultaneous high resolution localization of Ag-NOR proteins and nucleoproteins in interphase and mitotic nuclei.** *Histochem J.*, 16: 897-906, 1986.
- 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.
- PETROIANU, A., PIMENTA, L. G. **Cirurgia Oncológica.** In: *Cirurgia Geriátrica.* (Alves, J., eds.) Medsi Editora Médica e Científica LTDA, São Paulo, p 739-748, 1998.
- RABELLO-GAY, M. N. **Teste de micronúcleo em medulla óssea.** *In:* Rabello-Gay, M.N.; Rodrigues, M. A.; Montleone-Neto, R. *Mutagenese, teratogenese e carcinogenese: métodos e critérios de avaliação.* Soc. Bras. Gen. Ed. São Paulo. P 83 – 90, 1991.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia.** 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p.789-809, 2004.
- RASHIDIAN, M; FATTAHI, A. **Comparison of thermochemistry of aspartame (artificial sweetener) and glucose.** *Carbohydrate Research.* v. 344, p. 127–133, 2009.
- RAVICHANDRAN, S.; AHMED, H. U.; MATANHELLA, S. S.; DOBSON, M. **Is There a Role for Magnetic Resonance.** *Urology*, v. 72(4), 2008.
- 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.

RIZZIERI, DA.; JOHNSON, JL.; NIEDZWIECKI, D.; LEE, EJ.; VARDIMAN, JW.; POWELL, BL.; BARCOS, M.; BLOOMFIELD, CD.; SCHIFFER, CA.; PETERSON, BA.; CANELLOS, GP.; LARSON, RA. **Intensive chemotherapy with and without cranial radiation for Burkitt leukemia and lymphoma: final results of Cancer and Leukemia Group B Study 9251.** *Cancer.*; v. 100, p. 1438-48, 2004.

ROBINSON, P. J.; ROITT, I. M. **Identification of a population of mouse leukocytes using wheat germ agglutinin.** *Nature*, 250, 517, 1974, doi:10.1038/250517a0.

RODRI'GUEZ-DE LA FUENTE, A. O.; HEREDIA-ROJAS, J. A.; MATA-CA'RDENAS, B. D.; VARGAS-VILLARREAL, J.; RODRI'GUEZ-FLORES, L E.; BALDERAS-CANDANOSA, I.; ALCOCER-GONZA'LEZV, J. M. **Entamoeba invadens: Influence of 60 Hz magnetic fields on growth and differentiation.** *Experimental Parasitology*. v. 119, p. 202–206, 2008.

RODRIGUES, O. R; ANTONANGELO, L.; YAGI, N.; MINAMOTO, H.; SCHMITS Jr, A. F.; CAPELOZZI, V. L.; GOLDENBERG, S.; SALDIVA, P. H. N. **Prognostic Significance of Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) in Resected Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC).** *Jpn J Clin Oncol*; v. 27(5), p. 298–304,1997.

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

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R. G. **Ascite neoplásica. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich.** *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 18, n. 6, p. 519-526, 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 Medicina, Universidade de Brasília.

SADEGHIANI, N.; BARBOSA, L. S.; GUEDES, M. H. A.; CHAVES, S. B.; SANTOS, J. G.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. **Magnetic Resonance of Polyaspartic Acid-Coated Magnetite Nanoparticles Administered in Mice** *IEEE Transactions on magnetics*, v. 41, no. 10, p. 4108-4111, 2005.

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.

SCARFI, M.R., LICCI, M.B., ZENI, O., DELLA NOCE, M., FRANCESCHI, C., BERSANI, F. **Micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes exposed to 50 Hz sinusoidal magnetic fields.** *Health Physics.* v. 76, p. 244–250, 1999.

SALDANHA, C. A., **Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e genotoxicidade dos polímeros de albumina magnéticos,** 2007, Brasília, Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal – Faculdade de Biologia Animal, Universidade de Brasília.

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.

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

SCHLAG, P. M. **Resection and local therapy for liver metastases.** *Best practice and Research clinical Gastroenterology.* v.16, n. 2, p. 299-317, 2002.

SHAW, B. L.; BATTLE, H. I. **The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin).** *Can. J. Zool.* v.35, p. 325-347, 1957.

SHINKAI, M.; UEDA, K.; OHTSU, S.; HONDA, H.; KOHRI, K.; Kobayashi, T. **Effect of Functional Magnetic Particles on Radiofrequency Capacitive Heating: An *in vivo* Study** *Cancer Science.* v. 93 (1), p. 103–108, 2002.

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*, v. 90, p. 699-704, 1999.

STEWART, H.L. (Ed.). **Transplantable and transmissible tumors of animals.** Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1959. 378p.

TAKAHASHI, I.; EMI, Y.; HASUDA, S.; KAKEJI, Y.; MAEHARA, Y.; SUGIMACHI, K. **Clinical application of hyperthermia combined with anticancer drugs for the treatment of solid tumors.** *Surgery.* v. 131, n.1, p. S78-S84.

TEWARI, M.; KRISHNAMURTHY, A.; SHUKLA, H. S; **Predictive markers of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.** *Surgical Oncology.* v.17, p.301-311, 2008.

THOMPSON S, R.; DELANEY, G.; GABRIEL S. G.; JACOB, S.; DAS, P.; BARTON, M. **Estimation of optimal brachytherapy utilization rate in the treatment of malignancies of the uterine corpus by a review of clinical practice guidelines and the primary evidence.** *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, v. 72, No. 3, p. 849–858, 2008.

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

TORRICELLI, P.; BARBERINI, A; CINQUANTINI; SIGHINOLFI, F. M.; CESINARO, A. M., **3-T MRI with Phased-array Coil in Local Staging of Prostatic Cancer**, *Academic Radiology*, v. 15(9), 2008.

VERNON, C.C.; HAND, J.W.; FIELD,S.B.; MACHIN,D.; WHALEY,J.B.; ZEE,J.; PUTTEN,W.L.J.; RHOON,G.C.; DIJK,J.D.P.; GONZALEZ,D.G.; LIU, F.F.; GOODMAN,P.; SHERAR,M.; **Radiotherapy with or without hyperthermia in the treatment of superficial localized breast cancer: results from five randomized controlled trials**, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* v. 35(4) p. 731–744, 1996.

VULPEN, M. VAN; LEEUW, A.A.C. DE; RAAYMAKERS, B.W.; MOORSELAAR VAN,R.J.A.; HOFMAN, P.; LAGENDIJK, J.J.W.; BATTERMANN, J.J.; **Radiotherapy and hyperthermia in the treatment of patients with locally advanced prostate cancer: preliminary results**, *BJU Int.* v.93 (1) p. 36–41, 2004.

WALKER, E. M.; RODRIGUEZ, A. I; KOHN, B.; PEGG, J.; BELL, R. M.; LEVINE, R. A., **Acupuncture for the Treatment of Vasomotor Symptoms in Breast Cancer Patients Receiving Hormone Suppression Treatment**. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, v 72, p. S103, 2008.

WEINBERG, R. A., **A biologia do câncer**, 1 ed. São Paulo, artmed, 2007.

WERTHEIMER N, LEEPER E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol* v.109:273–84.1979. Apud Gobba 2008.;

WHIPPLE, A. O. **History of surgery**. In: Christopher's Textbook of Surgery. (Davis, L., eds.). 7th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia and London, pp 1-21, 1960.

WHO. **Extremely low frequency fields. Environmental health criteria**, N° 238. Geneva: World Health Organization; 2007.

Available at the Internet site: <http://www.who.int/peh-emf/publications/>.

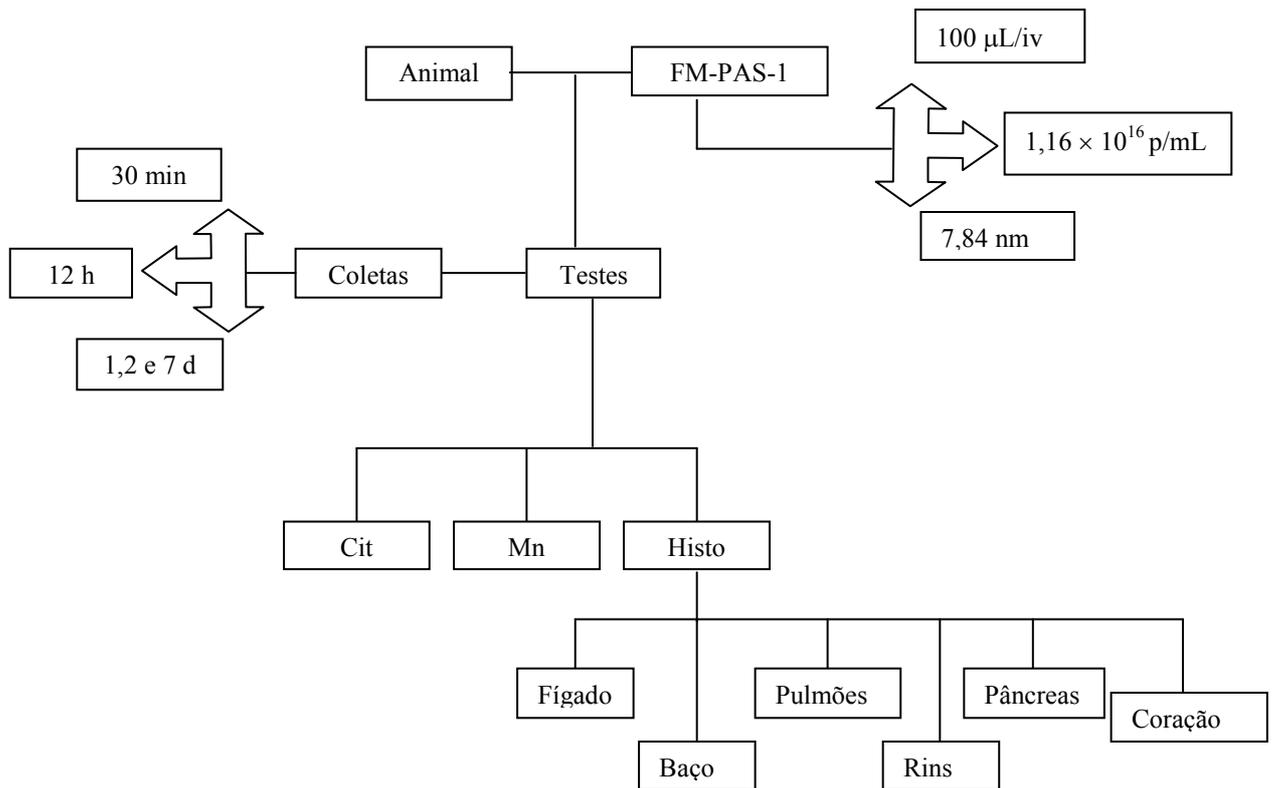
WUST, P.; HILDEBRANDT, SREENIVASA, B.; RAU, G., GELLERMANN, B.; J.; RIESS, H.; FELIX, R.;SCHLAG, P.M. **Hyperthermia in combined treatment of cancer**. *Lancet Oncol.* v. 3(8), p.487–497, 2002.

ZEE, J.; GONZALEZ,D.; RHOON, G.; DIJK,J.; PUTTEN,W.; HART,A.; **Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial**, *Lancet.* v.355(9210) p. 1119–1125, 2000.

ZHANG, L.; HONG-CHEN G.; WANG, X. **Magnetite ferrofluid with high specific absorption rate for application in hyperthermia**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* v. 311, p. 228–233, 2007.

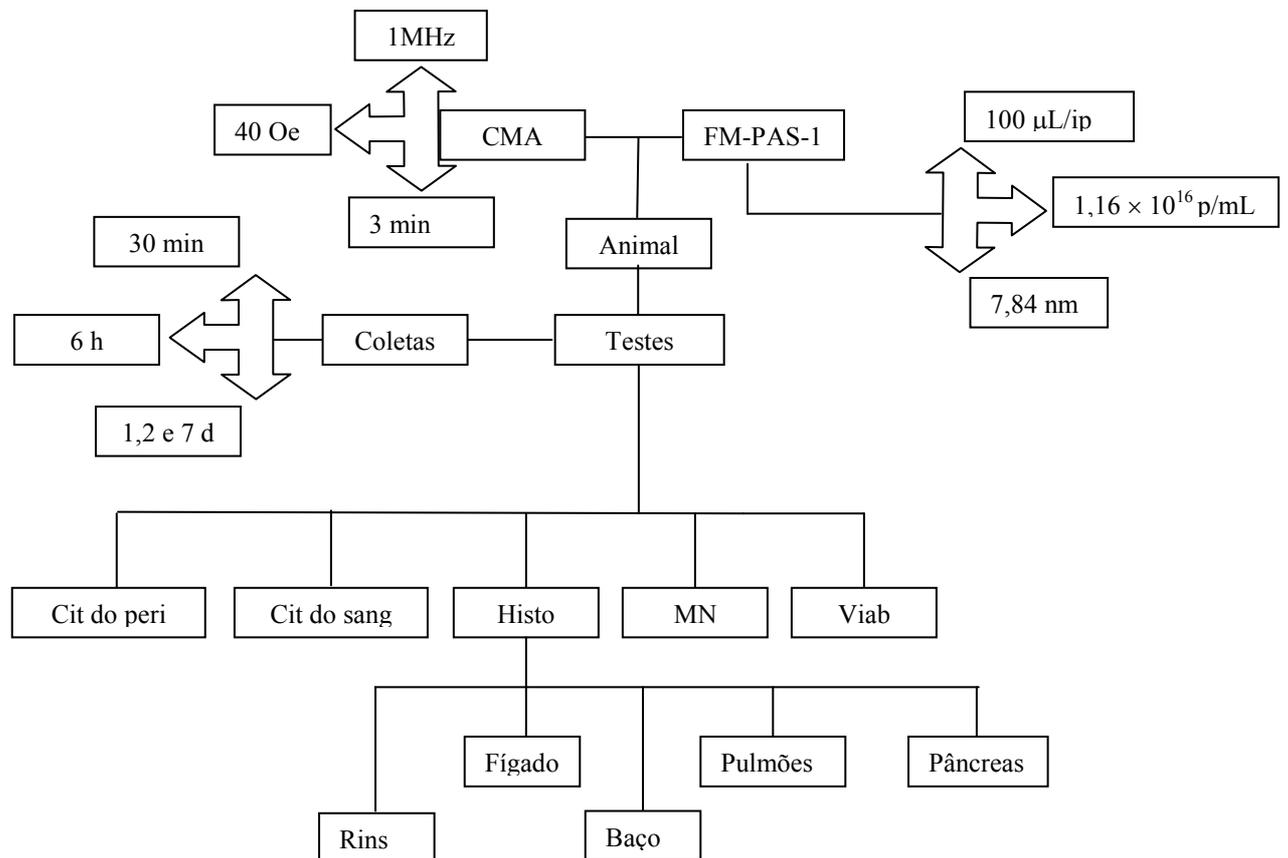
ZHENG, S. P.; ZHENG, S. J.; WU, R. L.; HUANG, F. Y.; CAO, L. M.; JIAO, C. L.
**Enhanced efficacy in anti-tumour activity by combined therapy of recombinant
FGFR-1 related angiogenesis and low-dose cytotoxic agent.** European journal of
cancer. v.43, p. 2134-2139, 2007.

Anexo 01

Etapa 1**Esquema 1** – Representa os procedimentos empregados na etapa 1.

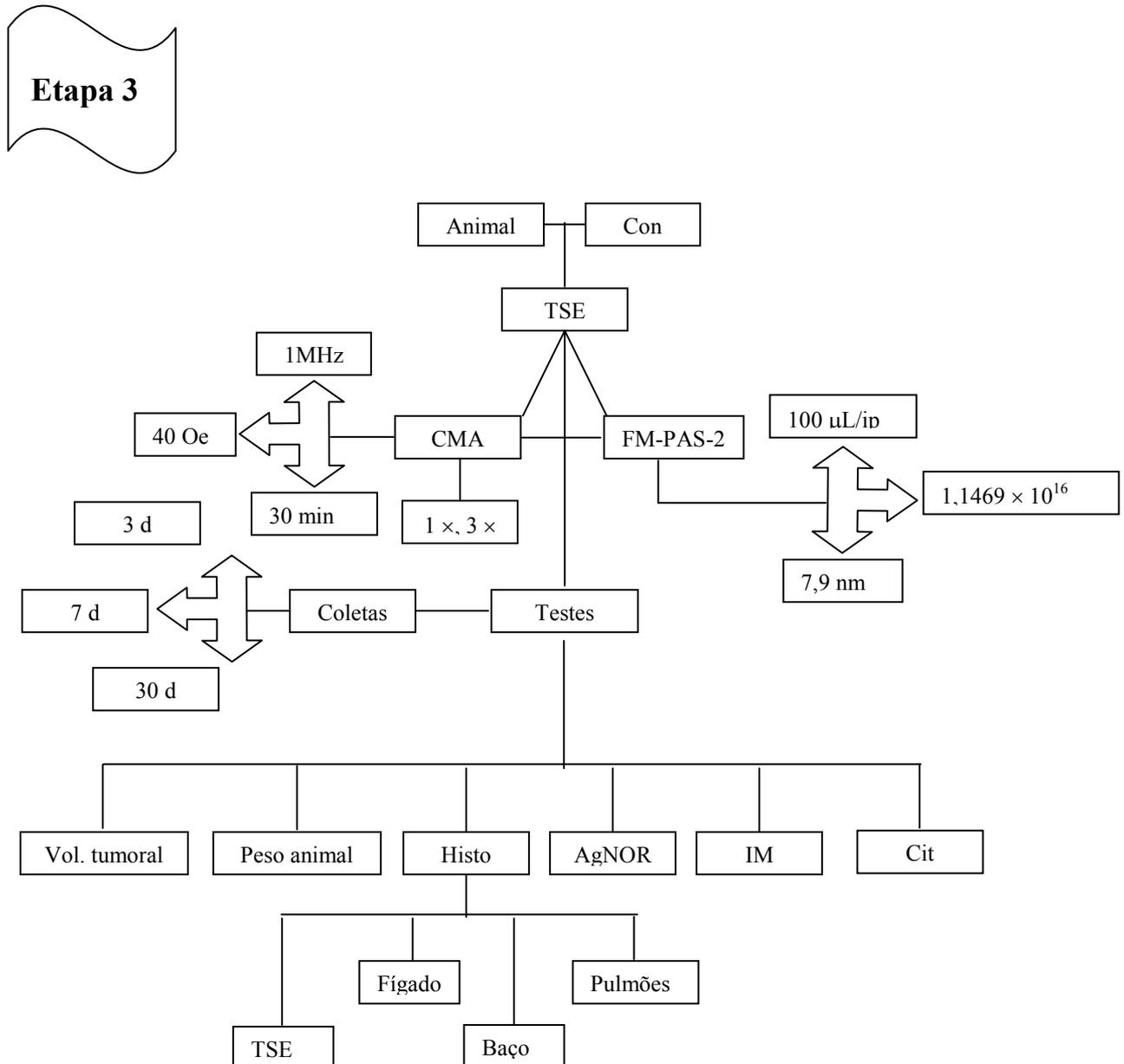
Anexo 02

Etapa 2



Esquema 2 – Representa os procedimentos empregados na etapa 2.

Anexo 03



Esquema 3 – Representa os procedimentos empregados na etapa 3.