

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

NEDA SADEGHIANI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
RECOBERTAS COM ÁCIDO POLIASPÁRTICO NO TUMOR SÓLIDO DE
EHRlich NA PRESENÇA DE CAMPO MAGNÉTICO**

Brasilia – DF

2008

NEDA SADEGHIANI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
RECOBERTAS COM ÁCIDO POLIASPÁRTICO NO TUMOR SÓLIDO DE
EHRlich NA PRESENÇA DE CAMPO MAGNÉTICO**

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

NEDA SADEGHIANI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
RECOBERTAS COM ÁCIDO POLIASPÁRTICO NO TUMOR SÓLIDO DE
EHRlich NA PRESENÇA DE CAMPO MAGNÉTICO**

Tese de Doutorado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:

Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava
Presidente e Orientadora/UnB

Profa. Dra. Maria Aparecida Godoy Soler Pajanian
IF-UnB

Profa. Dra. Emilia Celma de Oliveira Lima
IQ-UFG

Prof. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos
IB-UnB

Profa. Dra. Andréa Barretto Motoyama
FS-UnB

Brasília, 27 de novembro de 2008

*A Deus, que me criou e me deu força, perseverança,
resistência e alegria;*

*À minha família, que me apoiou sempre que precisei nas
durezas da vida, nos momentos de saudade e nas minhas
decisões. Apesar da distância, ela foi e é a razão da minha
existência.*

OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata à Profa. Dra. **Zulmira Guerrero Marques Lacava** pela confiança, pela amizade, pelo apoio profissional e pessoal, e pela orientação. Jamais esquecerei que ela foi à única pessoa que me abriu as portas e me deu a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Profa. **Silene**, pela sua ajuda, incentivo e competência, pela sua disponibilidade e recepção, pelo carinho e sorriso. Imensa gratidão.

Ao Prof. Dr. **Paulo César de Moraes**, pelo apoio e amizade.

À profa. **Rosana** e seus alunos do laboratório de Evolução, que me disponibilizaram o equipamento para tirar minhas fotos lindas do trabalho, com muito carinho. Grata!

À profa. **Helena**, pela sua sabedoria e boas dicas.

Ao professor **Ícaro**, pela atenção e colaboração para confeccionar o eletroímã.

Ao **Silmar**, **Arthur** e às suas equipes do DTL-ENE, pela ajuda, respeito e apoio.

A um grande profissional, **Dr. Horácio**, pessoa que nos últimos momentos me ensinou a analisar as lâminas do tumor com sua sabedoria e paciência.

Aos Professores do laboratório de Genética: **Dr. César**, **Dra. Nazaré** e **Dra. Silviene**, pelo apoio, convívio, compreensão e amizade.

À **Isabel**, que sem ela seria impossível realizar os cálculos estatísticos. Obrigada, você agiu não só como uma profissional, mas como uma grande amiga.

As colegas do grupo da ZU **Lane**, **Flávia**, **Luciana**, **Giselda**, **Júlia**, **Danielle**, **Adriana**, **Débora**, **Camila**, **Marcella**, **Mariana**, **Mary-Ann**, pela ajuda, convívio e valiosa amizade.

Ao **Leandro e Sacha**, sempre tão amigos e prestativos. Muito obrigada.

Aos técnicos do Laboratório de Genética **Ornil, Elisa e Djalma**, pela ajuda técnica, pelo carinho e atenção, e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Genética **Cassinha, Gabriel, Arthur, Penha, Ana Luisa, Ana Elisabeth Mila e Carol**, pelo carinho e amizade.

Ao **Gilmar**, um amigo com um grande coração e enorme sinceridade, pela contribuição prestada em todos os momentos em que precisei, **à sua mãe D. Maria e às suas tias**, pelo carinho de mãe e enormes corações que cabem todo mundo dentro, fazendo com que me sinta um membro da família. Sentirei saudades. Obrigada a todos.

Às minhas queridas e eternas amigas, **Miriam, Manuela, Mieko e sua família, e Carol**. Obrigada pelo apoio e pela alegria dos momentos que compartilhamos.

Aos meus pais, **Abbas e Badri**, e aos meus irmãos **Nooshin, Hoda, Mohammad Reza, Ali e Haleh**, por me amarem tanto e sempre torcerem por mim. Aos meus amados sobrinhos **Saeed, Kiyarash, Rojina e Mahlla**. Mesmo distantes, todos vocês iluminam meu coração e me dão força para enfrentar todas as dificuldades. Dedico esta conquista a vocês, e os amo muito.

Ao meu amor **Emad** que foi um grande apoio emocional e moral em todas as noites que fiquei acordada, trabalhando.

Ao **Dr. N. Buske**, da empresa Mediport – Alemanha, por ceder gentilmente a amostra de fluido magnético testada.

Ao **CNPq, CAPES, FINATEC e Rede NANOBIOTEC**, pelo auxílio para a realização desta pesquisa.

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

*Comece fazendo o necessário, depois o que
é possível, e de repente você estará fazendo o
impossível.*

São Francisco de Assis

RESUMO

As últimas décadas têm sido marcadas por uma busca crescente de terapias alternativas para várias doenças. A magnetohipertermia (MHT) é uma terapia promissora para o tratamento de câncer devido ao fato de possuir efeitos colaterais reduzidos quando comparada às terapias convencionais. A Nanotecnologia pode contribuir nesta área com o desenvolvimento de materiais nanoestruturados especiais. Além desses materiais, há as nanopartículas magnéticas (NPM) dispersas em fluidos magnéticos (MF). O comportamento magnético das NPM dá uma importância especial ao uso de MF para o diagnóstico de câncer e tratamento com MHT. Foi desenvolvida uma nova amostra de MF baseada em nanopartículas de magnetita (diâmetro de 7.9nm, 1.16×10^{16} partículas/mL), revestidas com ácido poliaspártico (FM-PAS) e estabilizadas em meio fisiológico, com o propósito de conhecer melhor os efeitos biológicos e terapêuticos relacionados ao tratamento de tumores. O trabalho foi executado em 4 passos. No primeiro, foi demonstrado que a administração intravenosa de FM-PAS causa apenas ligeiras mudanças citométricas temporárias nas células sanguíneas, sem alterações genotóxicas e histopatológicas. No segundo passo, foi mostrado que a injeção ip com ou sem exposição a um campo magnético (AC, 1MHz, 40Oe) tampouco causa efeitos adversos. No terceiro passo, foi desenvolvido um tumor sólido de Ehrlich em um modelo animal. Os animais receberam injeções intratumorais de FM-PAS e foram subsequentemente expostos de uma a três vezes a um campo AC. A remissão total do tumor não foi obtida. Todavia, testes AgNOR mostraram uma redução no volume do tumor e na sua atividade proliferativa. Os resultados foram confirmados por análises histopatológicas. No quarto passo, um novo equipamento DC foi investigado. Foi observado que o mesmo não foi capaz de atrair as nanopartículas injetadas até o local do tumor, o que pode ter sido consequência de falhas no equipamento. Além disso, há a possibilidade das nanopartículas magnéticas não terem permanecido nas veias sanguíneas por tempo suficiente para tornar a atração magnética viável. Em suma, os resultados sugerem que, após ajustes na amostra ou nas condições experimentais, o tratamento administrado através de MHT é viável para aplicações clínicas em relação a outros tratamentos de câncer disponíveis.

Palavras-chave: Nanobiotecnologia, Magnetohipertermia, Magnetita, Fluido Magnético, Biocompatibilidade, Remissão de Tumor, Tumor Sólido de Ehrlich.

ABSTRACT

Last decades have been marked by an increased search for alternative therapies for several diseases. Magnetohyperthermia (MHT) is a promising therapy for the cancer treatment by the possibilities of side effects reduction when compared to the conventional therapies. Nanotechnology may contribute to this area by the development of special nanostructured materials. Among these materials are the magnetic nanoparticles (NPM) dispersed in magnetic fluids (MF). The NPM magnetic behavior gives special importance in the MF use for the cancer diagnostic and MHT treatment. To better understand the biological and therapeutic effects related to the treatment of tumors, a new MF sample was developed based on magnetite nanoparticles (7.9nm diameter, 1.16×10^{16} particle/mL) coated with polyaspartic acid (FM-PAS) and stabilized in physiological medium. The work was performed in 4 steps. In the first one, it was shown that the intravenous administration of FM-PAS caused only a slight and temporary cytometry changes in the blood cells, no genotoxicity and no histopathology alterations. In the second step it was shown that the intraperitoneal (ip.) injection with or without a magnetic field (AC, 1 MHz, 40Oe) exposure did not cause adverse effects either. In the third step an animal model for Ehrlich solid tumor was developed. The animals received intra-tumor injections of FM-PAS and were subsequently exposed one or three times to an AC field. Total tumor remission was not obtained. Nevertheless, AgNOR tests showed tumor volume and proliferative activity reduction. The results were confirmed by histopathology analyses. In the fourth step a new DC equipment was fabricated and its power to attract the NMPs to the tumor site was investigated. It was observed that the equipment was not able to attract the intravenous injected nanoparticles to the tumor site. The result may be consequence of equipment failures. Further it may occur because magnetic nanoparticles may not stay enough time in the blood vessels to make viable this magnetic attraction. The results suggest that after the sample or experimental conditions adjustments, the treatment mediated through MHT is viable and advantageous in relation to other cancer treatments.

Key words: Nanobiotechnology, Magnetohyperthermia, Magnetite, Magnetic fluid, Biocompatibility, Tumor remission, Ehrlich Solid Tumor.

ABREVIATURA E SIGLAS

AC – Corrente Alternado

AgNOR – Regiões Organizadoras de Nucléolo coradas com nitrato de prata

Cit – Citometria

CMA – Campo Magnético Alternado

CMC - Campo Magnético Continuo

d – Dia

DC – Corrente Continuo

DL50 – Dose Letal 50 – quantidade de amostra necessária para causar a morte de pelo menos 50% de uma determinada população em estudo

ELF-MF – Extremely Low Frequency – Magnetic Field

Equip - Equipamento

FM-PAS – Fluido Magnético – Ácido Poliaspártico

h – Hora

H/E – Hematoxilina/Eosina

Histo – Histologia

IM – Índice Mitótico

ip – injeção intraperitoneal

it – injeção intratumoral

iv – injeção endovenosa

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MHT – Magnetohipertermia

MHz – Mega Hertz

Mn – Micronúcleo

MRI – Imagem de ressonância Magnética

n – número

NCE – Eritrócitos Normocromático

NPM – Nanopartículas Magnéticas

Órg – Órgão

PCE – Eritrócitos Policromático

Peri – Peritônio

Pes – Peso

Sang – Sangue

Sol – Solução

TAE – Tumor Ascítico de Ehrlich

TSE – Tumor Sólido de Ehrlich

Viab – Viabilidade

Vol – Volume

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
1.1- Câncer	16
1.2 – Magnetohipertermia	22
1.3 - Fluidos Magnéticos	24
1.4 - Ácido Poliaspártico	26
1.5 - Campo Magnético	27
1.6 - Tumor de Ehrlich	29
2 - OBJETIVOS	31
3 - MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 - Amostras	34
3.2 - Caracterização das NPM, FM-PAS-1 e FM-PAS-2	34
3.3 - Animais	35
3.4 - Tratamentos	35
3.5 - Análise Citométrica do sangue periférico	38
3.5.1 - Contagem Global de leucócitos	38
3.5.2 - Contagem diferencial de leucócitos	38
3.6 - Análise de Genotoxicidade e Citotoxicidade	39
3.7 - Análise Histopatológica	41
3.8 Magnetohipertermia	43
3.8.1 - Equipamento gerador de CMA	43
3.8.2 - Exposição ao CMA	43
3.8.3 - Eletroímã	45
3.8.4 - Avaliação da viabilidade	45
3.8.5 - Análise diferencial das células peritoneais	46
3.9 - Ressonância Magnética	47
3.10 - Tumor de Ehrlich	47
3.10.1 - Tumor Ascítico de Ehrlich	48
3.10.2 - Indução do TSE	48
3.11 - Tratamentos dos animais com TSE	49
3.12 - Análise Histopatológica dos animais com TSE	50
3.13 - Teste de agressividade pelo AgNoR	51

3.14 - Teste de proliferação pelo Índice Mitótico	53
3.15 - Avaliação do volume tumoral e peso animal	54
3.16 - Análise Estatística	54
4 - RESULTADOS	56
4.1 - Caracterização das nanopartículas magnéticas	57
4.2 - Resultados da Etapa 1	58
4.2.1 - Contagem global e diferencial do sangue periférico	58
4.2.2 - Análise de Genotoxicidade e Citotoxicidade	58
4.2.3 - Análise Histopatológica	61
4.3 - Resultados da Etapa 2	66
4.3.1 - Análise da viabilidade celular	66
4.3.2 - Análise de Genotoxicidade e Citotoxicidade	68
4.3.3 - Contagem global e diferencial das células do sangue Periférico	69
4.3.4 - Contagem global e diferencial das células peritoneais	69
4.3.5 - Análise Histopatológica	73
4.4 - Resultados da Etapa 3	78
4.4.1 - Contagem global e diferencial das células do sangue Periférico	78
4.4.2 - Observações histopatológicas	82
4.4.2.1 - Resultados obtidos pelas análises do tumor sólido de Ehrlich	82
4.4.3 - Análise de agressividade do TSE pelo teste AgNOR	97
4.4.4 - Análise de proliferação celular pelo teste de índice mitótico (IM)	98
4.4.5 - Análise de volume da massa tumoral	99
4.4.6 - Avaliação do peso animal	100
4.4.7 - Observações clínicas	102
4.4 - Resultados da Etapa 3	103
5 - DISCUSSÃO	104
5.1 - Considerações sobre a amostra FM-PAS	105

5.2 - Considerações sobre os testes biológicos	109
5.3 - Considerações sobre o Tumor	117
5.4 - Considerações sobre a Magnetohipertemia	121
5.5 - Considerações finais	123
6 - CONCLUSÃO	125
7 - PERSPECTIVAS FUTURAS	128
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
9 - ANEXOS	

1- INTRODUÇÃO

1.1 - CÂNCER

O câncer configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, o que fica bastante evidente nas estimativas das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, para o ano 2008, em homens e mulheres (tabela 1), segundo localização primária, publicadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Tabela 1 – Estimativas de casos novos de câncer no Brasil para o ano 2008. Taxas brutas de incidência por 100.000 homens (tabela laranja) e mulheres (tabela azul). Fonte: INCA

Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	49.530	52,43	13.990	67,81
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	18,86	5.150	24,91
Estômago	14.080	14,92	3.590	17,42
Cólon e Reto	12.490	13,23	4.360	20,99
Cavidade Oral	10.380	11,00	3.000	14,45
Esôfago	7.900	8,35	1.640	7,84
Leucemias	5.220	5,52	1.460	7,06
Pele Melanoma	2.950	3,09	830	3,80
Outras Localizações	55.610	58,87	17.010	82,32
Subtotal	175.970	186,29	51.030	246,97
Pele não Melanoma	55.890	59,16	13.230	64,02
Todas as Neoplasias	231.860	245,47	64.260	310,93

*Localização Neoplasia maligna	Primária	Estimativa dos Casos Novos			
		Estado		Capital	
		Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina		49.400	50,71	17.400	76,04
Colo do Útero		18.680	19,18	5.620	24,49
Cólon e Reto		14.500	14,88	5.450	23,80
Traquéia, Brônquio e Pulmão		9.460	9,72	3.070	13,49
Estômago		7.720	7,93	2.380	10,30
Leucemias		4.320	4,44	1.340	5,89
Cavidade Oral		3.780	3,88	1.140	4,83
Pele Melanoma		2.970	3,03	930	3,69
Esôfago		2.650	2,72	620	2,30
Outras Localizações		62.270	63,93	22.530	98,39
Subtotal		175.750	180,43	60.480	264,11
Pele não Melanoma		59.120	60,70	14.140	61,73
Todas as Neoplasias		234.870	241,09	74.620	325,77

Todos os tecidos são compostos por células e produtos celulares; essas células surgem a partir da divisão celular de um óvulo fertilizado. As células normais dos organismos são capazes de se dividir mesmo depois da fase adulta, permitindo a manutenção dos tecidos ao longo da vida. Entretanto, mutações gênicas podem causar a perda do controle da proliferação celular, levando ao aparecimento de novas células que geralmente terão genótipos alterados, além de apresentarem alterações estruturais e fisiológicas. Essas mutações geralmente ocorrem nas células somáticas e é necessária uma ocorrência seqüencial dessas mutações para o desenvolvimento do câncer (WEINBERG, 2007).

O câncer é uma patologia com localizações e aspectos clínico-patológicos múltiplos e não possui sintomas ou sinais patognomônicos, podendo ser detectado em vários estágios de evolução histopatológica e clínica. Destes fatos resulta, em grande parte, a dificuldade do seu diagnóstico e a afirmativa de que a suspeita de câncer pode surgir diante dos mais variados sintomas. A detecção precoce da doença realizada no seu estágio pré-clínico, ou seja, antes que o indivíduo manifeste algum sintoma relacionado com a doença ou apresente alguma alteração ao exame físico, é fundamental para aumentar as chances de cura, como mostra figura 1.



Figura 01: Esquema da história natural do câncer. (Retirado de <http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?112>)

Nos últimos anos, houve muitas descobertas e avanços na busca por técnicas de diagnóstico mais precisas. Dentre elas, pode-se citar biópsia; endoscopia; exames de sangue, diagnóstico por imagem tais como: radiografia, tomografia, ressonância nuclear magnética (IRM), cintilografia e ultra-sonografia.

O objetivo dos tratamentos é destruir as células cancerosas e evitar sua reincidência, podendo ser utilizadas diferentes técnicas convencionais, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia, ou métodos alternativos, como bioterapia e magnetotermocitólise.

A cirurgia foi a primeira técnica empregada para terapia de câncer e é ainda o primeiro método utilizado para tratar pacientes com tumores localizados e lesões pequenas e não metastáticas (WHIPPLE, 1960). Lesões pré-malignas ou pré-cancerosas, como pólipos gastrointestinais e leucoplasia de boca, também podem ser tratadas pela cirurgia removedora (PAGE, 1991). É também utilizada para diminuir a dor e aliviar os sintomas, reduzir a massa tumoral, aumentar a suscetibilidade da resposta à quimioterapia e/ ou radioterapia, bem como para diagnóstico e/ ou estadiamento (PETROIANU; PIMENTA, 1998). Algumas desvantagens deste método são as complicações pós-operatórias que podem gerar seqüelas físicas e funcionais e, em casos extremos, a morte (SAWADA *et al.*, 1998).

Outro tratamento convencional bastante utilizado é a radioterapia, cujo objetivo é danificar o DNA das células cancerosas localizados em regiões que impedem a sua remoção parcial ou total por meio da cirurgia (COHEN-JONATHAN *et al.*, 1999). A radiação pode ser aplicada por um aparelho extracorpóreo (teleterapia) ou por meio da injeção de isótopos ou materiais radioativos (braquiterapia) no corpo ou diretamente na massa tumoral (THOMPSON *et al.*, 2008) A radioterapia tem papel fundamental no controle local do câncer. Estima-se que 60% dos pacientes com câncer necessitem de radioterapia durante o curso de sua doença. A radioterapia pode ser usada para tratar

tumores sólidos, como os de pele, língua, laringe, cérebro, mama e colo uterino. Como a radioterapia é limitada às áreas específicas e como as células cancerosas possuem diferentes sensibilidades, geralmente o melhor resultado pode ser obtido pela combinação dessa técnica com outras, como cirurgia e quimioterapia (MARKS *et al.*, 1991; JIM *et al.*, 2008). A síndrome aguda da radiação, que é causada pelos danos nas células que se proliferam rapidamente e que ocorre nas primeiras semanas da terapia, é uma das desvantagens desta terapia. Os sintomas são vômitos, náuseas, perda de apetite, do peso e da libido, febre, prostração, queda de cabelo, hemorragias dispersas e depressão na medula óssea. Estes efeitos são mais severos quando a dose de radiação é alta ou quando a mesma é acompanhada por quimioterapia. Em longo prazo, após meses ou anos de terapia, dependendo da dose total da radiação, alguns danos podem ser causados no sistema vascular ou nos tecidos conectivos, como, por exemplo, fibroses, necroses, fissuras, edema ou cânceres secundários (OKUNO *et al.*, 1986; GRIGSBY *et al.* 1995).

Outra terapia tradicional de câncer é a quimioterapia, na qual agentes químicos matam as células ao causarem danos ao DNA (CLETON, 1995) ou outras organelas como mitocôndria (GOGVADZE *et al.*, 2008) e, conseqüentemente, impedirem a mitose. É uma terapia sistêmica de muita eficácia para tratar linfoma de Burkitt, leucemia aguda e câncer das células germinativas, entre outros tipos de câncer (RIZZIERI *et al.*, 2004). A quimioterapia é útil também para controlar o crescimento do tumor, quando a cura é impossível, para aliviar a dor e outros sintomas, e para reduzir a massa tumoral antes da radioterapia ou cirurgia. Na maioria das vezes é aplicado um conjunto de drogas combinadas para aumentar a eficiência da terapia, prevenir a resistência e manter os efeitos tóxicos em uma faixa aceitável (OKUNO *et al.*, 1986). Como a quimioterapia é sistêmica, seus efeitos são observados tanto no tecido tumoral, quanto nos tecidos saudáveis, sobretudo nos que apresentam alta taxa de divisão celular,

como os da medula óssea, epitélios gastrintestinais, folículos capilares e pele. Durante a quimioterapia são observados também anemia, leucopenia, trombocitopenia, diarreia, vômito, náuseas, ulcerações e queda de cabelo (CLINE, HASKELL, 1980).

Para diminuir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia das drogas no diagnóstico e tratamento do câncer, pesquisadores estão em busca de novas drogas e métodos. O câncer de mama é um dos casos que está sendo investigado vastamente nas últimas décadas, tendo surgido grandes descobertas que permitem o diagnóstico precoce e um tratamento mais eficaz (TEWARI *et al.*, 2008).

Em consonância com estes novos métodos, a terapia complementar envolve métodos de suporte que podem contribuir no tratamento clássico, ajudando a promover o equilíbrio emocional e a reintegração psicossocial do paciente, por meio da acupuntura (WALKER *et al.*, 2008), fisioterapia (OVERGARD, *et al.*, 2008), psicoterapia (ARVING *et al.*, 2006; FANN, *et al.*, 2008), musicoterapia (O'CALLAGHAN, McDERMOTT, 2007; COOPER, FOSTER, 2008), dentre outros.

As técnicas de medicina alternativa, tais como visualização, relaxamento, massagem, homeopatia, exercícios espirituais, psicoterapia, vitaminas, ervas e acupuntura, estão sendo estudados como mecanismos importantes na cura do câncer, juntamente com tratamentos tradicionais e novos métodos (McKINNE, 2006). Cada um destes procedimentos apresenta vantagens e desvantagens, e é a combinação entre eles que pode dar respostas satisfatórias na possível cura do câncer.

A bioterapia envolve o uso de agentes biologicamente derivados para modificar a relação entre o tumor e o hospedeiro, alterando sua resposta biológica às células cancerosas, com um resultado terapêutico. A maioria desses agentes ativa o sistema imunológico para atacar as células cancerosas e pode diminuir o crescimento do tumor e até causar a regressão do mesmo. Alguns exemplos destes agentes são os interferons, as interleucinas e os fatores de crescimento hematopoético (KONTZOGLOU, 2002).

Anticorpos monoclonais podem ser programados para reconhecerem proteínas específicas nas células cancerígenas (antígenos) ou serem usados como carreadores de drogas (NYGREN, LARSSON, 2003). Outros agentes bioterapêuticos incluem retinóides, fatores de necrose tumoral, terapia gênica, vacinas e inibidores de enzimas (BONIN-DEBS et al., 2004; ZHENG *et al.*, 2007) e terapia viral (HAWKINS *et al.* 2002).

Nas últimas décadas, tem havido grande destaque sobre o uso da hipertermia para tratamento do câncer. Esta técnica é baseada na elevação da temperatura, entre 6 a 8°C, no local do tumor, sendo capaz de causar danos nas células tumorais e, conseqüentemente, a lise celular (HALL, ROIZIN-TOWLE, 1984; FIELD, 1987).

As células tumorais, por várias razões como instabilidade genética, alta proliferação e metabolismo elevado, são mais sensíveis ao aumento da temperatura. O tumor, por ser isolado e distinto em relação aos tecidos normais, em termos de proliferação, nutrição e estrutura, tem uma circulação de sangue restrita. O calor impede a chegada de oxigênio e nutrientes às células tumorais causando falha no sistema vascular do tumor, destruição do metabolismo celular e, subseqüentemente, morte celular. Outro efeito do calor é a formação de proteínas específicas chamadas proteínas de choque térmico, que aparecem na superfície interna da membrana das células danificadas. O sistema imune reconhece essas proteínas como estranhas e, assim, as células cancerígenas poderão ser reconhecidas e fagocitadas pelas células do sistema imune (HARTL; JONES, 2002).

Em combinação com outros métodos terapêuticos, a hipertermia demonstrou eficácia no combate ao tumor (SCHLAG, 2002), como confirmam os estudos sobre câncer de mama (VERNON *et al.*, 1996), cólon (RAU *et al.*, 1998), tumores no pescoço e cabeça (BRIZEL *et al.*, 1999), câncer de colo de útero e bexiga (ZEE *et al.*, 2000) e câncer de próstata (VULPEN *et al.*, 2004).

Entretanto, tem sido um desafio induzir o aumento na temperatura sem prejudicar os tecidos normais. Desde a antiguidade, vários métodos têm sido utilizados para promover a hipertermia, tais como o uso de bolsa quente, banhos quentes, massagem com óleo, gel ou cremes para esquentar o local e câmeras quentes, entre outros métodos. Para alcançar locais mais profundos do corpo, ondas curtas, ondas sonoras com alta frequência, microondas e laser podem ser usados.

Transportar o calor para locais inacessíveis no corpo é uma idéia antiga e a proposta é empregar os carreadores/transportadores biológicos como sistema sanguíneo incluindo células, veias e capilares. O pioneiro desse sistema chamado modelo biológico de transporte do calor, “bioheat transport model”, é Pennes (1948) e desde então muitos pesquisadores tentaram utilizar esse modelo com pequenas modificações para obter melhores condições e modelos mais avançados e eficazes (MAHJOOB, VAFAI, 2008 a e b).

1.2 – Magnetohipertermia

Um caso especial de hipertermia é obtida utilizando-se nanopartículas magnéticas (FIELD, 1987; GORDON, 1998; HERGT, *et al.*, 2004), sendo conhecida como **magnetohipertermia** ou magnetotermocitólise, a lise de células tumorais por calor gerado magneticamente. Nas últimas décadas os cientistas na área de nanotecnologia estão em busca de sintetizar nanomateriais magnéticos cada vez mais biocompatíveis utilizados em diversas áreas, como imagem de ressonância magnética (IRM) (HUNG, *et al.*, 2008), carregamento de drogas até o local desejado (MÖNCH, *et al.*, 2005; AVILÉS, *et al.*, 2008) e tratamento de câncer (HILGER, *et al.*, 2003).

Para a magnetohipertermia, após o transporte das nanopartículas magnéticas para o local alvo, a região é submetida a um campo magnético de corrente alternada de

alta frequência, o que possibilita a elevação da temperatura local em até 8° C (BACRI *et al.*, 1997; SHINKAI *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.* 2002; ZHANG *et al.* 2007).

Essas nanopartículas magnéticas biocompatíveis após serem associadas a anticorpos monoclonais para antígenos específicos da membrana das células tumorais, são administradas aos pacientes com câncer. Depois de um período de tempo variável para cada tipo de fluido magnético utilizado, o paciente é submetido a um exame de ressonância magnética nuclear, o que possibilitará um diagnóstico precoce de micrometástases (RAVICHANDRAN, *et al.*, 2008; TORRICELLI, *et al.*, 2008), representando um avanço na busca de métodos para diagnóstico e tratamento (LING, *et al.*, 2008). O fato das nanopartículas magnéticas estarem associadas a anticorpos monoclonais torna viável a restrição do aquecimento apenas ao tecido tumoral, o que faz da magnetotermocitólise uma técnica promissora para o tratamento de diversos tipos de câncer (HILGER, *et al.* 2005).

Para implementar o procedimento de magnetotermocitólise, é necessário um equipamento portátil gerador de corrente alternada de alta frequência. Diferentes grupos de pesquisadores estão buscando confeccionar aparelhos cada vez mais eficazes e menos invasivos. Para viabilizar o processo de magnetotermocitólise um equipamento que promove a hipertermia foi desenvolvido no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília (GUEDES *et al.*, 2004).

Também necessário para esta aplicação é a existência de amostras de fluidos magnéticos (soluções coloidais contendo nanopartículas magnéticas) que sejam biocompatíveis, o que inclui as características de serem biodegradáveis, hemocompatíveis e não tóxicas ao organismo. Dentre as várias possibilidades, as amostras à base de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estão sendo mais utilizadas por demonstrar mais biocompatibilidade e tolerância nos organismos. Essas características podem ser atingidas por meio do recobrimento das

partículas com um material biologicamente ativo, do controle de seus parâmetros físicos, tais como o tamanho da partícula, a susceptibilidade magnética da solução e o conhecimento do seu comportamento no organismo (EAGLE, MALLINSON, 1967; DUNIN-BORKOWSKI, *et al.*, 2001).

1.3 - FLUIDOS MAGNÉTICOS

Fluidos magnéticos são compostos de nanopartículas magnéticas em meio aquoso (BUSKE, 1984; DA SILVA, 1997 a, MORAIS, 2006). Diferentemente dos paramagnéticos e diamagnéticos (KITTEL, 1978; BLUMS, *et al.*, 1997), que podem ser gasosos, líquidos ou sólidos, os materiais ferromagnéticos geralmente são sólidos. Quando formam um sistema bifásico, constituído por pequenas partículas de ferro sólido, ou ferritas, dispersas em um líquido, são chamados fluidos magnéticos ou ferrofluidos. Devido ao seu tamanho, que varia na faixa coloidal de 1 a 100 nm, estas partículas são referidas como colóides magnéticos (BLUMS *et al.*, 1997; ROSENWEIG, 1985). Os fluidos magnéticos mais usados contêm partículas magnéticas esféricas com tamanhos de aproximadamente 4 a 15 nm, dispersas em um solvente apolar ou polar. Mesmo tendo as propriedades comuns de outros líquidos, os fluidos magnéticos se comportam de maneira específica, típica de um líquido intrínseco ferromagnético, como o fato de serem atraídos na direção de um gradiente de campo magnético (BORIS, 1996). Algumas propriedades marcantes de fluidos magnéticos, como estabilidade de longa duração em temperatura ambiente, alta saturação magnética, susceptibilidade magnética, viscosidade e pressão de vapor baixas, ausência de agregação significativa na presença do campo magnético e estabilidade no campo gravitacional, resultam em uma ampla variedade de aplicações, tais como: intensificação da transferência de calor, técnicas impermeáveis, processos de separação

magnética, dispositivos de medidas, transdutores, sensores, entre outras (ODENBACH, 2003).

Buscando conhecer os efeitos biológicos relacionados à utilização dos fluidos magnéticos, tem-se investigado a biocompatibilidade/toxicidade de nanopartículas magnéticas apresentando coberturas variadas: amostras em que as nanopartículas eram à base de (1) ferrita de manganês recobertas com ácido cítrico ou tartarato (LACAVA *et al.*, 1999 a, b), (2) ferrita de cobalto recobertas com ácido cítrico ou encapsuladas em lipossomas furtivos (KÜCKELHAUS, 2003 a, b), (3) magnetita recobertas por dextrana (LACAVA *et al.*, 2004a), ácido cítrico (GARCIA *et al.*, 2002; FREITAS, 2002), DMSA (CHAVES *et al.*, 2002; GARCIA, 2005), ácido dodecanóico/ácido etoxilado (FREITAS *et al.*, 2002) e ácido glucônico (BARBOSA, 2004) e ácido poliaspártico (SADEGHIANI, 2004), e maghemita recobertas com ácido cítrico encapsuladas ou não em lipossomas furtivos (BRUGIN, 2007, COELHO, 2008), fosfato (PORTILHO-CORRÊA, 2007, ou ainda de maghemita encapsuladas em polímeros de albumina (ESTEVANATO, 2008, SALDANHA, 2007). Os resultados alcançados evidenciaram que algumas dessas amostras apresentam alta toxicidade e mutagenicidade, dose e tempo dependentes (LACAVA *et al.*, 1999 a; FREITAS *et al.*, 2002; BARBOSA, 2004). No entanto, as análises com as amostras de fluidos magnéticos com nanopartículas magnéticas recobertas com dextrana ou ácido cítrico, ou ainda encapsuladas em lipossomas furtivos, apresentaram resultados promissores em relação ao seu uso biomédico potencial (GARCIA *et al.*, 2002; CHAVES *et al.*, 2002; KÜCKELHAUS, 2003 a, b; LACAVA *et al.*, 2004a; SADEGHIANI, 2004; GARCIA, 2005; BRUGIN, 2007; PORTILHO-CORRÊA, 2007, SALDANHA, 2007, ESTEVANATO, 2008; COELHO, 2008).

1.4 - ÁCIDO POLIASPÁRTICO

O **ácido aspártico** ou **aspartato** é um dos aminoácidos componentes das proteínas dos seres vivos (Fig. 02). É um aminoácido não essencial em mamíferos, tendo uma possível função de neurotransmissor (MITROVIC *et al.*, 1999) excitatório no cérebro. É também um metabólito do ciclo da uréia e participa na gluconeogênese, biosíntese de glicose a partir de precursores que não são hexose ou carboidrato, como lactato, piruvato, alanina e glicerol (RASHIDIAN; FATTAHI, 2009).

Em mamíferos, o aspartato é degradado *in vivo* a oxaloacetato. Este metabólito é também o precursor da síntese do aspartato. A enzima responsável por esta reação é a aspartato aminotransferase que, como o nome indica, transfere um grupo amina do glutamato para o oxaloacetato para formar aspartato (o outro produto da reação é o α -cetoglutarato). Este processo ocorre na matriz mitocondrial. O aspartato pode então sair da mitocôndria e participar no ciclo da uréia, servindo de precursor para o metabólito argininosuccinato. Por meio deste processo, o aspartato serve de precursor para a síntese de outro aminoácido, a arginina. O aspartato também serve de precursor na síntese de purinas e pirimidinas. É doador de átomos de azoto, provenientes do seu grupo amina, em diferentes passos da síntese de purinas. Na síntese de pirimidinas, o aspartato tem um papel de maior importância, já que oferece o seu esqueleto de carbono como base de construção do anel da base azotada (NELSON; COX, 2005; CAMPBELL, 2006).

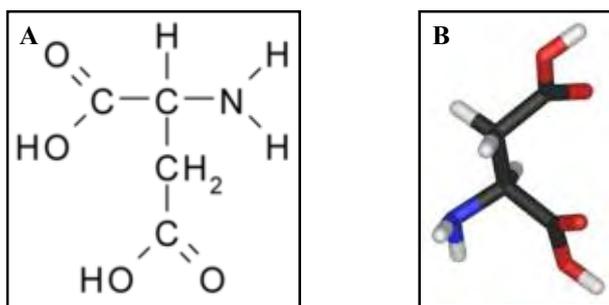


Figura 02 – Estruturas química (A) e tridimensional (B) do aspartato.

A utilização do ácido poliaspártico como adjuvante em terapias do câncer motiva o estudo dos efeitos biológicos causados pela administração desta amostra (MOORE *et al.*, 1982; NOORDHUIS *et al.*, 1996, KÖHNE *et al.*, 1997). Trabalhos prévios com fluido magnético condicionado por ácido poliaspártico em meio alcalino (SADEGHIANI, 2004), evidenciaram potencial desta amostra para aplicações biomédicas. Neste trabalho foram realizados estudos para se avaliar a biodistribuição e a biocompatibilidade de amostra de fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico (**FM-PAS**) em meio aquoso e pH fisiológico.

1.5 - CAMPO MAGNÉTICO

Nas últimas décadas houve muitos avanços tecnológicos nas áreas da eletrônica, telecomunicação, informática, transporte e biofísica, entre outras. Os aparelhos eletrônicos têm papel indispensável na vida cotidiana e são ferramentas importantes nas pesquisas em qualquer área. Esses aparelhos e equipamentos eletro-eletrônicos são geradores de campo magnético com intensidade que varia de baixa a muita alta. Existem dois tipos de campo magnético, contínuo (DC) e oscilante ou alternado (AC). Paralelo com esses avanços, os médicos e ambientalistas estão em busca dos efeitos do campo

magnético nos seres vivos. Muitas pesquisas revelaram as alterações no ciclo e no crescimento celular (LIBOFF, *et al.*, 1984; SCARFI, *et al.*, 1999; HEREDIA-ROJAS, *et al.*, 2001), supressão na citotoxicidade dos linfócitos (LYLE, *et al.*, 1991), alterações nas superfícies celulares (MARRON, *et al.*, 1988) e efeitos diretos na estrutura do DNA (DASILVA, *et al.*, 2000). O possível efeito carcinogênico dos campos magnéticos de frequência baixa (Extremely Low Frequency - Magnetic Fields, ELF-MF) foi demonstrado em várias pesquisas, tendo Wertheimer e Leeper (1979) reportado a associação epidemiológica entre leucemia infantil e ELF-MF. Algumas associações e grupos de pesquisa, como NRBP (2001), ICNIRP (2001), Feychting *et al.* (2005) e WHO (2007), também acreditam no possível efeito cancerígeno dos campos magnéticos. Em 2002, a Associação Internacional de Pesquisas sobre Câncer (International Association for Research on Cancer, IARC) classificou a exposição ao ELF-MF no grupo 2B (possível carcinogênico). Existem muitas controvérsias dos possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos nos resultados obtidos nas diferentes pesquisas. Nakasono *et al.* (2008) observaram que campos magnéticos com frequências intermediárias (2KHz, 20KHz, e 60KHz) não têm efeito mutagênico, co-mutagênico ou de conversão gênica nas bactérias, enquanto Rodrigues-De La Fuente *et al.* (2008) observaram que o campo magnético sinusoidal de 60Hz com intensidades de 1,0, 1,5 e 2,0 mTesla, diminuiu bastante o crescimento e a diferenciação de certo tipo de protozoário. Gobba *et al.* (2008) demonstraram diminuição significativa na atividade das células NK de operadores expostos a diferentes níveis de ELF-MF nos linfócitos do sangue periférico. Além disso, os efeitos deletérios do IRM e da rádio frequência (RF), *in vivo* e *in vitro*, foram demonstrados na pesquisa de Hsieh *et al.* (2008).

Considerando os resultados controversos da literatura e a escassez de dados relacionados aos efeitos do campo magnético, sobretudo na presença de nanopartículas magnéticas, na segunda etapa deste trabalho foram investigados, *in vivo*, os efeitos

biológicos de campo magnético alternado (CMA), 1MHz, em animais tratados com a amostra **FM-PAS**.

1.6 - Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi introduzido por Ehrlich em 1896 e descrito em 1905 como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas (EHRLICH e APOLENT, 1905). Inicialmente, o tumor foi induzido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Loewenthal e Jahn, foi que surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais. Bayreuther, em 1952, estudou pela primeira vez detalhadamente os cromossomos deste tumor em cepas stann IG e stann Jena. O número de cromossomos das duas linhagens era 45 e 46, respectivamente. Mais tarde, em 1976, o pesquisador Nielsén mostrou que o número dos cromossomos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, pode variar, após sucessivas culturas das células tumorais, entre diploidia, tetraploidia, heteroploidia e hexaploidia.

Histologicamente, o tumor de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose. Estas são oriundas da morte das células neoplásicas, a qual é bastante intensa já na primeira semana pós-inoculação. Intensa atipia e células extremamente anaplásicas são comumente vistas por toda a lâmina. O tumor possui poucas células inflamatórias e estroma escasso. Alto índice mitótico e de invasividade caracterizam essa neoplasia, a qual constitui excelente instrumento didático para o entendimento do comportamento dos tumores malignos (STEWART *et al.*, 1959). Devido a suas características didáticas e de facilidade de manuseio experimental, o tumor sólido de Ehrlich (TSE) foi induzido no laboratório de Genética da Universidade de Brasília e usado para avaliar o

efeito da amostra **FM-PAS** na presença ou ausência do campo magnético alternado (CMA).

2 – OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo principal investigar o tratamento de tumor sólido de Ehrlich por magnetohipertermia promovida por administração, em camundongos, de amostra magnética à base de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico (**FM-PAS**) e exposição a campo magnético alternado e, como objetivos específicos:

- (1) Avaliar a biocompatibilidade e biodistribuição da amostra **FM-PAS** administrada por via endovenosa, por meio de testes citométricos, de micronúcleo e histopatológicos;
- (2) Avaliar efeitos biológicos de campo magnético alternado gerado por equipamento eletromagnético (**Equip.I**) após administração, via intraperitoneal, da amostra **FM-PAS**, por meio de testes citométricos, de viabilidade, micronúcleo e histopatológicos;
- (3) Avaliar os efeitos da magnetohipertermia após administração intratumoral da amostra **FM-PAS-2** e exposição a campo magnético alternado gerado pelo **Equip.I**, por meio de testes de citometria, AgNOR e histopatologia;
- (4) Observar e medir a regressão do tumor (massa e volume) e avaliar o comportamento dos animais em tratamento;
- (5) Avaliar a capacidade de atração das nanopartículas magnéticas administradas endovenosamente para o tumor sólido de Ehrlich utilizando um eletroímã (**Equip.II**) gerador de campo magnético de frequência contínua (DC), por meio de análises histológicas e ressonância magnética.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Em anexo se encontram os esquemas ilustrativos das três etapas (**Anexo 01 a 03**).

3.1 – Amostra

A amostra de fluido magnético utilizada neste trabalho foi sintetizada e gentilmente cedida pelo Dr. Nobert Buske (Empresa Magnetic Fluids, Berlin, Alemanha). As nanopartículas de magnetita foram obtidas por condensação química de sais de Fe (II) e Fe (III), ressuspensas em meio aquoso e estabilizadas por recobrimento com ácido poliaspártico (FM-PAS), em pH fisiológico. Foram enviados dois lotes independentes, denominados **FM-PAS-1 e FM-PAS-2**.

3.2 - Caracterização Físico-Química das nanopartículas de magnetita

Para a determinação da concentração de ferro nas amostras, do diâmetro hidrodinâmico das partículas e do número de partículas /mL, amostras de ambos os lotes foram analisados no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiânia – UFG. As análises determinaram que a amostra **FM-PAS-1** possui $1,16 \times 10^{16}$ partículas/mL com concentração de ferro aproximadamente 29,0 mg/mL, enquanto a amostra FM-PAS-2 apresenta concentração de ferro 70,6 mg/mL e número de partículas $1,469 \times 10^{16}$ p/mL. O diâmetro hidrodinâmico das partículas da amostra **FM-PAS-1** é 221 nm e o da **FM-PAS-2** 195nm.

Para a determinação dos diâmetros das NPM de **FM-PAS**, as amostras foram diluídas 1000 vezes em água destilada e colocadas sobre telas de microscopia eletrônica recobertas com Formvar. Após secarem por duas horas, as telas apropriadas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio eletrônico JEOL 100CXII. Os

diâmetros das partículas magnéticas foram obtidos por análise em computador, utilizando-se o programa ImagePro 4.0. A distribuição do diâmetro das partículas foi obtida utilizando-se o melhor ajuste de distribuição lognormal (MORAIS, *et al.*, 2002).

3.3 – Animais

Camundongos fêmeas não isogênicos da linhagem Swiss, com três meses de idade foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, SP. Os animais foram alojados no Biotério do Laboratório de Genética, com água e alimentos *ad libitum* e usados nas etapas um e dois. Para as etapas três e quatro foram usados camundongos fêmeas não isogênicos da linhagem CD1 com três meses de idade fornecidos pela Bioagri Laboratórios Ltda (BIOAGRI), DF.

3.4 – Tratamentos

Todos os procedimentos experimentais realizados durante este estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília – CEUA/63 – IB – UnB.

Os experimentos foram divididos em quatro etapas como mostrado na tabela 02 (p.23).

Etapa 1 - Os animais foram tratados com dose única, via endovenosa (iv.), de 100µL da amostra **FM-PAS-1**. Os tempos de tratamento foram de 30min, 12h, 1d, 2d e 7 dias. O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Foram realizados os testes de citometria, citotoxicidade/genotoxicidade e histopatologia para avaliar a biocompatibilidade e biodistribuição da amostra. Nesta etapa foram utilizados no total

de cinco animais (N=5), onde todos foram submetidos às análises de citotoxicidade/genotoxicidade e citometria, e apenas três animais (N=3) para a análise histopatológica.

Etapa 2 – Os animais foram tratados com dose única, via intraperitoneal (ip), de 100µL da amostra **FM-PAS-1**. Os tempos de tratamento foram de 30min, 6h, 1d, 2d e 7 dias. Parte dos grupos de animais, tanto tratados quanto sadios, foram submetidos a três minutos de CMA. Foram utilizados um total de cinco animais (N=5), para realizar os experimentos a fim de analisar diversos parâmetros biológicos como citometria, contagem diferencial das células peritoneais e viabilidade celular, e apenas três dos cinco animais (N=3) para análise histopatológica, incluindo-se grupos de controle salina para cada tempo e grupo experimental.

Etapa 3 - Os animais foram tratados com dose única, via intratumoral, de 100µL da amostra **FM-PAS-2**. Para realizar o teste de citometria e avaliar o peso do animal e o volume do tumor foram utilizados cinco animais (N=5). Três animais (N=3) desses mesmos grupos foram utilizados para as análises de histopatologia do tumor e dos órgãos fígado, baço e pulmões, índice mitótico e teste AgNor, incluindo-se grupos de controle salina para cada tempo e grupo experimental.

Etapa 4 – Animais (N=3) portadores de TSE foram tratados endovenosamente com 100µL ou 200µL da amostra **FM-PAS-1** para avaliar a potência do eletroímã (**Equip. II**) construído com o objetivo de atrair as nanopartículas magnéticas para o local do tumor; A presença das partículas foi determinada por análise histológica do tumor e por ressonância magnética no laboratório de Física na Universidade Federal de Goiânia - UFG – Goiânia.

Tabela 02: Esquema dos grupos experimentais.

Con. Trat.	Etapa 1(iv)	Etapa 2(ip)	Etapa 3(it)	Etapa 4 (iv)
NS/FM-PAS-1	--/100µL	100µL/ 100µL	-----	100µL e 200µL
NS/FM-PAS-2	-----	-----	100µL/ 100µL	-----
TSE	-----	-----	4 x 10⁶/100 µL/sc	4 x 10⁶/100 µL/sc
SCMA/CCMA		--/3m	--/30m	-----
--/CMC				--/60m
Tempo	30m, 12h, 1, 2 e 7 d	30m, 6h, 1, 2 e 7d	3d, 7d e 30d	Imediata

3.5 - Análise Citométrica do sangue periférico

O potencial pró-inflamatório dos tratamentos realizados foi avaliado por contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico.

3.5.1 – Contagem Global de leucócitos (CGL)

As análises foram feitas em lâminas com esfregaço de sangue coletado do coração, após anestesia com éter dos animais. Foram contadas 500 células, anotando-se o número de monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

Para realizar a contagem global do sangue periférico foram pipetados 20 μ L de sangue em tubos Ependorff contendo 380 μ L de solução de Turk, que promove a lise das hemácias e plaquetas, permitindo a contagem dos leucócitos. A solução de Turk é composta por dois mL de ácido acético glacial, 1mL da solução de azul de metileno 1% e 97mL de água destilada. O material foi homogeneizado lentamente por dois minutos e, posteriormente, 10 μ L do homogeneizado foram colocados em câmara de Neubauer. Procedeu-se à contagem dos leucócitos contidos nos quatro retículos externos da câmara ao microscópio de luz (400 \times), modelo Oleman. A concentração de leucócitos por mm³ foi calculada dividindo-se o número total de leucócitos contados por quatro (referente ao número de quadrantes contados), multiplicando-se por 20 (referente à diluição utilizada) e, por fim, multiplicando-se por 10⁴ (referente à profundidade da câmara).

3.5.2 - Contagem diferencial de leucócitos do sangue periférico

Foram preparados esfregaços de sangue periférico em lâminas de vidro para realizar a contagem diferencial do sangue periférico. As células secas foram fixadas por

5 minutos em metanol e, após a secagem natural, foram recobertas pelo corante Wright-Giemsa por aproximadamente 4 minutos. Em seguida, foi adicionado tampão fosfato pH 6.8, na proporção 1:1 de soluções A e B, permanecendo por mais 7 minutos. Ao final do processo de coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente. O corante é composto por 1,5 g de Wright, 0,17 g de Giemsa, 500 mL de metanol e 15 mL de glicerina. As soluções A e B são preparadas diluindo-se, respectivamente, 16,8g de Na_2HPO_4 e 8,16g de KH_2PO_4 , em 1L de água destilada.

A contagem foi realizada em microscópio de luz (1000×), modelo Oleman, por meio de teste cego. Foram contadas 500 células, anotando-se o número de monócitos, linfócitos, neutrófilos basófilos/mastócitos e eosinófilos. A proporção dessas células, em relação ao número total de leucócitos, foi obtida pela multiplicação do número de cada população celular pela contagem global de leucócitos (CGL) e o resultado dividido por 500.

3.6 - Análise de Genotoxicidade e Citotoxicidade

O potencial genotóxico e citotóxico do **FM-PAS-1** sobre células da medula óssea foi investigado pelo teste de micronúcleo. Os animais foram previamente anestesiados com éter etílico e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical. Os fêmures foram extraídos e as epífises cortadas para acessar a medula óssea. A medula óssea foi retirada pela introdução de uma agulha na epífise acoplada à seringa contendo 1mL de soro fetal bovino (SFB). O material foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a $5000 \times g$. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado em 50 μL de SFB e, posteriormente, 10 μL do homogeneizado foi distendido em lâmina de microscópio. Após a secagem das lâminas, à temperatura ambiente, o material foi fixado em metanol por cinco minutos. Depois da secagem, o material foi corado com

solução composta por 1mL de Giemsa e 14mL de tampão fosfato e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente. O corante Giemsa é composto por um grama de Giemsa, 5 mL de glicerol e 4mL de metanol. O tampão fosfato é o mesmo utilizado para coloração diferencial de leucócitos.

A análise de células foi realizada em microscópio de luz (1000×), modelo Oleman, por meio de teste cego. Foram contados 4000 eritrócitos, sendo 2000 eritrócitos policromáticos (PCE), que se coram em roxo pelo corante Giemsa, e 2000 eritrócitos normocromáticos (NCE), que se coram em rosa pelo mesmo corante, e o número de micronúcleos (Mn) encontrados em cada tipo celular foi contado e registrado. Na figura ilustrada embaixo (**Fig. 03**) a seta aponta um Mn em um NCE na esquerda (**Fig. 02a**) e a direita (**Fig. 02b**), indica um Mn em um PCE. Na figura esquerda pode-se também observar PCE e NCE sem micronúcleo.

Para avaliação da ação citotóxica da amostra, por meio do percentual de eritrócitos policromáticos (%PCE), foi registrado também o número de PCE e NCE quando qualquer uma dessas duas populações atingiu a contagem de 2000 células. O %PCE foi calculado pela fórmula:

$$\% \text{ EPC} = \left[\frac{\text{PCE}}{\text{PCE} + \text{NCE}} \right] \times 100$$

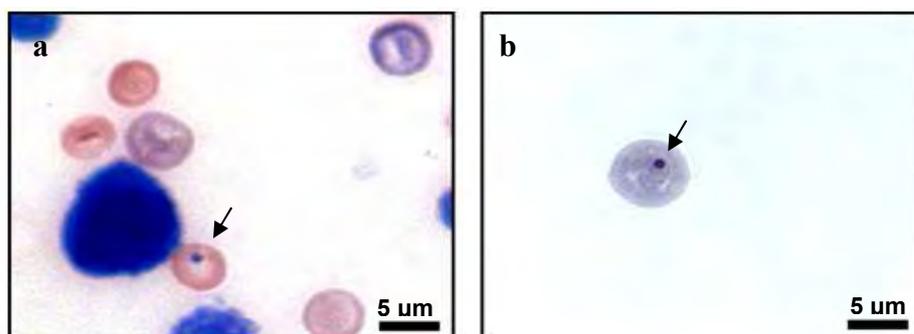


Figura 03: PCE e NCE da medula óssea. As setas apontam um Mn em um NCE (a) e em um PCE (b).

3.7 - Análise Histopatológica

Com o objetivo de verificar possíveis alterações provocadas pelo tratamento com **FM-PAS-1** tais como presença de infiltrado inflamatório, apoptose ou necrose tecidual e a presença de nanopartículas, foi realizada análise histopatológica, ao microscópio de luz. Foram coletados órgãos como fígado, baço, pulmões, rins, coração, pâncreas. Imediatamente após a coleta, fragmentos dos órgãos foram imersos em fixador de Davidson, para preservação da estrutura tecidual, e mantido a 4°C por 8-10 horas. A solução estoque do fixador Davidson (SHAW E BATTLE, 1957) é composta por 40mL de glicerina, 80mL de formol 40%, 120mL de etanol 95% e 120mL de água destilada. Antes da utilização, 1mL de ácido acético é acrescentado a 9mL da solução estoque.

Após a fixação, os fragmentos dos órgãos foram desidratados por imersões seqüenciais, cada uma com duração de uma hora, em soluções com percentual alcoólico crescente de 70%, 80%, 90% e 100%, sendo o último banho repetido por mais uma hora. O procedimento de desidratação é essencial para que as amostras possam ser incluídas em parafina, uma vez que esta não é miscível em água.

Em seguida, as amostras foram diafanizadas em solução composta por álcool 100% e xileno, na proporção de 1:1, por uma hora. Posteriormente, foram realizados três banhos em xileno com duração de uma hora cada. O xileno é utilizado por ser uma substância miscível tanto em álcool quanto na parafina. Posteriormente, os fragmentos dos órgãos foram submetidos a três banhos seqüenciais em parafina, mantidas em estufa a 58 °C, com duração de uma hora cada. Após o último banho, os fragmentos dos órgãos foram emblocados em parafina para que, após o endurecimento desta, o tecido ficasse rígido o suficiente permitindo que fosse seccionado.

Foram feitos cortes semi-seriados de 5µm de espessura utilizando-se micrótomo e, após a distensão em banho-maria (35 °C), as secções foram montadas em lâminas de vidro previamente identificadas. Foram confeccionadas seis lâminas de cada bloco, sendo que, a cada dois lâminas montadas, 10 secções eram descartadas antes da coleta dos próximos cortes. Uma das duas lâminas de cada série de cada bloco foi corada pelo método de hematoxilina/eosina (H/E) para avaliação histopatológica do tecido e a outra foi corada pelo método de Perls (PERLS 1867), para visualização do ferro (endógeno e exógeno).

Para realizar as colorações com hematoxilina/eosina (H/E) ou Perls, as lâminas foram primeiramente submetidas ao processo de desparafinização, por meio de três banhos em xileno, com duração de 30 segundos cada. Posteriormente as lâminas foram submetidas à hidratação gradual, realizada por três banhos em álcool 100% e banhos posteriores em soluções de percentual alcoólico decrescente de 90%, 80% e 70%, sendo que cada banho teve duração de 30 segundos. Para coloração com H/E, as lâminas foram imersas em hematoxilina por 45 segundos, lavadas por aproximadamente três minutos em água corrente e, em seguida, coradas em eosina por 45 segundos e lavadas rapidamente em água corrente. Para a coloração pelo método de Perls, após a hidratação, as lâminas foram inicialmente imersas em água destilada por um minuto e, posteriormente, coradas pela solução de Perls composta por solução de ferrocianeto de potássio 2% e solução de ácido clorídrico a 1%, na proporção de 1:1, por 15 minutos; as lâminas foram lavadas em água destilada por um minuto e contra-coradas com solução de vermelho rápido nuclear por um minuto e, em seguida, lavadas em água destilada por 1 minuto. Após a coloração por qualquer um dos métodos descritos, os materiais foram desidratados em soluções com percentual alcoólico crescente de 70%, 80%, 90% e três banhos de 100% com duração de 30 segundos para cada imersão, no caso das duas colorações. Em seguida, as lâminas foram submetidas a três banhos em xileno, com

duração de 30 segundos cada. Após os procedimentos descritos, as lâminas foram cobertas com lamínulas, utilizando verniz incolor da marca Acrilex para fixação das mesmas, e colocadas para secar em estufa a 37°C por 2 horas.

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz, modelo Oleman, para verificação de alterações teciduais, inflamações e aglomerados de nanopartículas e, também, para comparação da quantidade de ferro por meio da coloração de Perls. Os mesmos foram fotomicrografados utilizando-se câmara fotográfica digital modelo Leica DFC280, acoplada ao microscópio Leica DM 1000, em aumento final de 100× e 400×. As imagens foram capturadas e ajustadas utilizando o programa Suíte Application versão 2.7.0 R1.

3.8– Magnetohipertermia, Equipamentos e Testes

3.8.1 - Equipamento gerador de campo magnético alternado (CMA)

Para avaliar os efeitos biológicos da exposição de animais sadios e portadores do tumor sólido de Ehrlich (TSE) nas etapas dois e três, respectivamente, ao campo magnético alternado, foi usado equipamento portátil (**Equip.I**) gerador de corrente alternada de alta frequência (CMA) desenvolvido no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, conforme descrito por Guedes e colaboradores (2004) (Patente PI0204433-1) (**Fig. 04**). O equipamento possui entrada de energia de 220V, transformador para 12V, gera corrente elétrica de 1A e frequência de 1MHz. Uma bobina composta de espirais de cobre envolve uma haste de ferro doce, promovendo o campo eletromagnético externo. A bobina é sustentada por um suporte por meio do qual pode-se controlar a distância em relação ao animal ou células em estudo.

3.8.2 – Exposição ao CMA

O tempo de exposição dos animais ao CMA foi de três minutos, conforme resultados obtidos anteriormente onde não foram encontrados alta taxa de mortalidade celular em comparação com tempos maiores. (BARBOSA, 2008). O campo foi aplicado 30 minutos após a administração do **FM-PAS-1** ou salina, tempo suficiente para que as nanopartículas de **FM-PAS-1** interagissem com as células peritoneais.



Figura 04 - Equipamento I, unipolar, gerador de campo magnético alternado de alta frequência (1MHz).

Foram realizados os testes de citometria do sangue periférico, de genotoxicidade, de citotoxicidade e histopatológicas, testes já descritos anteriormente, contagem diferencial das células peritoneais e teste de viabilidade celular. Na análise histopatológica foram estudados os mesmos órgãos da etapa um, exceto o coração. Todas as análises foram realizadas em tempos variados após a administração da amostra, conforme especificado em cada experimento. Durante a aplicação e até o dia da coleta, os animais foram observados, sendo anotadas alterações tais como letalidade,

letargia, convulsão, dispnéia e diarreia. Os grupos de controle nessa etapa receberam 100 μ L(ip) da solução normal salina.

3.8.3 - Eletroímã gerador de um campo magnético contínuo (CMC)

Com a finalidade de atrair as nanopartículas magnéticas para o alvo, foi confeccionado um eletroímã gerador de um campo magnético contínuo (CMC) (**Equip.II**). O equipamento II foi fabricado com uma base de solenóide cilíndrico com 18,5mm de diâmetro, 18,5cm de comprimento e 1700 espirais, gerando intensidade máxima de $0,19 \pm 2\%$ Tesla no laboratório do Instituto de Engenharia Elétrica (IEE) da UnB.

3.8.4 – Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar os efeitos da aplicação de **FM-PAS-1** na presença e ausência do campo magnético alternado (CMA) e o efeito do CMA sobre a viabilidade das células do peritônio, foi utilizado teste de exclusão do corante azul de Tripán (0,04%), o qual permite diferenciar as células vivas das mortas. Para a coleta de células, os animais foram previamente anestesiados por éter etílico e, posteriormente, sacrificados por deslocamento cervical. A viabilidade celular foi calculada pelo percentual de células vivas (ou mortas) em relação ao total de células da amostra. Após a morte, foi feita uma incisão no abdômen e 10mL de solução gelada (4 °C) de cloreto de sódio tamponada com fosfato (PBS), pH 7.2, foram injetados no peritônio com auxílio de uma seringa. Após massagem da cavidade peritoneal, 8 mL do lavado peritoneal foram coletados em tubos Falcon e centrifugados por 5 minutos a 5000 x g. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de PBS gelado. A solução foi

homogeneizada e 20 μ L do ressuspendido foram retirados e misturados a 80 μ L de solução de azul de Tripán (0,4%). Aproximadamente 10 μ L da mistura foram colocados em câmara de Neubauer e a contagem foi realizada em microscópio de luz (400 \times), modelo Oleman, utilizando-se dois dos quatro retículos externos.

O corante azul de Tripán apresenta carga negativa e reage com células que apresentam defeitos na membrana, penetrando, portanto, somente nas células mortas (SIGMA-ALDRICH, 2007). As células consideradas viáveis apresentavam coloração amarelo brilhante e as mortas, coloração azul.

A viabilidade celular foi calculada pelo percentual de células viáveis em relação ao total de células da amostra, de acordo com a fórmula:

3.8.5 – Análise diferencial das células peritoneais

A análise citométrica nas células peritoneais foi empregada para verificar a potência de indução e a severidade de eventuais processos inflamatórios provocados após a administração da amostra **FM-PAS-1**, CMA e na combinação dos dois tratamentos. Nos grupos controle, os animais receberam 100 μ L da solução normal salina na presença e ausência do CMA.

Após o sacrifício do animal por deslocamento cervical, foi feita uma incisão na região abdominal para expor a cavidade peritoneal. Uma lâmina de vidro foi delicadamente passada sobre as vísceras para se obter uma fina camada do material. As lâminas secas foram fixadas por cinco minutos em metanol e coradas seguindo a mesma metodologia para coloração diferencial de leucócitos do sangue.

A análise foi realizada em microscópio de luz (1000 \times), modelo Oleman, por meio de teste cego. Foram analisadas 500 células por lâmina para determinar a

freqüência das populações de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos.

3.9 – Ressonâncias Magnética

Para investigar a presença das nanopartículas magnéticas no tumor sólida de Ehrlich, foram realizadas medidas de ressonância em um Espectrômetro de Ressonância. Para realização do procedimento os animais portadores do TSE foram anestesiados com Ketamina 10% (1µL/gr do peso animal) e Xilazina (10% da dose da Ketamina) via intraperitoneal. O eletroímã gerador do CMC foi colocada em cima do tumor e aproximadamente dois milímetros da pele sem pelo. A amostra **FM-PAS-1** (100µL ou 200µL) foi administrada via endovenosa pausadamente e no mesmo tempo o eletroímã foi ligado e permaneceu no local por 60 minutos. Os animais foram sacrificados imediatamente após o tratamento e os tumores foram coletados. Os tumores coletados foram homogeneizados em macerador de vidro, adicionando-se o menor volume possível de solução 0,9% de NaCl em relação ao peso. Os homogeneizados foram colocados em capilares heparinizados para realização das medidas de ressonância magnética.

3.10 - Tumor de Ehrlich

O modelo experimental do Tumor de Ehrlich é bastante vantajoso frente a outros modelos tumorais por não apresentar especificidade diante das diferentes linhagens murinas, ser facilmente transplantável e permitir a utilização de diferentes vias de inoculação para a administração das células tumorais (KLEEB *et al.*, 1997). As células tumorais foram fornecidas pela professora Rosane N. M. Guerra, Laboratório de

Imunofisiologia, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Maranhão, São Luís, Brasil, e utilizadas na indução de tumor sólido de Ehrlich (TSE).

3.10.1 –Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

Para manutenção do TAE no laboratório, uma alíquota de 200 μ L de células tumorais foi inoculada intraperitonealmente em camundongo sadio, com auxílio de seringa de insulina (**Fig. 05**). A cada aproximadamente seis dias, o tempo suficiente para crescimento do tumor ascítico, foram colhidos de animais portadores, 200 μ L do fluido ascítico contendo cerca de 10^8 células tumorais e inoculadas por via intraperitoneal em dois camundongos sadios (receptores), 100 μ L em cada animal. Esse procedimento foi repetido durante todos os experimentos realizados.



Figura 05 – Animal com tumor ascítico de Ehrlich

3.10.2 – Indução do Tumor Sólido de Ehrlich (TSE)

Para obtenção das células tumorais a serem inoculadas para induzir o tumor sólido, os camundongos portadores do TAE foram anestesiados, sacrificados e em seguida esterilizados com álcool 70°. Foi retirado 1 mL do líquido ascítico da cavidade abdominal e diluído 100 vezes com tampão fosfato salina (PBS), pH \approx 7,4. Para obter o número total das células na suspensão, foram feitas contagens das células pelo método de exclusão com azul de Tripán a 0,4%, utilizado na proporção 1:1. Para contagem

utilizou-se uma Câmara de Neubauer, contando as células dos quatro quadrantes externos. O número total de células na suspensão por mL foi calculado por seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ. \text{ total /mL} = (\text{N}^\circ \text{ contado}/4) \times 2 \times 100 \times 10000$$

Onde 100 é a diluição, dois é o fator de diluição e 10000 é referente à profundidade da câmara de Neubauer.

Após o cálculo, era inoculado 100 μ L de fluido ascítico da suspensão contendo 4 $\times 10^6$ células tumorais, subcutaneamente, na região posterior, lombar de cada camundongo (**Fig. 06**).

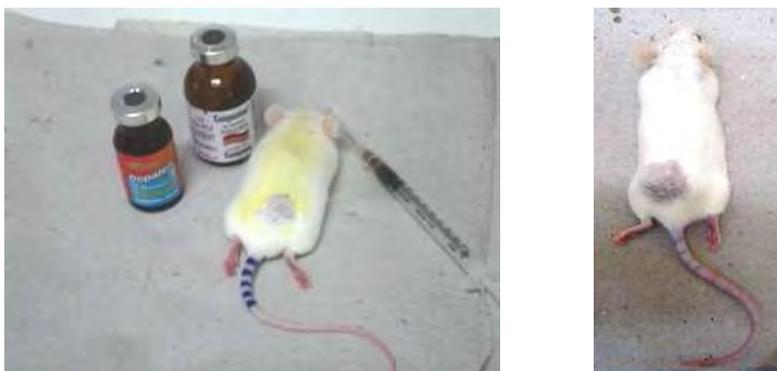


Figura 06 – Animal com tumor sólido de Ehrlich.

3.11 – Tratamento dos animais com TSE

Os experimentos com animais portadores de tumor sólido de Ehrlich (TSE) foram tratados com a amostra **FM-PAS-2**, conforme **figura 06**. Após 10 a 14 dias da inoculação, o TSE apresentava volume variável entre 200 – 500 mm³. Para os tratamentos, foram selecionados os animais com volume de tumor entre 250 – 400mm³. Os animais com TSE foram distribuídos em cinco grupos experimentais e cinco animais por grupos.

Grupo 1: Controle-ST: Animais sadios sem qualquer tipo de tratamento (ST) foram sacrificados entre três e trinta dias de tratamentos.

Grupo 2: Controle-TSE: Animais com tumor sólido tratados com 100 μ L de solução salina intratumoralmente, sacrificados três e sete dias após o tratamento. Nenhum animal sobreviveu até trinta dias.

Grupo 3: Tratado TSE+FM: Animais com TSE tratados com 100 μ L de **FM-PAS-2**, via intratumoral, e sacrificados três, sete e trinta dias após o tratamento.

Grupo 4: Tratado TSE+CMA: Animais com tumor sólido (TSE) expostos ao CMA, no local do tumor, por 30 minutos e sacrificados três, sete e trinta dias após a exposição ao campo.

Grupo 5: Tratado TSE+FM+CMA: Animais com TSE tratados com dose única de 100 μ L de **FM-PAS-2**, intratumoral, e submetidos ao campo magnético alternado (CMA) uma vez ou três vezes durante três dias subsequentes e sacrificados três, sete e trinta dias após o tratamento.

Todos os grupos experimentais foram observados clinicamente ao longo de todo o experimento e foram anotados aspectos clínicos tais como comportamento, apetite, tamanho do tumor, condição de locomoção do animal. Para a análise histopatológica foram coletados os órgãos, fígado, baço e pulmões e tumores.

3.12- Análise Histopatológica de animais com TSE

Os efeitos biológicos e patológicos da amostra **FM-PAS-2**, CMA e a combinação dos dois tratamentos no tumor e nos órgãos como fígado, baço e pulmões, foram avaliados por meio de análise histopatológica ao microscópio de luz. Após a coleta, os fragmentos dos órgãos foram fixados no fixador de Davidson conforme descrito anteriormente no item 3.7. Os processos de desidratação até o segundo banho

de parafina, foram realizados utilizando o aparelho histotécnico, processador automático de tecidos para histologia OMA, modelo DM4, e a inclusão dos fragmentos nos blocos de parafina foi realizada manualmente.

Os fragmentos do tumor foram fixados em fixador Carnoy por três horas. O fixador Carnoy é composto por 60mL de álcool absoluto, 30mL de clorofórmio e 10 mL de ácido acético glacial preparado minutos antes de utilização. Para obter os cortes do tumor sólido os fragmentos foram desidratados em um banho de álcool 100% por 40 minutos e um banho de álcool/xileno na proporção 1:1, também por 40 minutos. Posteriormente, foram realizados dois banhos em xileno com duração de 40 minutos cada e em seguida dois banhos em parafina com tempo de uma hora cada e temperatura entre 57^{0C} a 60^{0C} e emblocamento dos órgãos.

As lâminas dos órgãos e dos tumores foram preparadas com cortes de cerca de 5µm de espessura. Foram confeccionadas nove lâminas de cada bloco, sendo que, a cada três lâminas montadas, 18 secções eram descartadas antes da coleta dos próximos cortes. Uma das lâminas de cada série de cada bloco foi corada pelo método de hematoxilina/eosina (H/E) para avaliação histopatológica dos tecidos, outra foi corada pelo método de Perls, para visualização do ferro (endógeno e exógeno) e a terceira foi corada pelo método de AgNOR para avaliar os efeitos da amostra **FM-PAS-2** e/ou CMA sobre agressividade do tumor.

3.13 – Análise de agressividade do TSE por teste de AgNOR

A proliferação celular no TSE foi avaliada neste trabalho com metodologia de Ploton e colaboradores (1986) conhecida como AgNOR, ligeiramente modificada. As lâminas foram primeiramente submetidas ao processo de desparafinização, por meio de três banhos em xileno, com duração de 30 segundos cada. Posteriormente as lâminas

foram submetidas à hidratação gradual, realizada por três banhos em álcool 100% e banhos posteriores em soluções de percentual alcoólico decrescente de 90%, 80% e 70%, sendo que cada banho teve duração de 30 segundos e um banho de um minuto em água destilada. As lâminas foram colocadas numa grade de vidro, lado a lado, em cima de uma bandeja grande e profunda. Imediatamente, em um recipiente de vidro o corante AgNOR (Sol. A) foi misturado com a solução de gelatina e ácido fórmico (Sol. B), em proporção 2:1, obtendo uma solução transparente de cor azul (Sol. C), conforme detalhado no quadro a seguir. Posteriormente, com auxílio de uma pipeta Pasteur as lâminas foram cobertas com a solução C e mantidas por 20 minutos para efetuar a coloração. Neste momento, a cor da solução se torna marrom por causa da oxidação do nitrato de prata. Em seguida após remover o corante, as lâminas foram lavadas com água destilada por dois minutos e passadas por um processo de desidratação em soluções com percentual alcoólico crescente de 70%, 80%, 90% e três banhos de 100% com duração de 30 segundos para cada imersão. Em seguida, as lâminas foram submetidas a três banhos em xileno, com duração de 30 segundos cada. Após os procedimentos descritos, as lâminas foram cobertas com lamínulas, utilizando verniz incolor da marca Acrilex para fixação das mesmas, e colocadas para secar em estufa a 37°C por duas horas.

Para determinar o grau de proliferação celular e conseqüentemente a agressividade do tumor sólido de Ehrlich foi realizada a contagem do número de NOR, visualizadas na microscopia de luz com aumento de 1000× como estruturas redondas intranucleares de cor marrom-café, em 100 células nas regiões diferentes dos cortes tumorais em cada lâmina.

Corante AgNOR

O corante AgNOR é composto de duas soluções (TRERÉ, 2000):

Solução A: Nitrato de prata 50%

<i>Nitrato de prata</i>	<i>50g</i>
<i>Água Nanopura</i>	<i>100mL</i>

Solução B: Gelatina (para uso microbiológico)+ ácido fórmico

<i>Gelatina</i>	<i>2g</i>
<i>Ácido fórmico</i>	<i>1,17mL</i>
<i>Água Nanopura</i>	<i>98,83</i>

Observações: *As soluções A e B podem ser preparadas e estocadas em potes de vidros e guardadas na temperatura ambiente; o consumo do nitrato de prata é alto, para evitar a desperdício, a solução A pode ser preparada calculando o total número de lâminas a serem coradas (aproximadamente 1,5mL para cada lâmina); é importante que as duas soluções foram misturadas pouco antes de colocar nas lâminas em proporção, A:B = 2:1.*

3.14 – Avaliação da proliferação celular no TSE por teste de índice mitótico

(IM)

O índice mitótico é uma forma de avaliar o índice de proliferação celular do tumor. Foi determinado neste trabalho pela contagem de células na fase mitótica (metáfase ou anáfase) no tecido tumoral em 1000 células contadas.

$$\text{IM} = \text{N}^\circ \text{ de células em mitose} / \text{N}^\circ \text{ total de células}$$

3.15 – Avaliação do volume tumoral e peso do animal

Para avaliar os efeitos dos tratamentos e determinar possível relação entre tamanho do tumor e grau de agressividade foram registrados o tamanho do tumor, o peso do animal no dia de tratamento e da coleta. Após obtenção das medidas do tumor com o uso de um paquímetro (**Fig.07**), o volume do tumor foi calculado pela fórmula (SHINKAI *et al.* 1999)

$$\text{Volume} = 0.5 \times D \times d^2 \text{mm}^3$$

Onde D é o maior diâmetro do tumor e d, a menor espessura do tumor.



Figura 07 – Paquímetro digital (Digimess) usado para avaliar o tamanho do TSE.

3.16 - Análise Estatística

Etapa 1 – Na análise citométrica, a diferença significativa dos parâmetros testados entre grupos foi analisada pelo método de análise de variância (ANOVA), empregando o teste “Fisher’s PLSD”, com nível de significância em 5% ($p < 0,05$).

Etapa 1 - Para determinar se os dados da análise de micronúcleos revelam citotoxicidade e mutagenicidade, foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney que se aplica a amostras pequenas (n) e independentes, correlacionando-as duas a duas. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5 % ($p < 0,05$).

Etapas 2 e 3 - As análises estatísticas dos dados obtidos nos estudos citométricos no sangue periférico e células peritoneais e na avaliação da viabilidade das células peritoneais, foram realizadas, usando o software SPSS, versão 15. Para que o teste ANOVA para análise de variância possa ser utilizado, os dados têm que apresentar distribuição normal e variâncias homogêneas. Assim, os resultados encontrados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar se apresentavam distribuição normal, e ao teste de Levene, para verificar a homogeneidade das variâncias dos mesmos, ao nível de significância de 5%. Os dados que não se enquadravam nesses requisitos, isto é, apresentavam $p < 0,05$, foram transformados para \log_{10} para satisfazer as pré-suposições da ANOVA.

O teste de análise de variância simples (One-way ANOVA) foi utilizado para verificar a ocorrência de grupos diferentes estatisticamente e o teste post-hoc de Turkey foi aplicado para identificar quais grupos eram estatisticamente diferentes. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Etapa 3 - A análise estatística empregada para o teste AgNOR e o índice mitótico iniciou com os testes de Shapiro-Wilk e o teste de Levene, como descrito no item anterior. O teste de análise de variância simples (One-way ANOVA) foi utilizado para verificar a ocorrência de grupos diferentes estatisticamente e o teste post-hoc de Duncan foi aplicado para identificar quais grupos eram estatisticamente diferentes. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 - Caracterização das nanopartículas magnéticas

Os dados relacionados aos diâmetros das nanopartículas magnéticas estão mostrados nas **figuras 08 a 11**. Os diâmetros das partículas de magnetita presentes nas amostras **FM-PAS-1 e FM-PAS-2** foram determinados por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), como ilustrados nas **figuras 08 e 10**. A distribuição lognormal dos diâmetros mostrou que as nanopartículas magnéticas da amostra **FM-PAS-1** possuem um diâmetro médio de 7,84 nm com erro de 0,08 e dispersão de 0,28 com erro de 0,01 (**Fig. 09**), enquanto o da **FM-PAS-2** é 7,9 nm diâmetro das nanopartículas com erro de 0,1 e a dispersão de 0,29 com erro de 0,02 (**Fig. 11**).

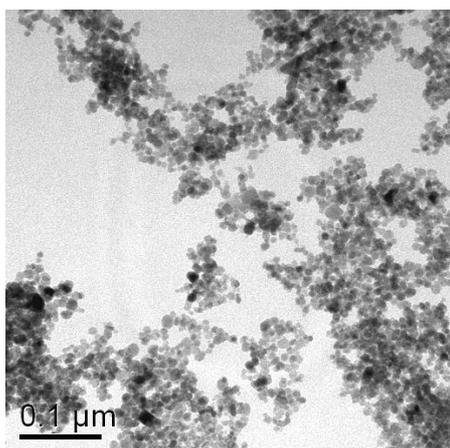


Figura 08: Fotomicrografias eletrônica mostrando nanopartículas magnéticas da amostra FM-PAS-1.

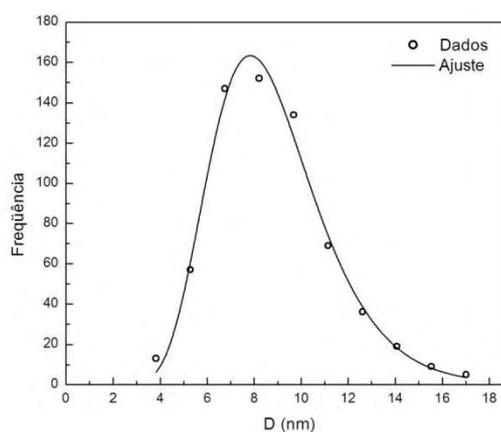


Figura 09: Histograma dos diâmetros das NPM obtidos por MET da amostra FM-PAS-1. A linha contínua representa o melhor ajuste dos dados.

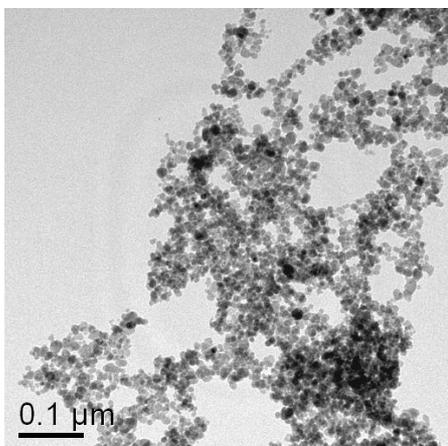


Figura - 10: Fotomicrografia eletrônica mostrando nanopartículas magnéticas da amostra FM-PAS-2.

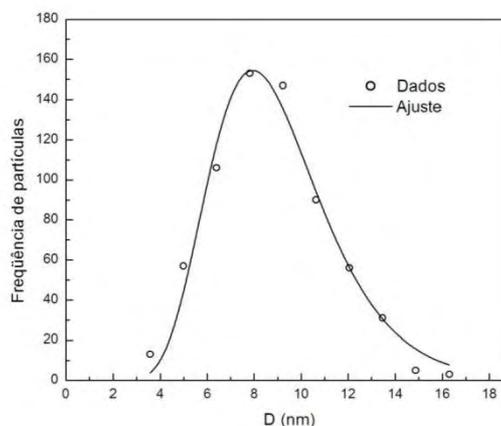


Figura - 11: Histograma dos diâmetros das NPM obtidos por MET da amostra FM-PAS-2. A linha contínua representa o melhor ajuste dos dados.

4.2 - Resultados da Etapa 1

4.2.1 - Contagem global e diferencial do sangue periférico

Esta análise foi empregada para avaliar se a amostra magnética induzia processos inflamatórios e envolveu a contagem global e diferencial (linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos) de leucócitos do sangue periférico em tempos variados após injeção de 100 µL de **FM-PAS-1**, por via endovenosa, na ausência do CMA.

As **Figuras 12 e 13** apresentam os efeitos de **FM-PAS-1** na contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico. Os resultados mostram diminuição significativa dos leucócitos totais, em relação ao grupo de controle, 12 horas e um dia após o tratamento (**Fig. 12**).

Nos mesmos tempos (12 e 24 h), a contagem diferencial mostrou diminuição significativa na população de linfócitos e aumento na população de neutrófilos. A contagem mostrou ainda aumento nos monócitos trinta minutos após o tratamento (**Fig. 13**).

4.2.2 - Análise de Genotoxicidade e Citotoxicidade

Para as análises genotóxica e citotóxica foi empregado o teste de micronúcleo em eritrócitos de medula óssea. O teste foi realizado um, dois e sete dias após a injeção de 100 µL da amostra **FM-PAS-1** ($1,16 \times 10^{16}$ partículas/mL).

Os resultados da primeira etapa em que a amostra **FM-PAS-1** foi administrada endovenosamente mostraram diminuição significativa na frequência de Mn em PCE em todos os tempos experimentais e em NCE, 7 dias após a administração (**Fig. 14**). Por

outro lado, os resultados apresentaram citotoxicidade significativa 12h, um e dois dias após o tratamento revelada pela diminuição da porcentagem de PCE. Este valor não é mais estatisticamente diferente do controle sete dias após o tratamento (**Fig. 15**).

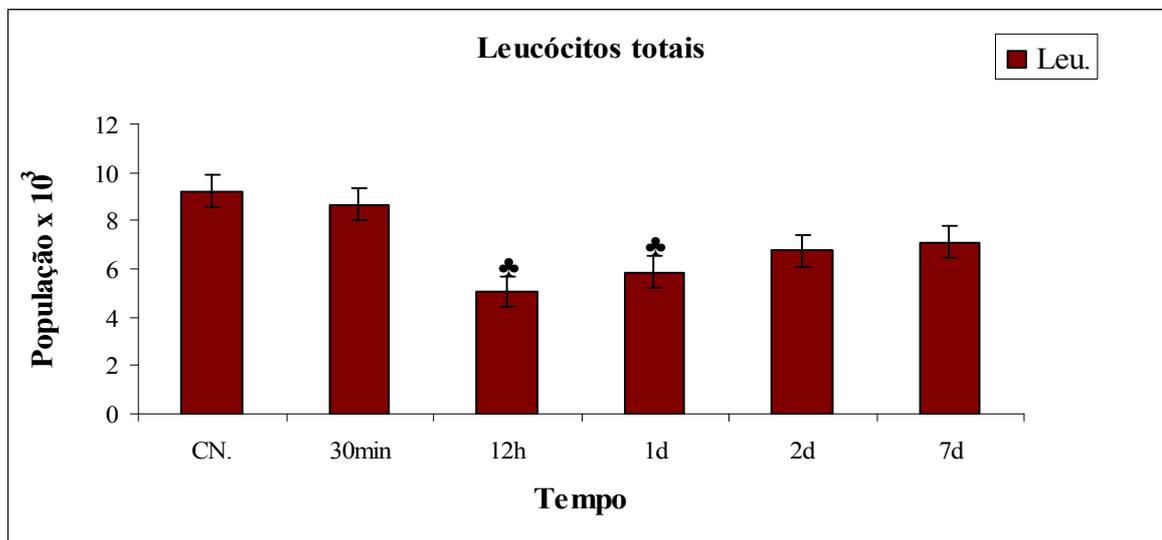


Figura 12 - Efeito da administração endovenosa de 100 μ L do FM-PAS-1 na contagem global dos leucócitos do sangue periférico. Leu = Leucócitos, CN= Controle Negativo. ♣ aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

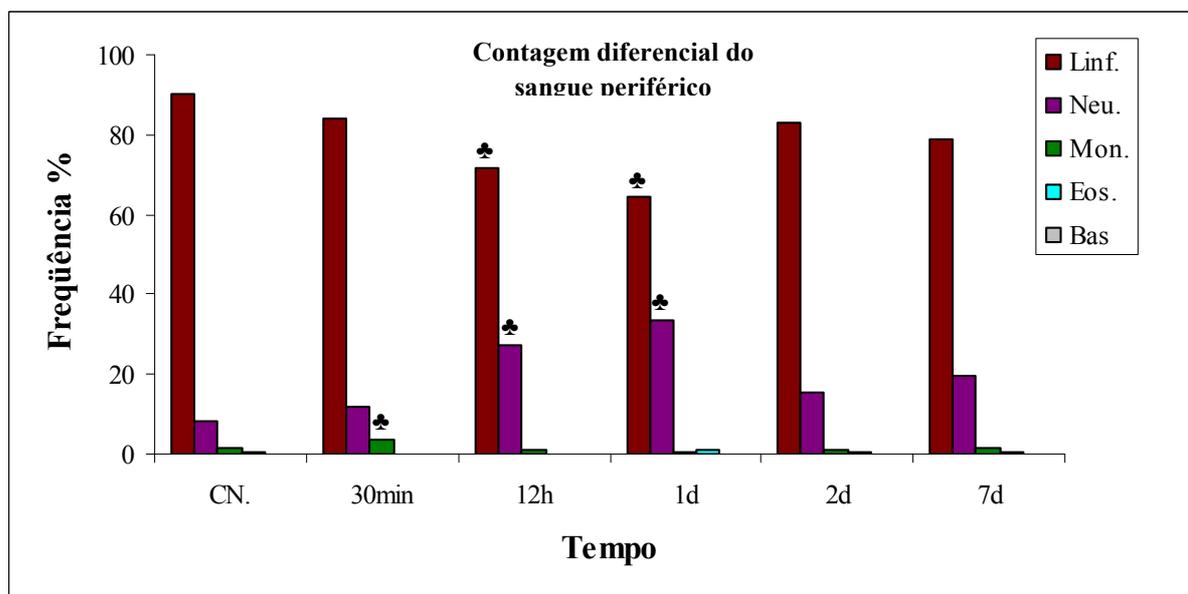


Figura 13 - Efeito da administração endovenosa de 100 μ L do FM-PAS-1 na contagem diferencial de leucócitos do sangue periférico. Lin = Linfócitos, Neu = Neutrófilos, Mon = Monócitos, Eos = Eosinófilos, Bas.= Basófilos, CN= Controle Negativo. ♣ aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

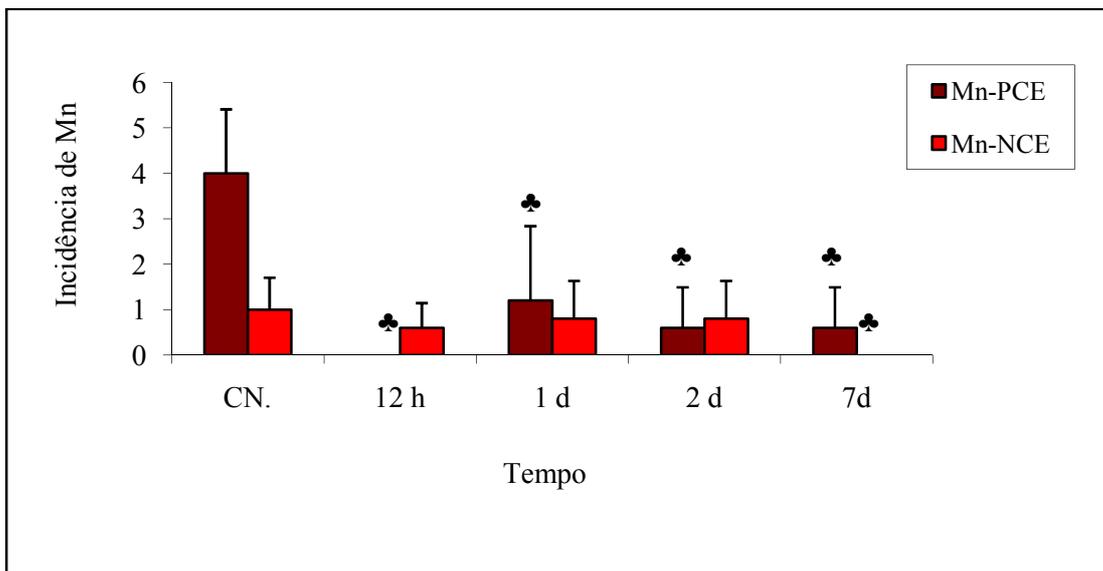


Figura 14 – Efeito da administração endovenosa de 100 μ L da amostra FM-PAS-1 sobre a frequência de micronúcleos em 2000 células PCE e NCE analisadas. Mn = Micronúcleo, PCE = Eritrócitos Policromáticos, NCE = Eritrócitos Normocromáticos, CN = Controle Negativo, ♣ aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

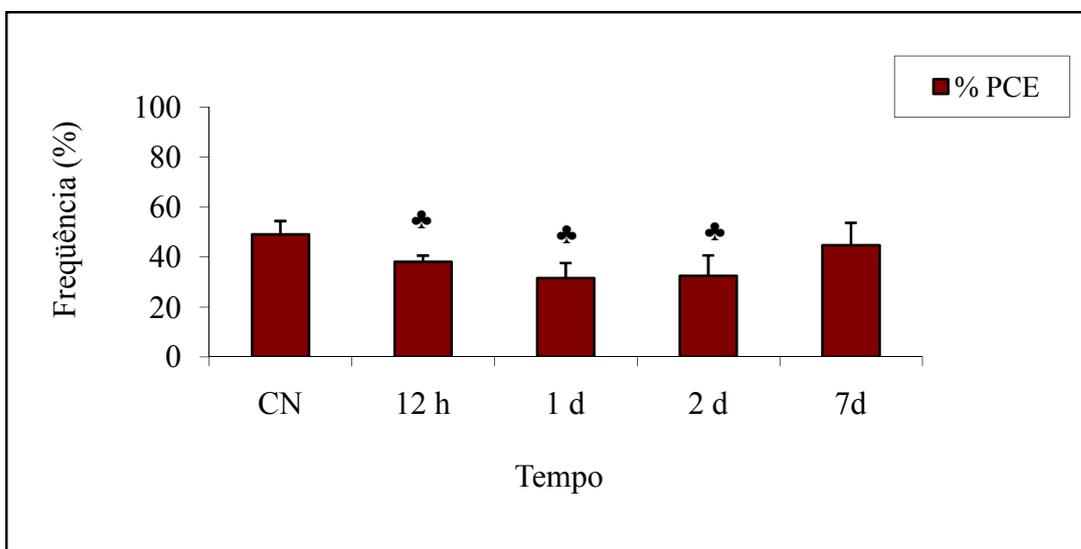


Figura 15 - Efeito da administração endovenosa de 100 μ L da amostra FM-PAS-1 sobre a porcentagem de eritrócitos policromáticos. CN = Controle Negativo, % PCE = porcentagem de PCE. ♣ aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.2.3 - Análise Histopatológica

Os efeitos histopatológicos da amostra **FM-PAS-1** administrada endovenosamente foram analisados nos tempos de trinta minutos, doze horas, um, dois e sete dias. Na secção obtida do animal controle foi observada arquitetura habitual detectada em fígado, (**Fig 16a**). Já no fígado de camundongo em que foram injetados, endovenosamente, 100 uL de FM-PAS, observa-se a presença, em vários locais, especialmente nos sinusóides, de material de pigmento de cor marrom, sugestivo do acúmulo das nanopartículas injetadas e hemossiderina. Tal situação ainda persistia decorridas 12 horas da injeção, sendo que, nos tempos de um dia e sete dias não foram detectados quaisquer sinais de lesão hepática, seja hemorrágica, fibrótica ou necrótica (**Fig. 16b e 16c**). No que se refere ao baço (**Fig. 16d a 16f**), pode-se observar, principalmente em áreas de polpa vermelha, tanto no primeiro dia (**Fig. 16e**), quanto no 7º (**Fig. 16f**), a presença de material com as características descritas para fígado, podendo se tratar de parte das nanopartículas injetadas. Observa-se, em duas secções de baço apresentadas, a presença de numerosos megacariócitos (**setas amarelas**).

Pulmões de camundongos injetados de **FM-PAS-1** demonstraram, tanto aos 30 minutos como aos sete dias da injeção a normalidade dos aspectos histológicos, exceto pela presença de prováveis partículas magnéticas na parede de alguns alvéolos, apontados pelas setas (**Fig. 17a a 17c**). Ressalta-se, assim, a ausência de processos patológicos de qualquer espécie nos períodos avaliados. Quanto ao coração (**Fig. 17d a 17f**), também foi observada a presença de **FM-PAS-1** em algumas fibras cardíacas, mais numerosas e evidentes no primeiro dia da injeção (**Fig. 17e**). No 7º dia, destacaram-se raros pontos onde o fluido provavelmente ocorria (**Fig. 17f**). Nas secções de coração citadas não houve, aparentemente, qualquer alteração morfológica.

Nas **Figuras 18a a 18c** podem ser vistas secções de pâncreas de animais injetados, endovenosamente, com **FM-PAS-1** no 1º e 7º dia da injeção. Em **figura 18a** pode ser visto, no animal controle, o parênquima pancreático com as características usuais, com áreas de ácinos serosos (pâncreas exócrino) e com ilhotas pancreáticas (pâncreas endócrino, cabeça da seta). No primeiro dia podem ser vistos ocasionais ocorrências de nanopartículas, detectadas pelo método de Pearls (**Fig.18b**). Tais partículas não foram vistas no interior do parênquima e sim em áreas percorridas por septos conjuntivos e vascularizadas. No 7º dia tal presença foi minimamente confirmada evidenciando-se, contudo, bem menos pronunciada em relação ao primeiro. Também foram analisados os rins de camundongos injetados de **FM-PAS-1**, onde se evidenciou a presença de áreas com material de coloração marrom, típica de partículas de fluido magnético (**Fig. 18e a 18f**). Tais áreas não foram abundantes e o acúmulo das partículas foi visto no interstício de túbulos renais (**Fig. 18e**) ou na medula, junto a segmentos dos túbulos uriníferos (**Fig. 18f**). Nenhuma alteração histológica significativa foi detectada nos outros períodos de tratamento.

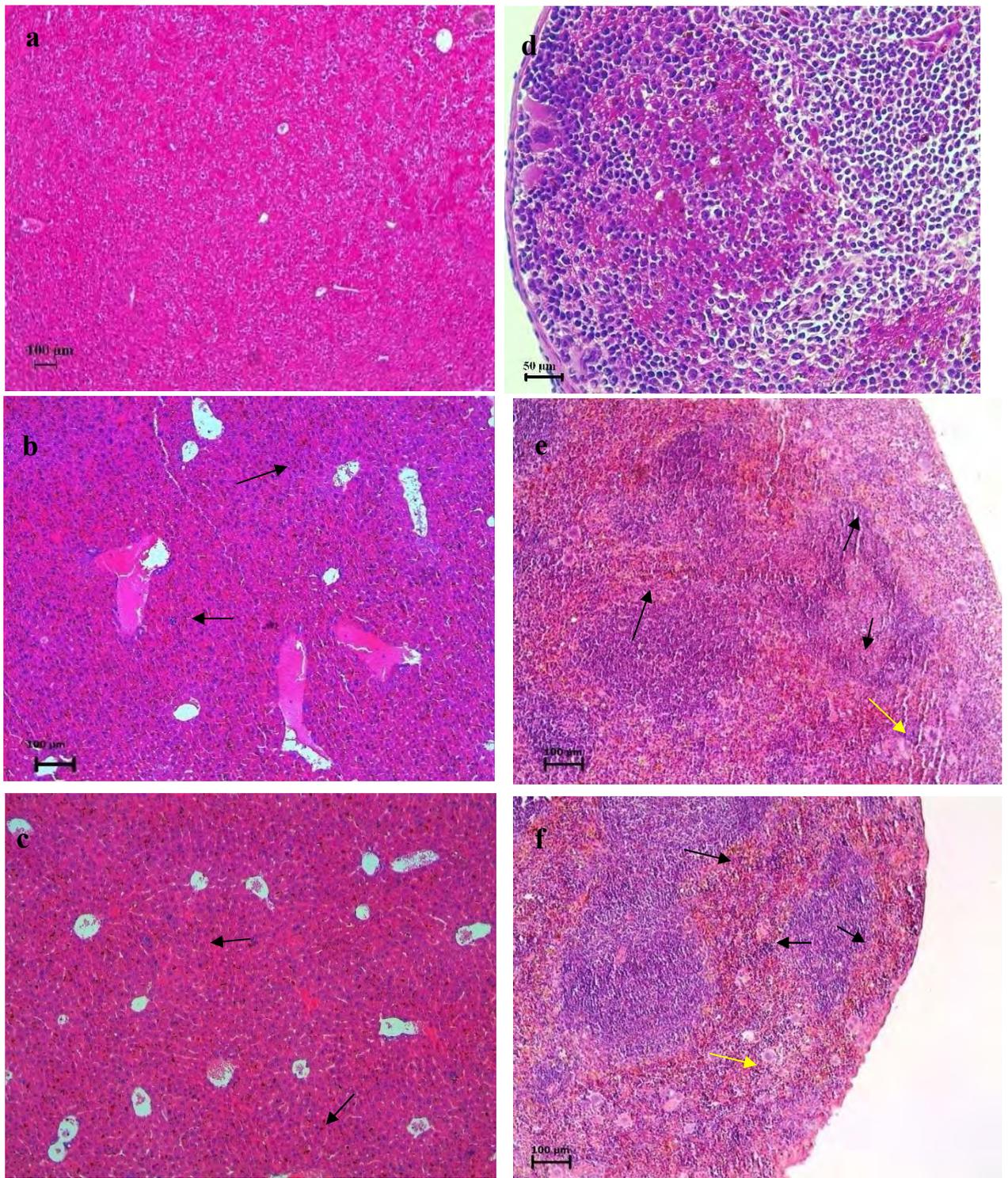


Figura 16 – Fotomicrografias de **fígado (Fi)** e **baço (Ba)** dos camundongos controle e tratados com 100 μ L, FM-PAS-1, endovenosamente. a = Fi-controle (H/E - 100 \times), b = Fi-tratado-30 min (H/E - 100 \times), c = Fi-tratado-12h (H/E - 100 \times); d = Ba-controle (H/E - 400 \times), e = Ba-tratado-1d (H/E - 100 \times), f = Ba-tratado-7d (H/E - 100 \times). Setas apontam aglomerados das nanopartículas, setas amarelas apontam megacariócitos.

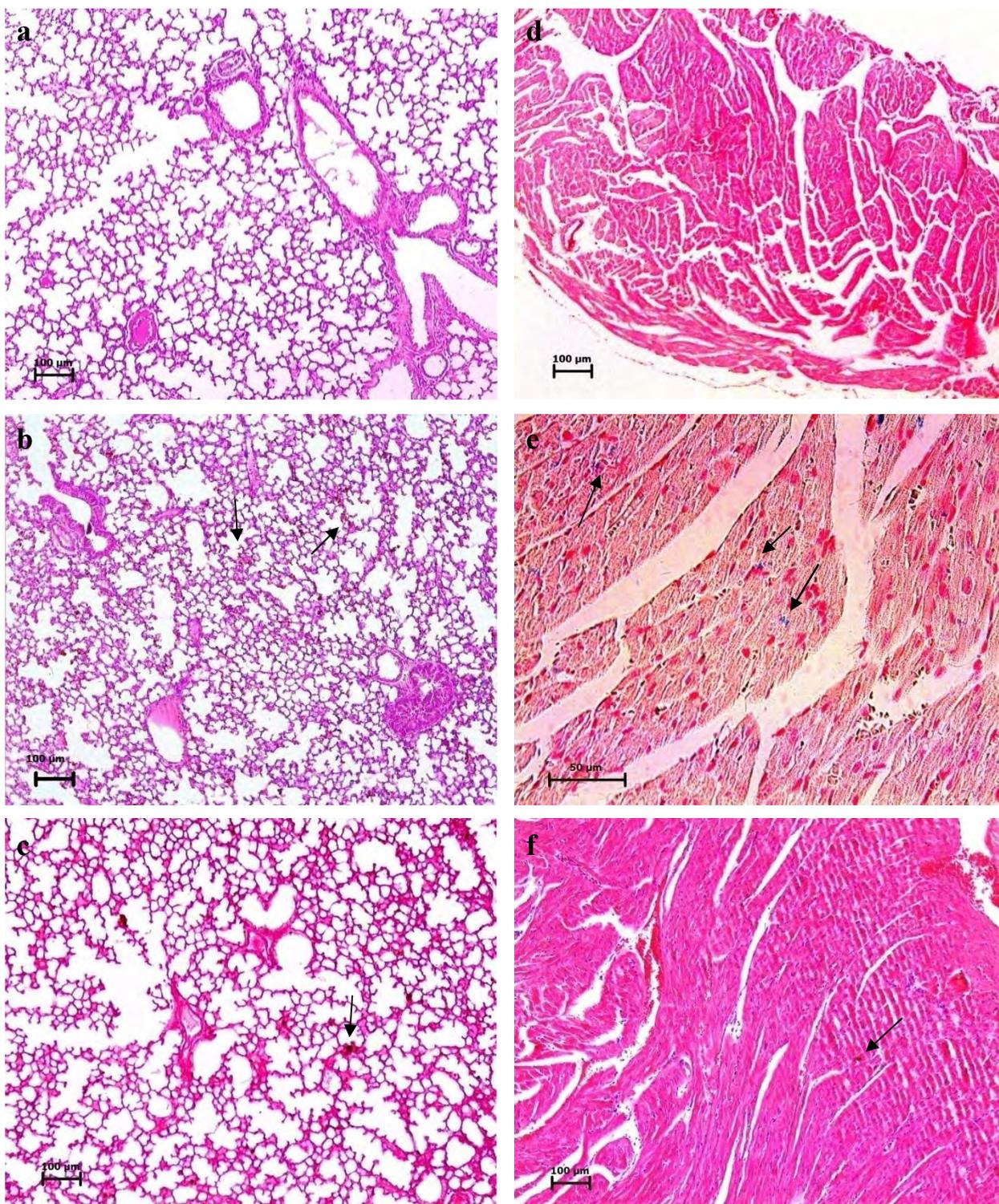


Figura 17 – Fotomicrografias de **pulmão** (Pu) e **coração** (Co) dos camundongos controle e tratados com 100 μ L, FM-PAS-1, endovenosamente. a = Pu-controle (H/E - 100 \times), b = Pu -tratado-30 min (H/E - 100 \times), c = Pu -tratado-7d (H/E - 100 \times); d = Co-controle (H/E - 100 \times), e = Co -tratado-1d (Perls - 100 \times), f = Co -tratado-7d (H/E - 100 \times). Setas apontam aglomerados das nanopartículas.

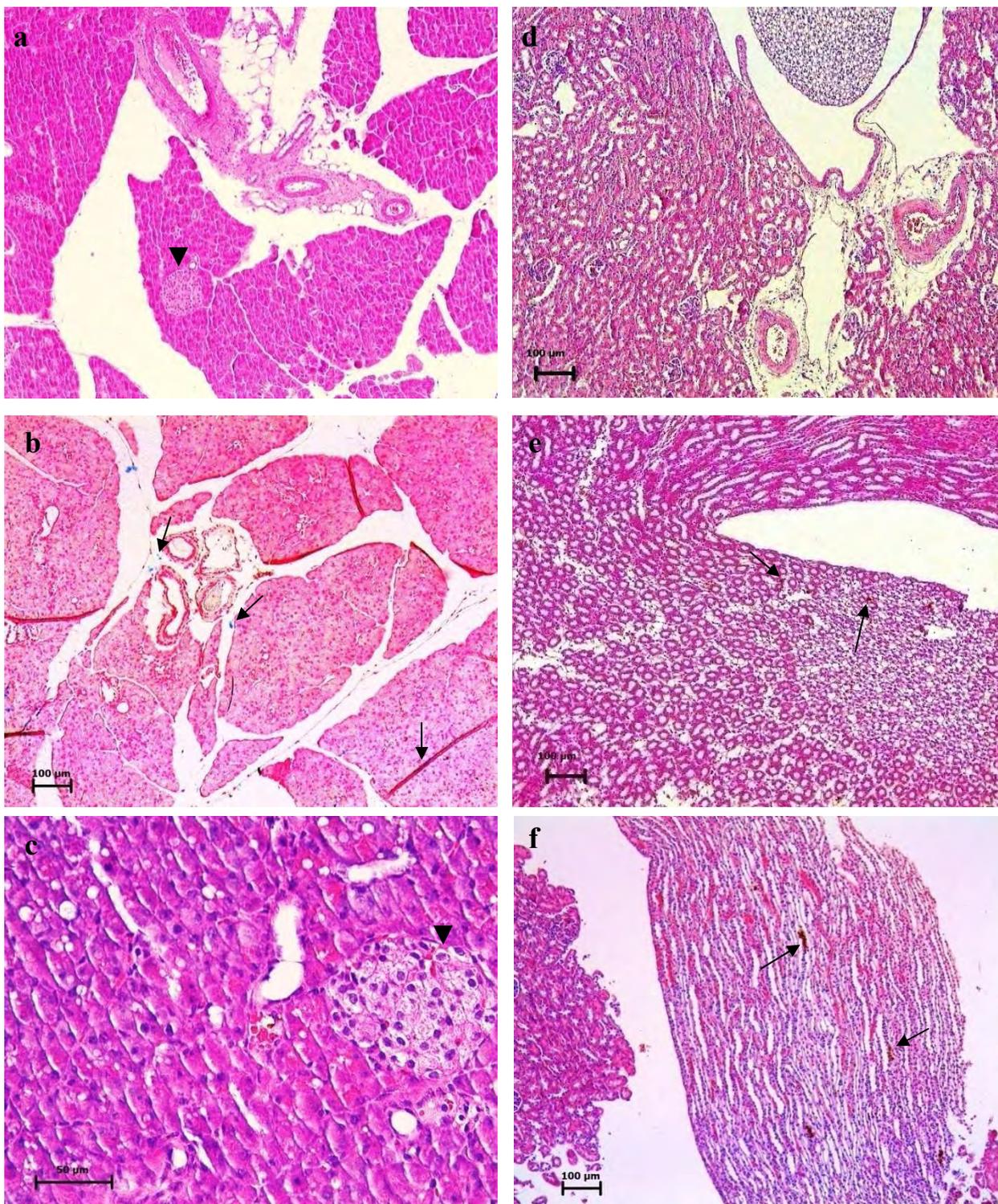


Figura 18 – Fotomicrografias de **pâncreas** (Pâ) e **rim** (Ri) dos camundongos controle e tratados com 100 μ L, FM-PAS-1, endovenosamente. a = Pâ-controle (H/E - 100 \times), b = Pâ -tratado-1d (Perls - 100 \times), c = Pâ - tratado-7d (H/E - 400 \times); d = Ri-controle (H/E - 100 \times), e = Ri -tratado-12h (H/E - 400 \times), f = Ri -tratado-7d (H/E - 100 \times). Setas apontam aglomerados das nanopartículas, cabeça da seta aponta ilhota pancreática.

4.3 - Resultados da Etapa 2

4.3.1 – Análise da viabilidade celular

Um método eficaz para avaliar a toxicidade de amostra magnética é a quantificação de células peritoneais vivas e mortas. As **Figuras 19** e **20** mostram a frequência de células vivas e mortas observadas no intervalo de tempo que abrangia de trinta minutos até 7 dias após tratamento intraperitoneal com **FM-PAS-1** na presença ou ausência do CMA. Pode-se observar que a amostra **FM-PAS-1** induziu aumento significativo do número de células vivas em relação ao seu grupo controle nos tempos de trinta minutos e 6 horas e diminuição significativa sete dias após a administração do FM. Estas alterações foram acompanhadas respectivamente por diminuição de células mortas até 6 horas e aumento destas células no sétimo dia após o tratamento (**Fig. 19**). O tratamento com a amostra **FM-PAS-1** na presença do campo magnético alternado (CMA) causou as mesmas alterações observadas na ausência de CMA, acrescidas de diminuição das células vivas e respectivo aumento de células mortas, 24 horas após o tratamento (**Fig. 20**).

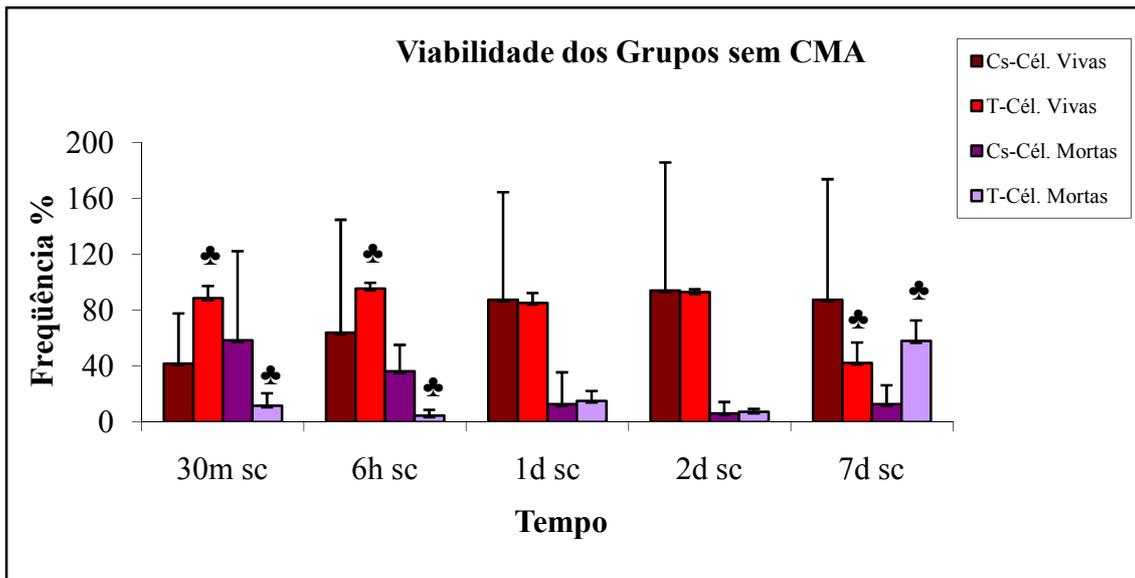


Figura 19 - Efeito do FM-PAS-1 sobre a viabilidade das células peritoneais na ausência de CMA. Cs = Controle salina, T = Tratado com FM-PAS-1, SC = Sem CMA, m = minutos. ♣ aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

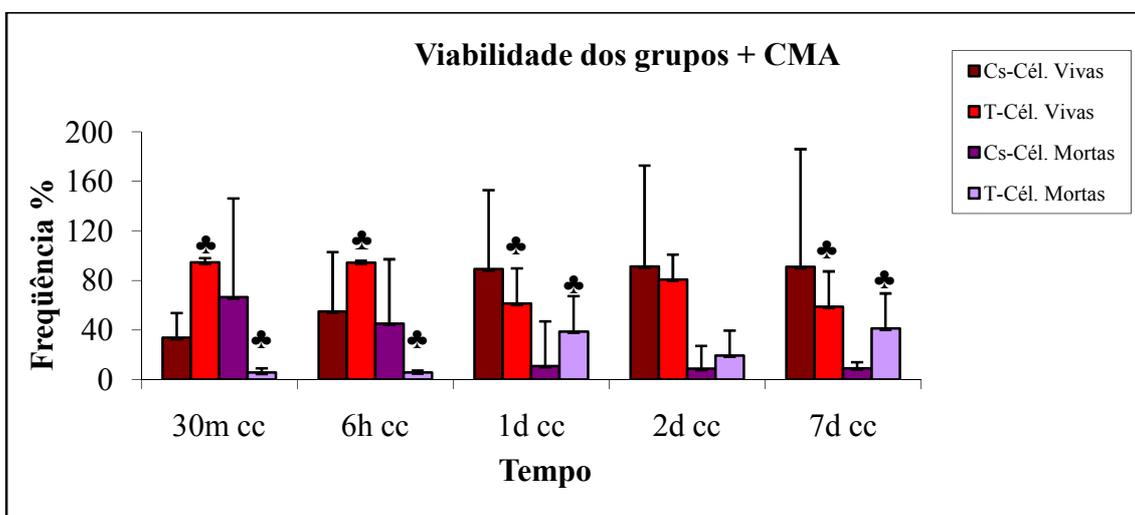


Figura 20 - Efeito do FM-PAS-1 sobre a viabilidade das células peritoneais na presença de CMA. Cs = Controle salina, T = Tratado com FM-PAS-1, CC = Com CMA, m = minutos. ♣ aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.3.2 - Análise de Genotoxicidade e Citotoxicidade

Os efeitos genotóxicos da administração intraperitoneal (ip) da amostra **FM-PAS-1** e da exposição ao CMA por três minutos, 30 minutos após a aplicação da amostra foram avaliados pelo teste de micronúcleo (Mn). Os resultados mostraram aumento da frequência de MN em PCE 24 horas e em NCE dois dias após o tratamento (**Fig. 21**). Por outro lado, o tratamento não apresentou qualquer efeito citotóxico (**Fig.**

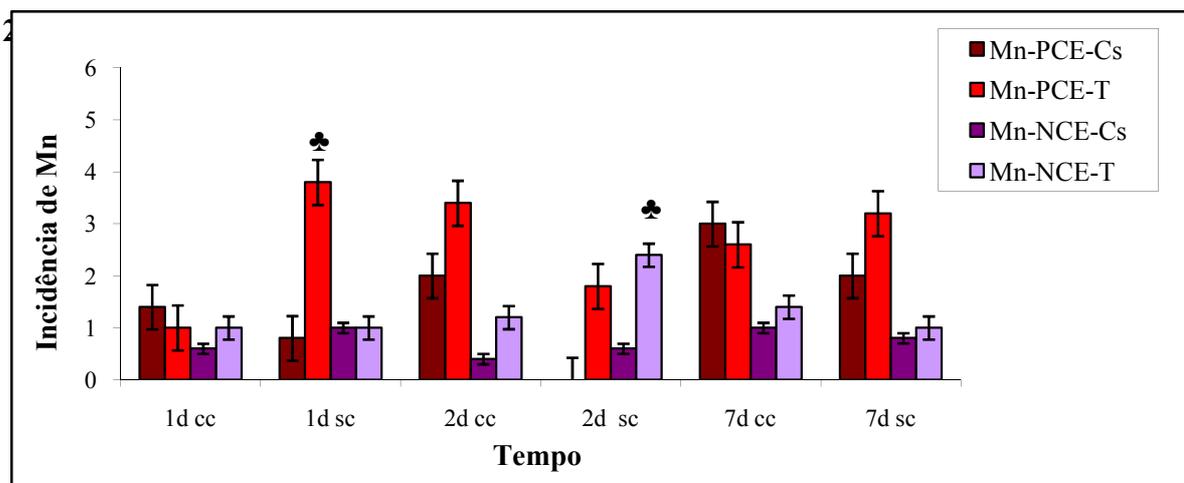


Figura 21 - Efeito da administração intraperitoneal de 100µL da amostra FM-PAS-1 e exposição ao CMA sobre a frequência de micronúcleos em 2000 células PCE e NCE analisadas. Mn = Micronúcleo, PCE = Eritrócitos Policromáticos, NCE = Eritrócitos Normocromáticos Cs = Controle salina, T = Tratado com FM-PAS-1, CC = Com CMA, SC = Sem CMA. ♣ aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao seu controle ($p < 0,05$).

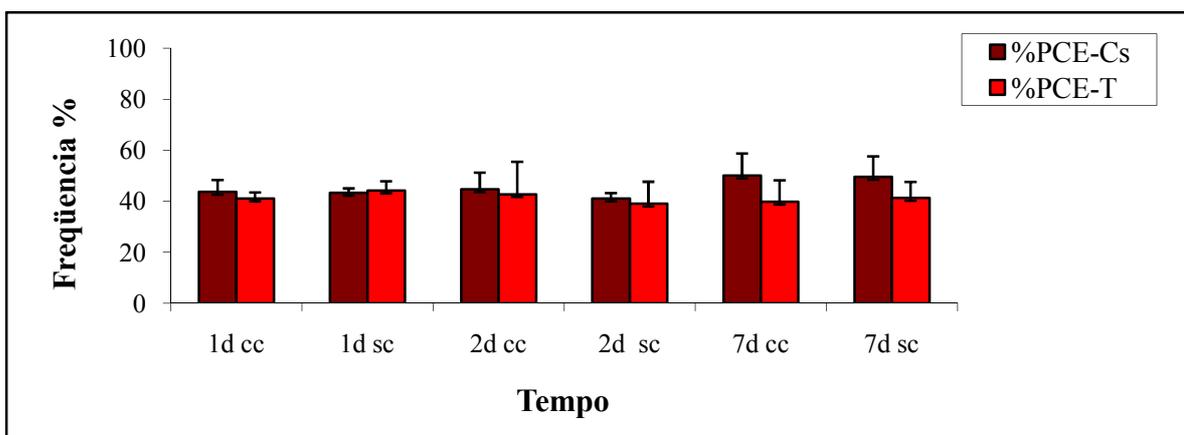


Figura 22 - Efeito da administração intraperitoneal de 100µL da amostra FM-PAS-1 e exposição ao CMA sobre a porcentagem de eritrócitos policromáticos. % PCE = porcentagem de PCE, Cs = Controle salina, T = Tratado com FM-PAS-1, CC = Com CMA, SC = Sem CMA. ♣ aponta diferenças estatisticamente significativas em relação ao seu controle ($p < 0,05$).

4.3.3 - Contagem global e diferencial das células do sangue periférico

Os efeitos da administração intraperitoneal de **FM-PAS-1** na contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico estão mostrados nas **Figuras 23 a 25**. O tratamento não induziu diferença estatisticamente significativa em relação aos valores do grupo controle salina na contagem global de leucócitos do sangue (**Fig. 23**). Por outro lado, a contagem diferencial nos grupos tratados (ip) com **FM-PAS-1** mostrou diminuição nos linfócitos seis horas, um e dois dias após o tratamento. Além dessa alteração, a população dos neutrófilos aumentou e a de monócitos diminuiu seis horas após o tratamento (**Fig. 24**). A **Figura 25** mostra os efeitos da administração intraperitoneal da amostra FM-PAS-1 seguida de exposição ao CMA. Comparados com os resultados da **Figura 24** (sem CMA) constata-se que a única alteração significativa que continuou acontecendo é a diminuição da população dos neutrófilos no sangue, seis horas após o tratamento. As populações de basófilos e eosinófilos não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles.

4.3.4 - Contagem global e diferencial das células peritoneais

As **Figuras 26 e 27** apresentam os efeitos da administração da amostra **FM-PAS-1** sobre células peritoneais, respectivamente na ausência e presença do CMA. Na ausência do CMA não houve nenhuma diferença significativa na população dos linfócitos em todos os tempos de tratamentos, como mostra a **Fig. 26**. Na mesma figura, pode-se ver que a população de macrófagos apresentou aumento trinta minutos e seis horas e diminuição dois dias após o tratamento em relação aos seus respectivos controles.

A população de neutrófilos apresentou diminuição significativa trinta minutos e seis horas após o tratamento. Os mastócitos diminuíram nos tempos de trinta minutos e um dia e os eosinófilos apresentaram aumento significativo um e dois dias após o tratamento com a amostra **FM-PAS-1**. Sete dias após o tratamento, as frequências dos diferentes tipos celulares não mais diferiam das encontradas nos controles. A **Figura 27** mostra resultados relacionados às contagens diferenciais das células peritoneais tratadas com **FM-PAS-1** na presença do CMA. Trinta minutos após o tratamento e exposição ao CMA houve um aumento significativo na população dos linfócitos e, no mesmo tempo, diminuição nos neutrófilos. Em dois dias a população dos mastócitos diminuiu e a de eosinófilos aumentou. Como observado na ausência do CMA, sete dias após o tratamento, as frequências dos diferentes tipos celulares não mais diferiam das encontradas nos controles.

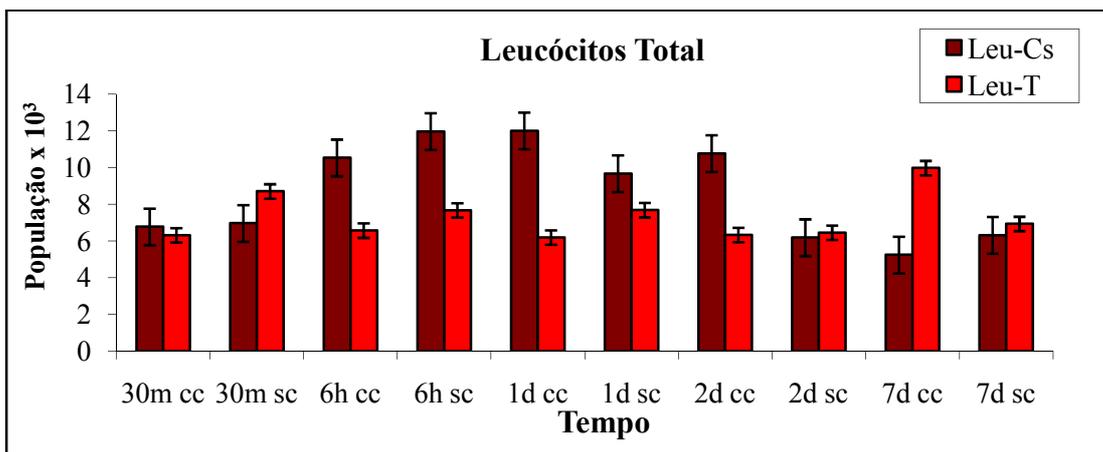


Figura 23 - Efeito da administração intraperitoneal de 100 μ L do FM-PAS-1 na contagem global dos leucócitos do sangue periférico. Leu = Leucócitos, Cs = Controle salina, T = Tratados, CC = com CMA, SC = sem CMA.

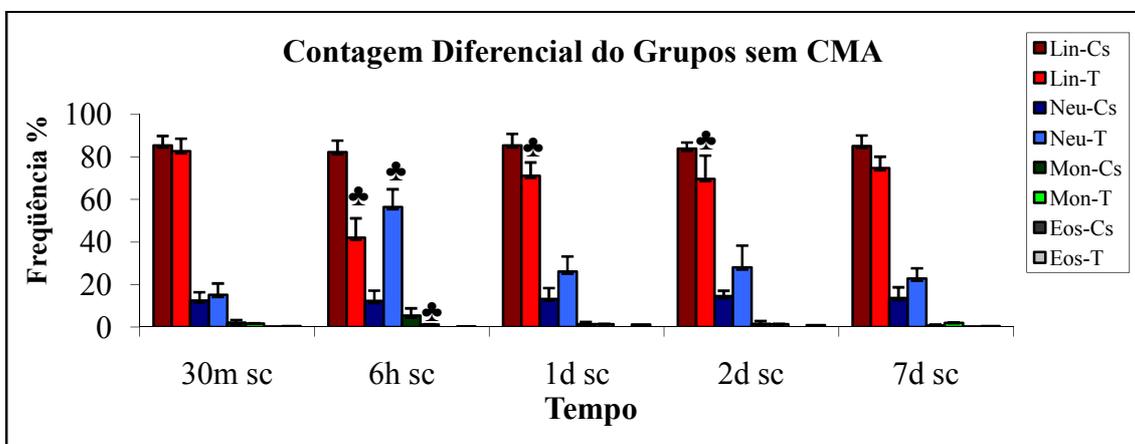


Figura 24 - Efeito da administração intraperitoneal de 100 μ L do FM-PAS-1 na contagem diferencial dos leucócitos do sangue periférico. Lin = Linfócitos, Neu = Neutrófilos, Mon = Monócitos, Eos = Eosinófilos, Bas. = Basófilos, Cs = Controle salina, T = Tratados, SC = sem CMA.

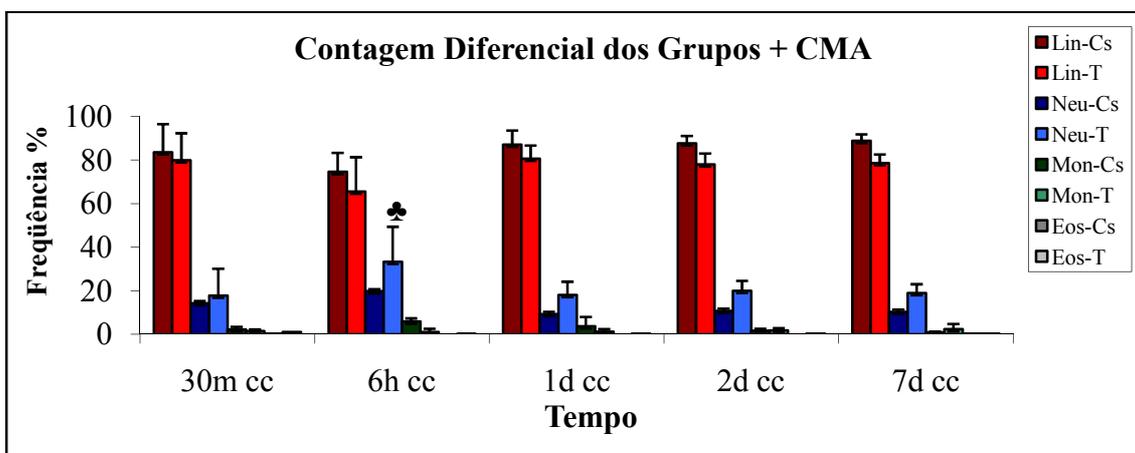


Figura 25 - Efeito da administração intraperitoneal de 100 μ L do FM-PAS-1 na contagem diferencial dos leucócitos do sangue periférico na presença do CMA. Lin = Linfócitos, Neu = Neutrófilos, Mon = Monócitos, Eos = Eosinófilos, Bas = Basófilos, Cs = Controle salina, T = Tratados, CC = com CMA.

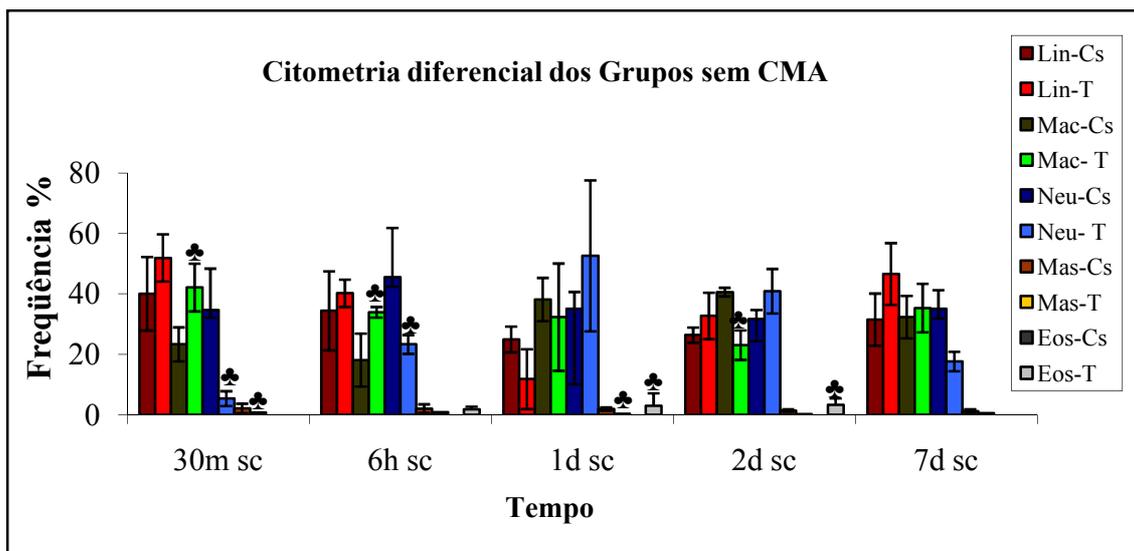


Figura 26 - Efeito da administração intraperitoneal de 100 μ L do FM-PAS-1 na contagem diferencial das células peritoneais. Lin = Linfócitos, Neu = Neutrófilos, Mon = Monócitos, Eos = Eosinófilos, Bas.= Basófilos Cs = Controle salina, T = Tratados, SC = sem CMA, m = minutos, h = horas, d = dias.

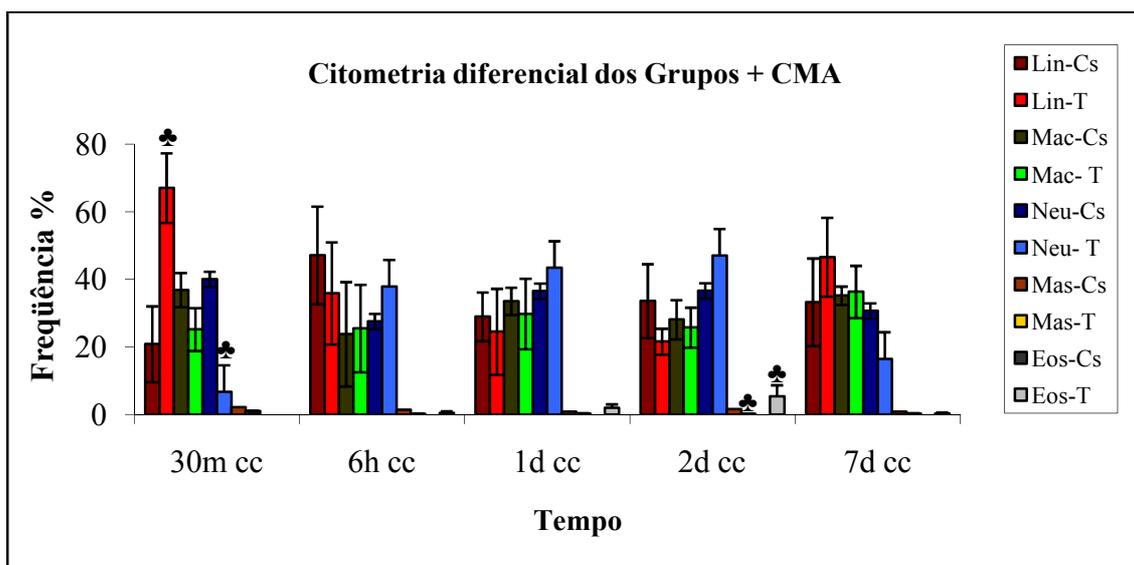


Figura 27 - Efeito da administração intraperitoneal de 100 μ L do FM-PAS-1 na contagem diferencial das células peritoneais na presença do CMA. Lin = Linfócitos, Neu = Neutrófilos, Mon = Monócitos, Eos = Eosinófilos, Bas = Basófilos, Cs = Controle salina, T = Tratados, CC = com CMA, m = minutos, h = horas, d = dias.

4.3.5 - Análise Histopatológica

Na **Fig. 28** podem ser vistos diversas secções de baço (**Fig. 28a a 28d**) e pulmões (**Fig. 28 e 28f**) de animais controle e outros injetados intraperitonealmente com **FM-PAS-1**, submetidos ou não a CMA. No tocante ao baço, foram observados no primeiro dia da injeção nos animais submetidos aos dois tratamentos (com e sem CMA) áreas com acúmulo de material de coloração marrom, típicas do acúmulo de nanopartículas magnéticas. No primeiro (com exposição ao CMA) caso, tal material foi visto em área de estroma, com vasos sanguíneos, provavelmente junto ao hilo. No segundo (sem exposição ao CMA), o material citado foi visto nitidamente em regiões de polpa vermelha, em abundância no primeiro dia, o que também foi visto em baço dois dias após o tratamento (**Fig.28d**). Nos dois casos o baço mostrou-se normal quanto a suas características histológicas gerais. No pulmão (**Fig. 28e**) de camundongo injetado intraperitonealmente, submetido ao CMA e retirado no 7º dia após injeção (**Fig. 28f**), não foram vistas quaisquer alterações morfológicas em comparação com o controle. Nenhuma alteração morfológica foram encontradas nos outros tempos de tratamento tanto nos grupos tratados com FM-PAS-1 quanto grupos tratados com FM-PAS-1 e submetidos ao CMA

Neste trabalho, também foram coletados fígado de animais em que foi dada injeção intraperitoneal de **FM PAS-1**, submetidos ou não ao CMA, cujos resultados podem ser vistos na **Fig. 29a a 29c**. Em comparação ao controle, o fígado de animal submetido ao campo magnético (**Fig. 29b**), apresentou áreas onde o sangue, no interior de vasos, mostrava-se de coloração amarronzada, sugerindo a presença de NPM naqueles locais. Secções de fígado de animais injetados mas nos quais não houve a submissão ao campo não apresentaram, no 2º dia, tais alterações (**Fig. 29c**). Vale ressaltar a total ausência de lesões histopatológicas no material analisado em todos os

tempos e grupos analisados. No estudo dos rins **Fig. 29d a 29f** dos animais tratados, observou-se a presença de sangue com a coloração diferenciada e já citada no 1º dia do tratamento, no fígado, sem contudo serem vistas outras mudanças histológicas significativas em relação ao controle (**Fig. 29e**). No corte de rim obtido de animal injetado mas no qual não foi aplicado campo magnético (**Fig. 29f**) também foi visto resultado semelhante ao último, contudo, inclusive no interior de túbulos renais corticais (seta amarela). Mesmo não sendo também identificados nesses animais outras alterações histológicas renais, tais dados podem ser, futuramente, contrapostos aos de fisiologia renal, testada por métodos apropriados.

Na **Fig. 30**, podem ser vistas áreas do pâncreas, exócrino e endócrino (cabeça das setas), de animais controle (**Fig. 30a**) e tratados intraperitonealmente com **FM-PAS-1 (Fig. 30b e 30c)**, às quais foi aplicado, posteriormente, campo magnético alternado. Observam-se, em relação ao controle, acúmulos de fluido em áreas do estroma do órgão, provavelmente vasos sanguíneos (**Fig. 30b, setas**). No parênquima não foram observados, com esse tratamento, quaisquer alterações, tanto na parte exócrina quanto endócrina, na **figura 30c**

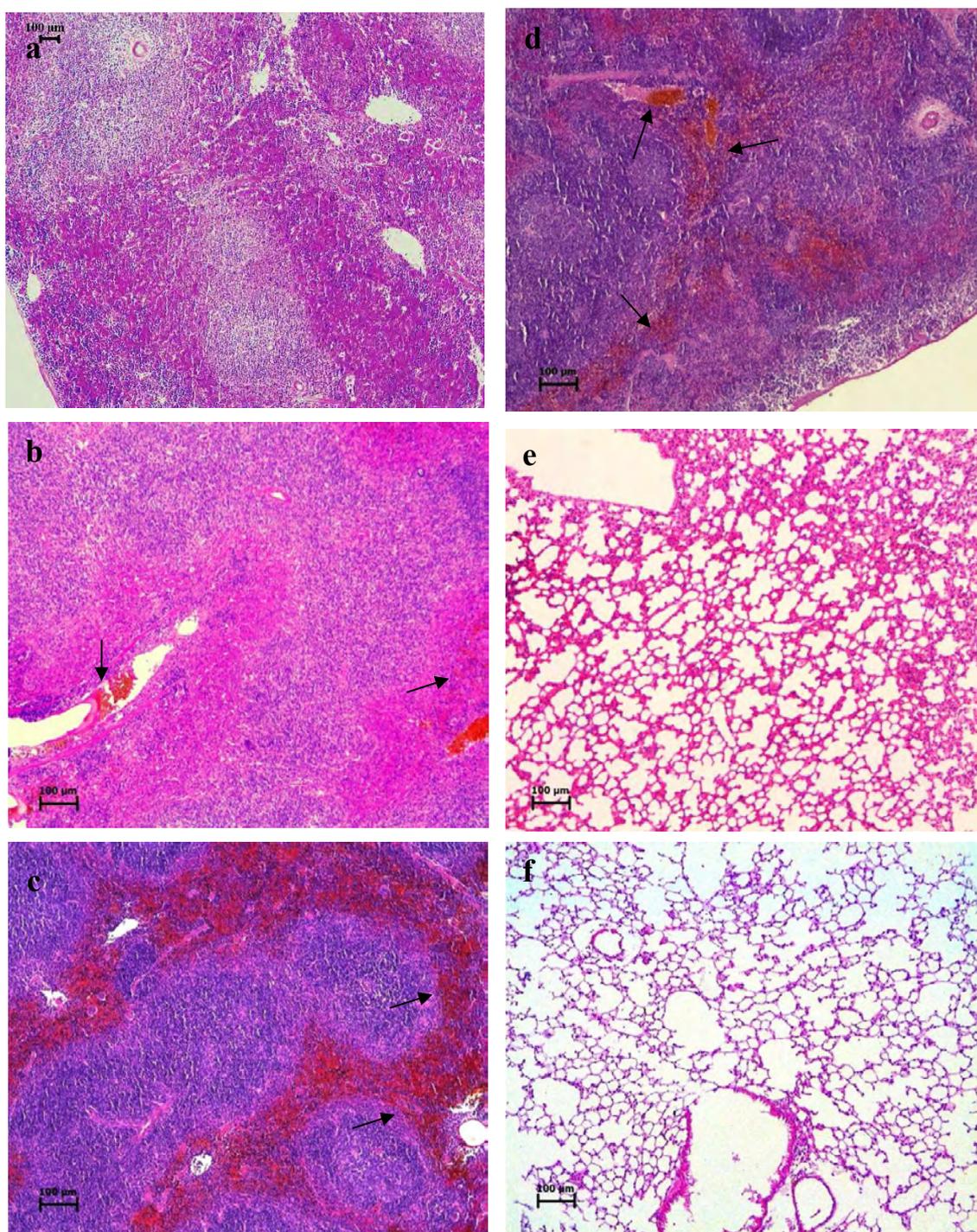


Figura 28 – Fotomicrografias de **baço** (Ba) (a-d) e **pulmão** (Pu) (e-f) de camundongos controle e tratados com 100μL ip, de FM-PAS-1 na presença ou ausência de CMA, a = Ba-controle (H/E - 100×), b = Ba-tratado-1dc (H/E - 100×), c = Ba-tratado-1ds (H/E - 100×), d = Ba-tratado-2dc (H/E - 100×), e = Pu-controle (H/E - 100×), f = Pu-tratado-7dc (H/E - 100). Setas apontam aglomerados de nanopartículas.

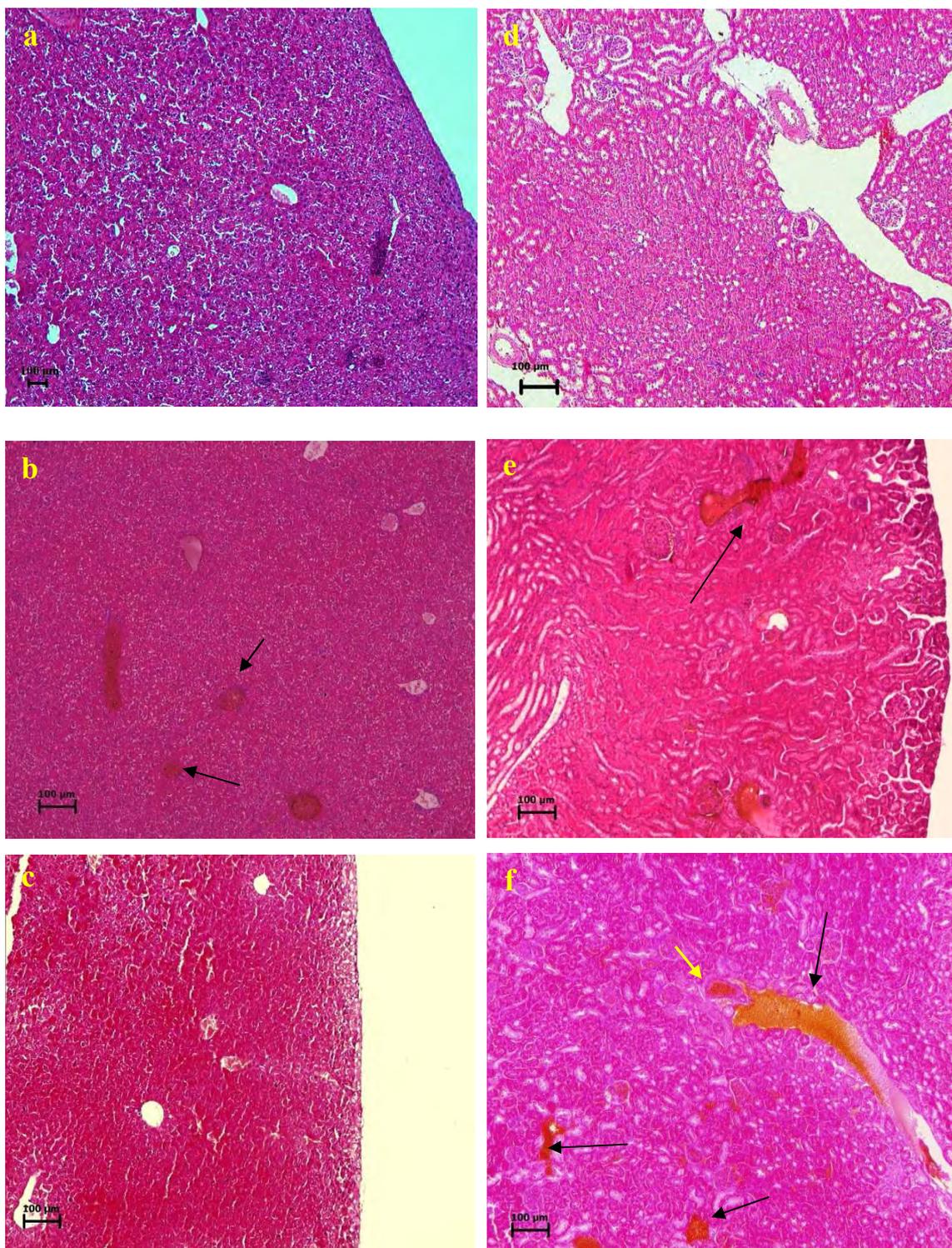


Figura 29 – Fotomicrografias de **fígado** (Fi) (a - c) e **rim** (Ri) (d - f) dos camundongos controle e tratados com 100 μ L intraperitonealmente, de FM-PAS-1 na presença ou ausência do CMA, a = Fi-controle (H/E - 100 \times), b = Fi -tratado-1ds (H/E - 100 \times), c = Fi -tratado-2dc (H/E - 100 \times), d = Ri-controle (H/E - 100 \times), e = Ri -tratado-1dc (H/E - 100 \times), f = Ri -tratado-1ds (H/E - 100 \times). Setas apontam aglomerados das nanopartículas e seta amarela aponta túbulos renais corticais.

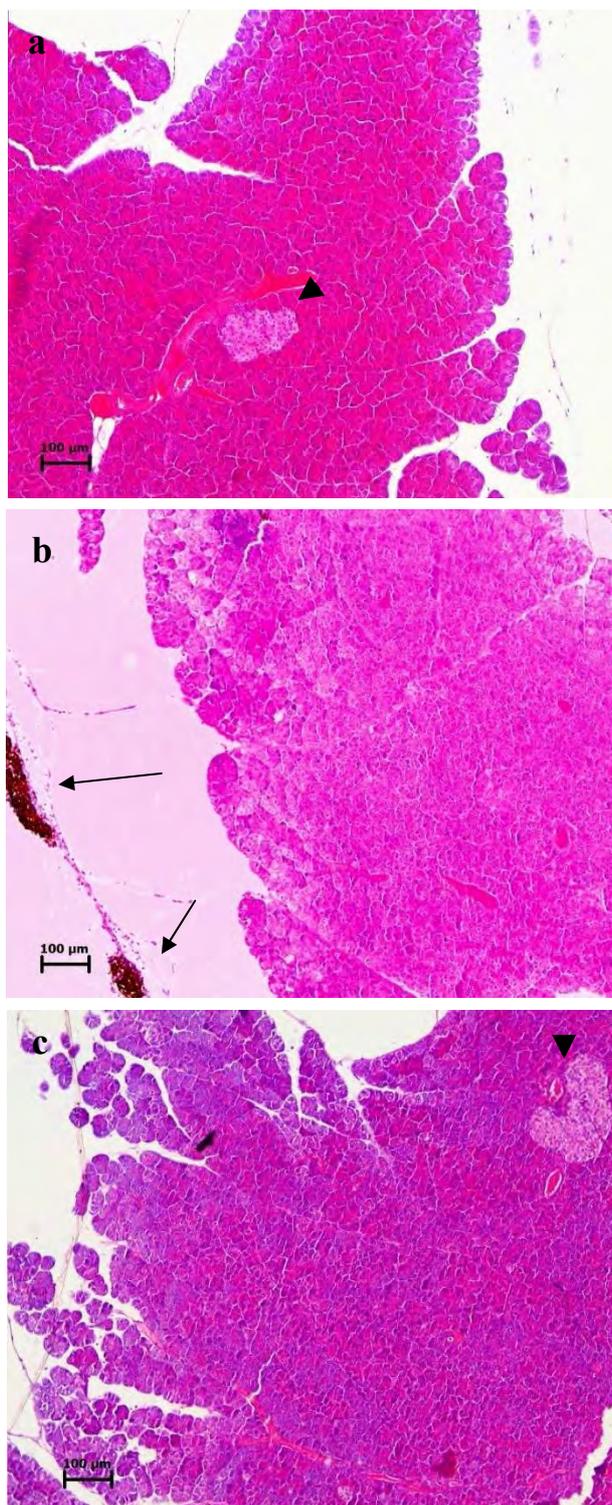


Figura 30 - Fotomicrografias de **pâncreas** (Pâ) dos camundongos controle e tratados com 100 µL, FM-PAS-1, endovenosamente. a = Pâ-controle (H/E - 100×), b = Pâ - tratado-1dc (H/E - 100×), c = Pâ -tratado-2dc (H/E - 100×). Setas apontam aglomerados das nanopartículas e cabeças das setas apontam ilhotas pancreáticas (áreas endócrinas).

4.4 - Resultados da Etapa 3

4.4.1 - Contagem global e diferencial das células do sangue periférico

Os efeitos da administração intratumoral de **FM-PAS-2** na contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico estão mostrados nas **Figuras 31 a 39**. Três dias após o tratamento não houve diferenças estatisticamente significativas na contagem global dos leucócitos totais do sangue periférico, seja entre os grupos experimentais ou em relação aos grupos de controle animais sadios, sem tratamento (Con ST), e controle com tumor sólido de Ehrlich (Con TSE) (**Fig. 31**). Entretanto, no mesmo tempo, o tratamento intratumoral com **FM-PAS-2** resultou em uma diminuição significativa na população dos linfócitos e um aumento significativo nos neutrófilos em relação ao grupo controle sem tratamento (**Fig. 32 e 33**). Sete dias após o tratamento também não foram observadas diferenças significativas na população dos leucócitos totais (**Fig. 34**). Contudo, conforme apresentam as figuras **35 e 36**, no grupo tratado com **FM-PAS-2** e subsequentemente exposto ao CMA ocorreu uma diminuição significativa nos linfócitos e um aumento nos neutrófilos comparados ao controle ST. Trinta dias após o tratamento, diferentemente dos anteriores, os resultados obtidos apresentaram um aumento significativo na população de leucócitos totais no grupo tratado com **FM-PAS-2** em relação ao grupo de controle ST (**Fig. 37**). As frequências dos linfócitos dos grupos tratados com **FM-PAS-2** na presença ou ausência do CMA tiveram uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ST e um aumento concomitante na frequência dos neutrófilos. Houve também uma diminuição no grupo exposto ao CMA em relação com controle TSE (**Fig. 38**). Na **figura 39** estão apresentadas as diferenças significativas na frequência dos neutrófilos de todos os grupos tratados em relação ao grupo controle ST que tiveram um aumento e

esse aumento foi registrado também nos neutrófilos do grupo exposto ao CMA em relação ao controle TSE.

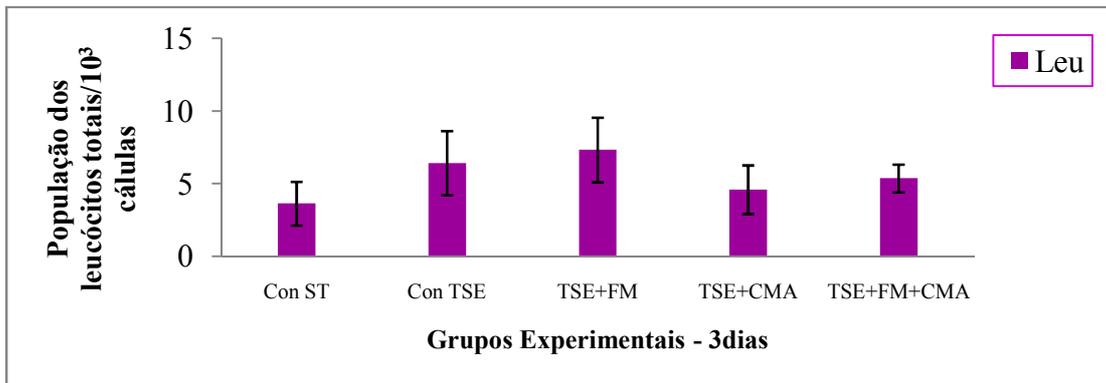


Figura - 31 - Efeito da administração intratumoral de 100 μ L do FM-PAS-2 na contagem global dos leucócitos totais no sangue periférico na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, Leu = Leucócitos, ST = Sem Tratamento, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado.

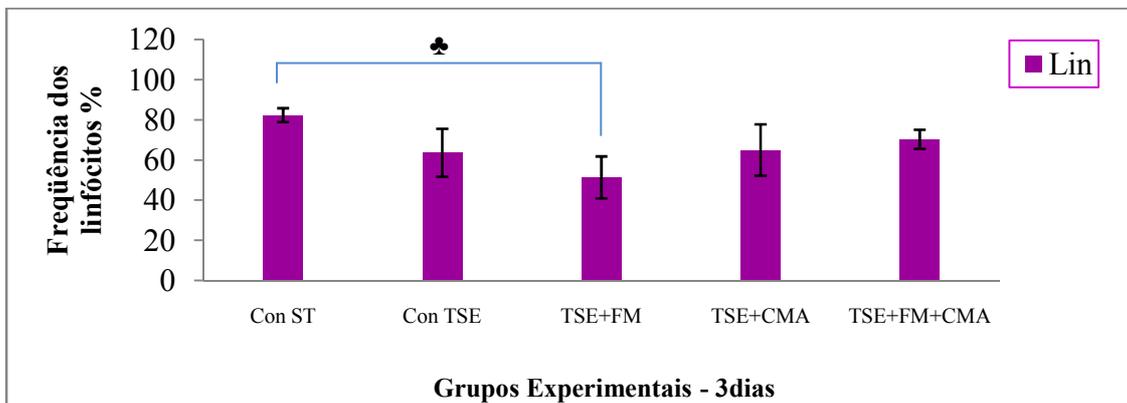


Figura - 32 - Efeito da administração intratumoral de 100 μ L do FM-PAS-2 na contagem diferencial dos linfócitos do sangue periférico na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, Lin = Linfócitos, ST = Sem Tratamento, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado. ♣ aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

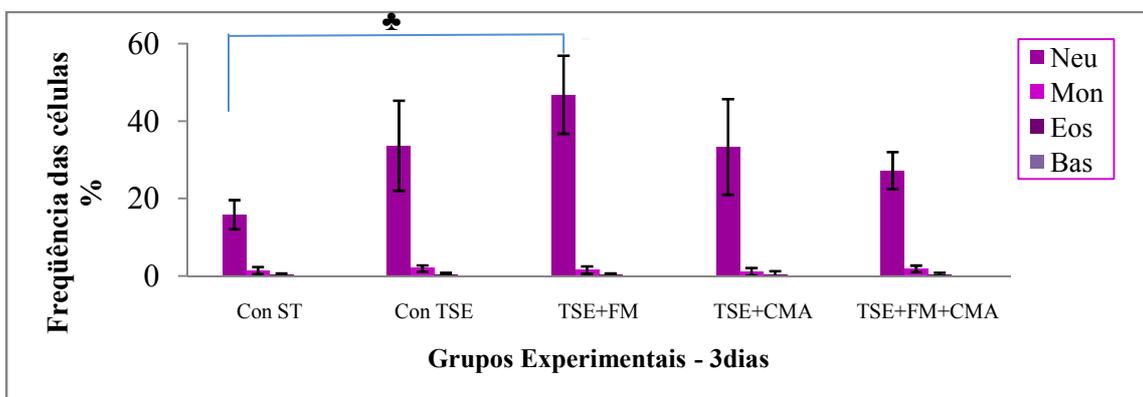


Figura - 33 - Efeito da administração intratumoral de 100 μ L do FM-PAS-2 na contagem diferencial das células do sangue periférico na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, Neu = Neutrófilos, Mon = Monócitos, Eos = Eosinófilos, Bas = Basófilos, ST = Sem Tratamento, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado. ♣ aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

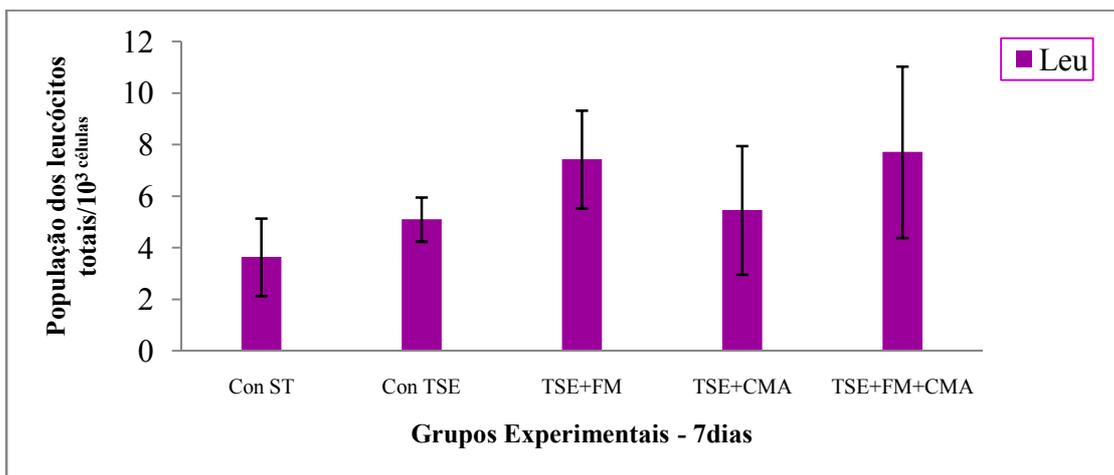


Figura - 34 - Efeito da administração intratumoral de 100 μ L do FM-PAS-2 na contagem global dos leucócitos totais no sangue periférico na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, Leu = Leucócitos, ST = Sem Tratamento, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado.

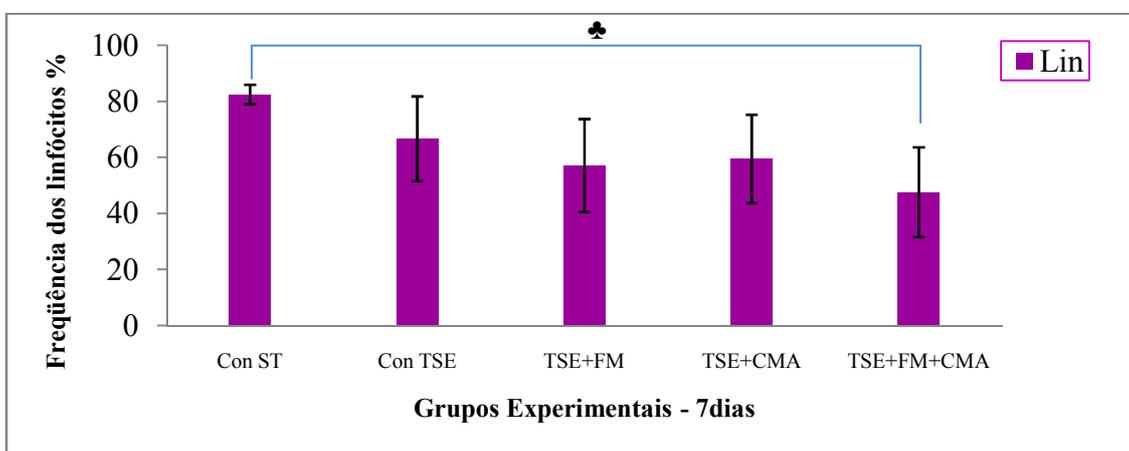


Figura - 35 - Efeito da administração intratumoral de 100 μ L do FM-PAS-2 na contagem diferencial dos linfócitos do sangue periférico na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, Lin = Linfócitos, ST = Sem Tratamento, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado. ♣ aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

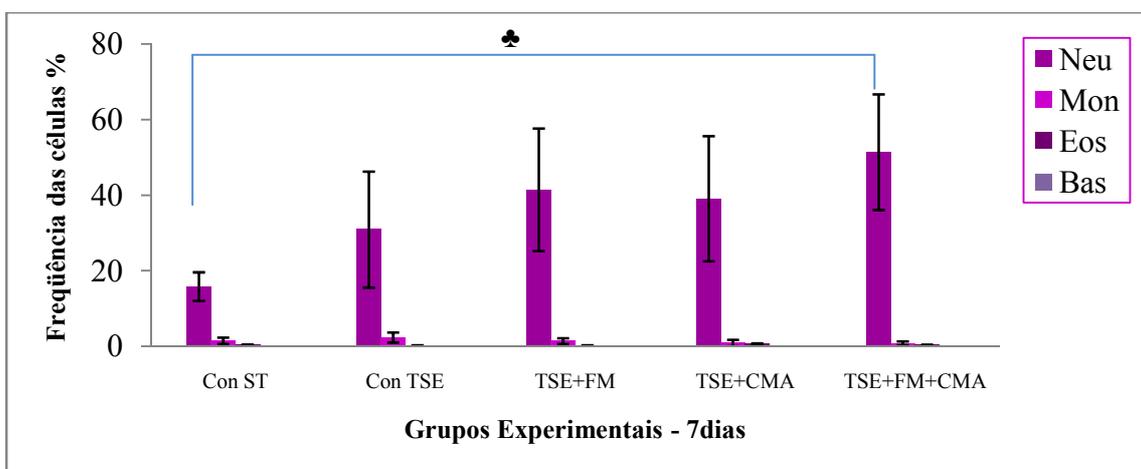


Figura - 36 - Efeito da administração intratumoral de 100 μ L do FM-PAS-2 na contagem diferencial das células do sangue periférico na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, Neu = Neutrófilos, Mon = Monócitos, Eos = Eosinófilos, Bas = Basófilos, ST = Sem Tratamento, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado. ♣ aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

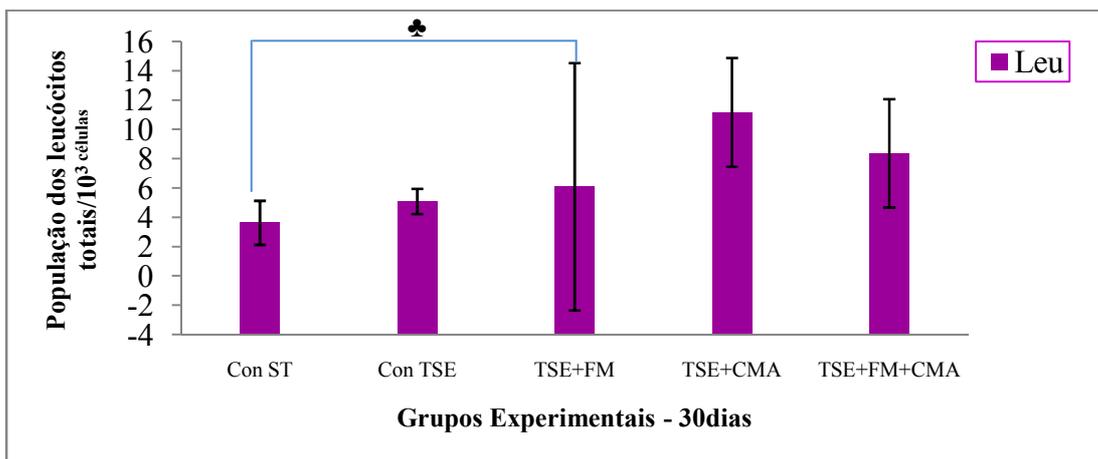


Figura - 37 - Efeito da administração intratumoral de 100 μ L do FM-PAS-2 na contagem global dos leucócitos totais no sangue periférico na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, Leu = Leucócitos, ST = Sem Tratamento, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado. ♣ aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

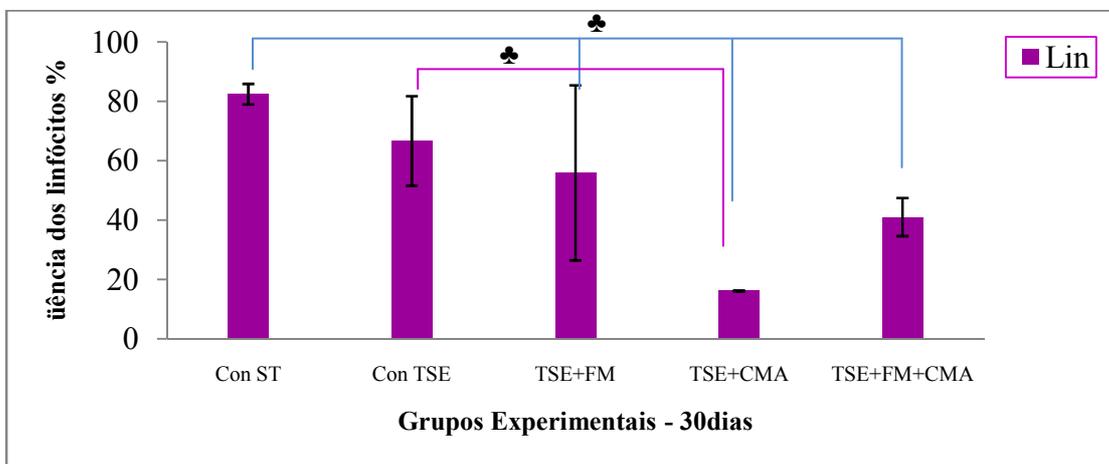


Figura - 38 - Efeito da administração intratumoral de 100 μ L do FM-PAS-2 na contagem diferencial dos linfócitos do sangue periférico na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, Lin = Linfócitos, ST = Sem Tratamento, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado. ♣ aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

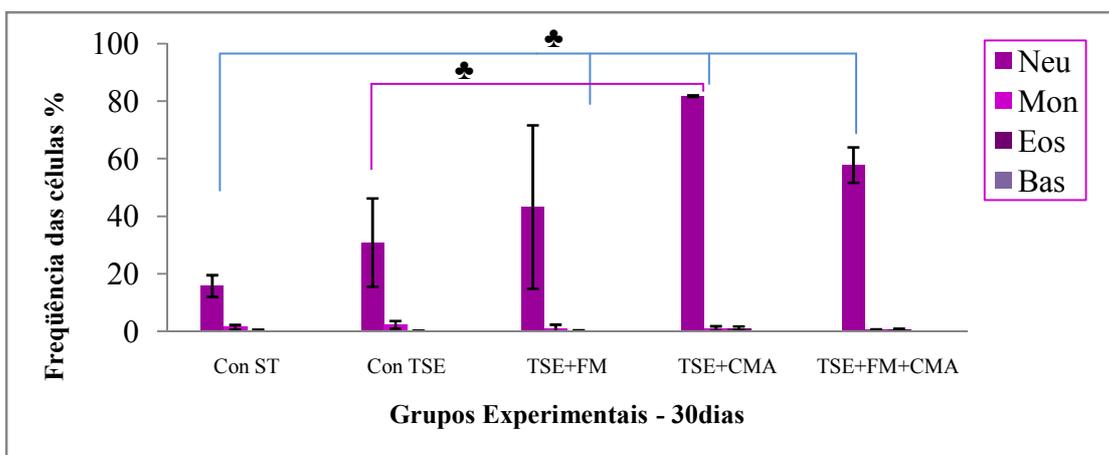


Figura - 39 - Efeito da administração intratumoral de 100 μ L do FM-PAS-2 na contagem diferencial das células do sangue periférico na presença ou ausência do CMA e a exposição do tumor ao CMA. Con = Controle, Neu = Neutrófilos, Mon = Monócitos, Eos = Eosinófilos, Bas = Basófilos, ST = Sem Tratamento, TSE = Tumor Sólido de Ehrlich, CMA = Campo Magnético Alternado. ♣ aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

4.4.2 – Observações histopatológicas

Os efeitos histopatológicos da administração intratumoral do **FM-PAS-2** nos animais com TSE na presença e ausência do CMA e exposto ao CMA foram analisados empregando a análise histopatológica. Foram analisados os órgãos fígado, baço e pulmões e o tumor sólido tanto no grupo de controle (Con TSE) quanto nos grupos tratados identificados como TSE+FM, TSE+CMA e TSE+FM+CMA.

4.4.2.1 – Resultados obtidos pelas análises do tumor sólido de Ehrlich

Grupos controle – Con TSE

Na análise histopatológica do tumor de Ehrlich implantado no dorso dos camundongos, nos grupos TSE controle sem tratamento algum (**Fig.40**), foi observada a presença de massa tumoral encapsulada e fibrosa, podendo-se verificar a presença de tecido epitelial localizado mais internamente, seguido de áreas de tecido neoplásico indiferenciado e infiltrativo que, por sua vez, era composto de células hiper cromáticas, com grande variação de tamanho e forma (**Fig. 40a**). Em maior aumento, a **Fig. 40b** mostra área neoplásica com tecido epitelial cujas células mantêm as características de malignidade já descritas. Entre as mesmas, acham-se áreas de células dissociadas intensamente hiper cromáticas circundadas por hemorragias locais. Ao centro, verifica-se o aspecto epitelial do tumor onde também puderam ser identificadas células gigantes multinucleadas (**seta**), cujos núcleos em intensa atividade mitótica exibiam cromatina em grumos, sugerindo multiplicação desordenada e malignidade. Observa-se na **figura 40c**, áreas de vacuolização citoplasmática das células neoplásicas com heterocromatina fragmentada e fibras musculares penetrando profundamente na massa de tecido

neoplásico (**setas amarelas**). A **figura 40d** mostra a presença de tumor extensamente hemorrágico com traços epiteliais visíveis. Áreas de hemorragia delimitam setores à áreas claras e núcleos picnóticos, associadas com tecido frouxo e edemaciado (**área com marcação amarela**). As análises revelaram um aumento de áreas necrosadas relativo à idade do tumor por processo chamado necrose coagulativa.

Grupos tratados com FM-PAS-2 – TSE+FM

Na análise histopatológica dos tumores tratados com **FM-PAS-2 (Fig.41)**, intratumoralmente, foi observada a presença de nanopartículas magnéticas (NPM) nas células parenquimatosas, neoplásicas. A **figura 41a** mostra massa tumoral com mesmas características epitelióides, apresentando malignidade evidente e área com material de coloração marrom-escuro, revelando a presença das NPM injetadas no tumor. Três dias após o tratamento, a maior quantidade de nanopartículas do FM-PAS-2 estava concentrada no centro do tumor, não muito espalhada no tecido e mais acumulada perto do local da injeção. Como pode ser observado na **figura 41b**, sete dias após o tratamento, as nanopartículas começam a se espalhar no tecido e formar aglomerados mais homogêneos. As regiões necrosadas aparecem aumentadas e apresentam grandes áreas de vacuolização citoplasmática das células neoplásicas. Observa-se nas **figuras 41c e d**, 30 dias após o tratamento, aumento ainda maior nas áreas necrosadas e a presença das nanopartículas na região mais intermediária do tumor sólido. Houve também aumento da presença de pigmentos férricos liberados pelas hemácias mortas, como mostra a seta indicadora na **figura 41d**. Os pigmentos são menores e formam aglomerados distintos dos formados pelas nanopartículas. Todos os tumores tratados com **FM-PAS-2** apresentaram concentração maior de células necróticas e morte celular por fagocitose das nanopartículas e conseqüentemente aumento de radicais livres nas

células e nas regiões próximas aos locais de injeções do fluido magnético, enquanto nas partes mais distantes das NPM, o aspecto histopatológico é semelhante ao do grupo TSE controle.

Grupos expostos ao campo magnético alternado (CMA) – TSE+CMA

As análises histopatológicas do tumor sólido de Ehrlich (TSE) expostos ao CMA representadas na **Figuras 42a, 42b e 42d**, demonstraram pequenas áreas de depressão na superfície do tumor relacionadas com os locais de aplicação do campo magnético realizada com uma ponteira aguda (conforme a descrição do equipamento I). Como observado nas mesmas fotos, houve um processo de necrose e morte celular mais intenso logo abaixo do local das depressões. Há presença de tecido conjuntivo fibroso jovem (**setas pequenas nas figuras 42c e 42d**) que não foram encontrados nos tumores do grupo controle e nem tratado com **FM-PAS-2**. O tecido conjuntivo parece mais maduro e denso nos tempos sete e 30 dias após o tratamento. As células próximas ao local de aplicação do CMA se organizam em feixes paralelos voltados para o ápice da ponteira. Assim, pode ser vista, em todas as fotos, massa tumoral com tecido epitelial onde áreas de aparência tecidual mais sólida são entremeadas por outras mais claras, com células picnoticas invasivas e que se seguem às áreas de coloração de vermelho intenso onde predomina tecido hemorrágico necrótico.

Grupos tratados com FM-PAS-2 e exposto ao CMA – TSE+FM+CMA

Os resultados obtidos pelas análises histopatológicas do tumor sólido de Ehrlich (TSE) tratado com **FM-PAS-2** e também exposto ao CMA estão apresentados na **figura 43**. Em comparação com os dois grupos descritos anteriormente, a combinação de ambos os tratamentos teve efeito tóxico mais severo nas células neoplásicas. Grandes áreas necrosadas e presença do tecido conjuntivo fibroso (**Fig. 43a e 43b**) (**setas amarelas**) foram observadas em todos os tempos. Trinta dias após o tratamento, dependendo do tamanho do tumor no início do tratamento, houve uma destruição total das células tumorais, o que foi mais evidente quando o tumor foi submetido por 30 minutos ao CMA, durante três dias subseqüentes. As setas nas **figuras 43c e 43d** indicam as áreas submetidas ao CMA e a presença de aglomerados de nanopartículas magnéticas atraídas e retidas no local pelo campo magnético.