



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estudo da biodistribuição e biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas à base de maguemita recobertas com DMSA em macacos-prego (*Cebus spp.*) juvenis mediante análise morfológica.

Victoria Monge-Fuentes

Brasília, 2009

VICTORIA MONGE-FUENTES

Estudo da biodistribuição e biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas à base de maguemitita recobertas com DMSA em macacos-prego (*Cebus spp.*) juvenis mediante análise morfológica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Pereira Garcia

Brasília, 2009

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação:

À Nossa Senhora dos Anjos, Padroeira da Costa Rica, fonte de fortaleza e de paz nesta fase da minha vida.

À toda a minha família na Costa Rica, em especial meus pais, Victor e Lucía, quem me inspiraram com seu exemplo de superação e esforço e me ajudaram chegar até aqui. De longe ou de perto sempre estiveram do meu lado, me apoiando e incentivando na minha superação pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Victor E., Mónica e Angel, meus grandes amigos e companheiros, pelo apoio e os momentos de alegria e diversão.

Ao meu amado Bento, pelo espírito de superação, carinho, companhia, longas conversas, interesse, conselhos, ânimo, amizade, amor, força, alegrias e apoio incondicional nos momentos bons e nos difíceis. Você é meu anjo!

Aos meus colegas cientistas, para que cada pequeno descobrimento nos surpreenda e sirva de inspiração para querermos continuar desvendando os mistérios da vida.

AGRADECIMENTOS

Durante o decorrer do meu mestrado, tive a oportunidade de começar a conhecer o maravilhoso mundo da ciência, aonde me surpreendi com cada pequena descoberta e aonde os obstáculos e dificuldades me ajudaram a crescer como pessoa e como profissional. Sem dúvida, tem sido uma jornada incrível, a qual não teria sido possível sem o companheirismo, boa vontade e bom coração de muitas pessoas que no decorrer do caminho estiveram presentes, estendendo a sua mão amiga. Desta forma, gostaria de expressar a minha imensa gratidão às seguintes pessoas e instituições:

Agradeço de maneira especial ao meu orientador, Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, por ter me acolhido em seu laboratório e por ter proporcionado as condições para realizar esta pesquisa.

Aos Professores: Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e Dr. Carlos Tomaz, criadores do tema de pesquisa deste trabalho. Obrigada pela confiança e fé depositadas em mim para que o presente trabalho se convertesse em uma realidade.

À Professora Dra. Mônica Pereira Garcia, pelos interessantes e valiosos ensinamentos na área da histologia e microscopia, co-orientação, interesse, simpatia e ajuda gentilmente fornecidos neste período.

À Professora Dra. Maria Clotilde Henriques Tavares, Diretora e pesquisadora do Centro de Primatologia, pela facilitação dos modelos experimentais, ensinamentos, confiança e pelas oportunidades profissionais dadas nos últimos anos.

A todos meus queridos companheiros e amigos cientistas: Camila de Arruda, Cláudio Cavalcanti, Leandro Bicalho, Luis Muehlmann, Maitê Mijan, Larissa Melo, João Paulo Longo, Juliana Braz, Natália Velloso, Luciana Oliveira, Martha Rocha e a Marcella Carneiro por iluminar o ambiente de trabalho com sua simpatia e alegria. Obrigada pela ajuda durante este período. Desejo muito sucesso para vocês.

Agradeço especialmente à Caroline Valois, admirável modelo de pesquisadora. Obrigada pelos valiosos ensinamentos, conselhos, injeções de ânimo e pela assistência dada tanto pessoalmente como por meio de conexão virtual Canadá-Costa Rica.

À minha querida colega de biologia e velha amiga Graziella Joanitti, pelos ensinamentos, conselhos, paciência e pela duradoura amizade.

À Patricia Cunha, pelo bom senso de humor, ânimo nos momentos difíceis, ajuda nas necropsias e pela linda amizade.

À Shélida Vasconcelos Braz, companheira durante a fase inicial deste trabalho, obrigada pela ajuda, amizade e assistência na preparação das amostras para análise por microscopia eletrônica.

À Jaqueline Rodrigues pelos ensinamentos, conselhos, amizade e valiosas discussões.

Ao técnico Antônio Djalma Santos pela simpatia, paciência, disponibilidade, dicas e pelos valiosos ensinamentos sobre as técnicas de preparação de lâminas histológicas. Agradeço também pelo auxílio dado durante as necropsias dos animais.

À Professora Dra. Emília Celma de Oliveira Lima e a sua equipe de trabalho do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, por sintetizar e ceder a amostra do fluido magnético utilizada nesta pesquisa.

Às Professoras: Dra. Silene de Paulino Lozzi e Dra. Marília Barros, que gentilmente participaram como membros da banca examinadora do presente trabalho e contribuíram com valiosos comentários, observações e sugestões.

Ao veterinário Danilo Teixeira Simonini, pela indispensável e valiosa colaboração dada tanto na eutanásia e necropsia dos animais como na obtenção das amostras sanguíneas.

Aos Senhores Raimundo Oliveira da Silva, Geinaldo Vieira da Silva e Adão Pedro Nunes da Silva, funcionários do Centro de Primatologia da UnB, pelos cuidados dados aos macacos e pela assistência oferecida durante os procedimentos de coleta de sangue.

Às Professoras Dra. Sônia Bão, Dra. Rosana Tidon e Dra. Nilda Diniz pela simpatia e confiança ao disponibilizar o uso do microscópio eletrônico e de luz.

Aos mestres Francisco Roque e Henrique Valadão, alunos de pós-graduação do Laboratório de Evolução da UnB pela assistência dada na utilização do microscópio.

Aos funcionários do Hospital Veterinário–HVET/UnB: Nara Rodrigues, Jonas Francisco Lima e Diego Moura pelo auxílio na coloração das lâminas por meio do método de Perls. À Larissa Cardozo pelos procedimentos de eutanásia.

Ao Senhor Cônsul Honorário em São Paulo, Sr. Victor Abbud, por todo o apoio, generosidade e essencial assistência, gentilmente fornecidos durante esta importante fase da minha vida.

Ao Dr. Fernando Garcia, Professor Catedrático e Pesquisador da Faculdade de Microbiologia da Universidad de Costa Rica, pela amizade, dicas, conselhos e empréstimo de equipamento para análise.

Ao Dr. José María Gutiérrez, Pesquisador do Instituto Clodomiro Picado, Faculdade de Microbiologia da Universidad de Costa Rica, pela ajuda na interpretação dos exames hematológicos e de bioquímica sérica.

A todos meus familiares e amigos que torceram e oraram para que este sonho virasse realidade.

A todos os anjos brasileiros e costarriquenhos que Deus colocou para iluminar o meu caminho nos últimos dois anos, sem vocês, o meu andar teria sido muito mais difícil.

Aos meus amigos estrangeiros, colegas de viagem nesta terra longínqua, Carolina Rivero Rubio, Claudia Maricela Gómez Muñetón, Sergio Conde e Sebastian Ujevic Tonino.

À minha família brasileira: Dona Lara, Mario, Pablo, Luca, Senhor Helvécio, Luzia, Marina, Vó Zuzita, Chico, Vó Ceny. Obrigada pela amizade, carinho, força e companhia durante os últimos cinco anos.

À Maria Villalobos, Cônsul Geral e Ministra Conselheira na Embaixada da Costa Rica no Brasil, por ter me acolhido com carinho na sua casa. Obrigada pela amizade.

Aos meus amigos primatas não humanos, pelo sacrifício. Sem eles, a presente pesquisa não teria sido possível.

À Graciella Martins pela força para conseguir a permissão de realizar os exames hematológicos e bioquímicos.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado fornecida e à FINATEC, INCT-Nanotecnologia e FINEP pelo apoio financeiro.

Finalmente, agradeço à vida, em todas as suas formas de expressão, pela inspiração dada.

AGRADECIMENTO ÀS SEGUINTE INSTITUIÇÕES PELO SUPORTE E FINANCIAMENTO:



RESUMO

A determinação da biodistribuição e da biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas (NPMs) para aplicações biomédicas *in vivo* é essencial para, posteriormente, assegurar a sua utilização clínica de uma forma segura. A biodistribuição de NPMs depende de propriedades, tais como: características de superfície, forma e carga, as quais podem também afetar a sua remoção, interação partículas-células e interações com proteínas no soro. A determinação da remoção do ferro conforme as NPMs degradam-se é também importante, já que o excesso de ferro nos tecidos pode causar toxicidade. De tal forma, NPMs à base de maguemita recobertas com o estabilizante ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), foram injetadas intravenosamente em primatas não-humanos da espécie *Cebus spp.*, sacrificados 12 horas, 30 e 90 dias após administração. Aglomerados de NPMs foram distribuídos em todos os órgãos de estudo, porém, foram principalmente observados no pulmão, fígado, rim e baço em todos os tempos experimentais. A análise mostrou também que conforme o tempo avançou, menos aglomerados foram visualizados. O cérebro, cerebelo, pâncreas, coração e intestinos mostraram uma presença ínfima de NPMs, não sendo considerados como potenciais órgãos alvo para futuras aplicações biomédicas. As principais vias de eliminação das NPMs-DMSA foram, predominantemente, pelo fígado, seguido pelo rim, sem excluir uma remoção paralela pelas vias aéreas. Alterações morfológicas foram observadas unicamente no tecido hepático obtido 90 dias após administração de NPMs, mostrando um aumento na área ocupada pelo espaço de Disse. Essa hepatotoxicidade foi possivelmente causada por um excesso de ferro no tecido. É considerada a possibilidade de uma leve imunossupressão induzida pela presença do ferro no organismo. Concluindo, no nosso conhecimento, o presente trabalho representa o primeiro estudo histológico, hematológico, bioquímico e clínico utilizando nanopartículas magnéticas em primatas não-humanos, como modelo experimental, o que aproxima o uso terapêutico de nanomateriais em seres humanos.

Palavras chave: nanopartícula magnética; óxido de ferro; biodistribuição; biocompatibilidade; nanotoxicidade; fluido magnético; ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico; primatas não-humanos.

ABSTRACT

It is essential to determine the biodistribution and biocompatibility of magnetic nanoparticles (MNPs) for *in vivo* biomedical applications in order to ensure their safe clinical use. Biodistribution of MNPs depends on their properties, such as surface characteristics, size, shape and charge, which can all affect biodistribution, clearance, particle-cell interactions, and interactions with serum protein. Equally important is determining iron clearance as MNPs degrade, due to the fact that excessive free iron tissue accumulation is known to cause toxicity. Therefore, maghemite based magnetic nanoparticles coated with meso 2,3-dimercaptosuccinic acid DMSA were injected in non-human primates (*Cebus apella*), sacrificed 12 hours, 30 and 90 days after intravenous administration of MNPs. MNPs were distributed in all study organs, being more abundant in the lungs, liver, kidney, and spleen, in all experimental times, showing that as time advanced, less agglomerates were observed in the tissue. Brain, cerebellum, pancreas, heart, and intestines showed very few MNPs agglomerates; therefore, their use for therapeutic applications was not considered. Main DMSA-MNP elimination route was observed to be done by the liver, followed by the kidney, not discarding elimination through the air ways as a parallel route. Morphological alterations were only seen in the liver obtained 90 days after DMSA-MF administration, showing a dilated Disse space. This hepatotoxicity could be due to iron overload. Possible light immunosuppression induced by iron overload is also considered. In conclusion, to our knowledge this work represents the first histological, hematological, biochemical, and clinical study which used magnetic nanoparticles in a non-human primate experimental model, bringing nanomaterial use for therapeutical purposes in human beings a step closer.

Keywords: magnetic nanoparticle; iron oxide; biodistribution; biocompatibility; nanotoxicity; magnetic fluid; meso 2,3-dimercaptosuccinic acid; non-human primates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estrutural da molécula de DMSA e ilustração de uma nanopartícula magnética recoberta pelo estabilizante DMSA. 17
- Figura 2.** Aspecto e comportamento magnético do FM-DMSA. 26
- Figura 3.** Fotografia de macaco-prego (*Cebus spp.*) juvenil. 28
- Figura 4.** Fotomicrografias de secções histológicas de pulmões de macaco-prego. 40
- Figura 5.** Fotomicrografias de secções de tecido pulmonar de AE90d, mostrando a presença de processos inflamatórios. 41
- Figura 6.** Secções histológicas de pulmão de macaco-prego mostrando aglomerados de NPMs (setas) em diversas estruturas pulmonares para diferentes tempos experimentais. 42
- Figura 7.** Eletronmicrografias de pulmão de macaco-prego, controle e 12 horas após a administração de FM-DMSA. 44
- Figura 8.** Micrografias eletrônicas de pulmão de macaco-prego 30 dias após a administração de FM-DMSA. 45
- Figura 9.** Eletronmicrografias de pulmão de macaco-prego 90 dias após a administração de FM-DMSA. 46
- Figura 10.** Fotomicrografias de secções de tecido hepático de macaco-prego corado mediante método de H&E. 48
- Figura 11.** Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de macaco-prego, mostrando a distribuição de Fe (III) no órgão, após a administração de FM-DMSA. 49
- Figura 12.** Fotomicrografias de cortes histológicos controle e experimentais de rim de macaco-prego. 51
- Figura 13.** Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de macaco-prego AE12H. 52
- Figura 14.** Fotomicrografias de rim de macaco-prego obtido 30 e 90 dias após administração de FM-DMSA. 53
- Figura 15.** Fotomicrografias de baço de macaco-prego. 54

TABELAS

Tabela 1. Características do FM-DMSA.	27
Tabela 2. Especificação do tipo de método usado para mensurar os vários parâmetros bioquímicos do soro.	37
Tabela 3. Valores hematológicos para amostras controle e experimentais de macaco-prego após administração de FM-DMSA.	57
Tabela 4. Valores bioquímicos de algumas enzimas de origem hepática e renal para amostras controle e experimentais de macaco-prego após administração de FM-DMSA.	59
Tabela 5. Controle do peso de macaco-prego após administração de FM-DMSA .	60

LISTA DE ABREVIACOES

AC – Animal controle

AE12H – Animal eutanasiado 12 horas após administração do FM-DMSA

AE30D - Animal eutanasiado 30 dias após administração do FM-DMSA

AE90D - Animal eutanasiado 90 dias após administração do FM-DMSA

BHE- Barreira hemato-encefálica

DH- diâmetro hidrodinâmico

DMSA - cido meso-2,3-dimercaptosuccínico

FF- ferro fluido

FM - Fluido magnético

FM-DMSA- Fluido magnético contendo nanoprticulas magnéticas recobertas com DMSA

GI- gastrointestinal

H&E- corante de hematoxilina e eosina

i.v. - Intravenoso

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

ML - Microscopia de luz

NP- Nanoprticula

NPM - Nanoprticula magnética

PBS- Phosphate Buffer Solution (solução tampão fosfato)

SNC- Sistema nervoso central

SRE- Sistema retículoendotelial

TCD- túbulos contorcidos distais

TCP- túbulos contorcidos proximais

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1. Nanotecnologia: grandes avanços a partir de um mundo diminuto	05
2.2. A nanobiotecnologia e suas aplicações	06
2.3. Caracterização e propriedades das nanopartículas.....	07
2.4.Nanopartículas à base de ferro e suas aplicações biomédicas.....	08
2.4.1. Na vetorização de fármacos	09
2.4.2. Nas imagens por ressonância magnética	11
2.4.3. Na magnetotermocitólise	13
2.4.4. Na marcação celular e separação magnética.....	14
2.4.5. Na regeneração de tecidos.....	15
2.5.O ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) como cobertura estabilizante para as NPMs	15
2.6.Estudos anteriores utilizando fluidos magnéticos contendo nanopartículas magnéticas recobertas pelo estabilizantes DMSA	17
III. JUSTIFICATIVA.....	20
IV. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo Geral	24
4.2 Objetivos Específicos	24
V. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.1. Caracterização do fluido magnético contendo nanopartículas magnéticas recobertas com o estabilizante DMSA	26
5.2. Modelo animal	27
5.3. Procedimentos	29
5.3.1. Administração de FM-DMSA nos animais	29
5.3.2. Eutanásia e necropsia dos sujeitos controle e experimentais	29

5.4. Avaliação histológica	30
5.4.1. Preparação do material e processamento para visualização mediante microscopia de luz	30
5.4.2. Colorações para microscopia de luz	31
5.4.3. Observação do material histológico	32
5.5. Processamento do material para visualização por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	33
5.6. Análise hematológica e bioquímica do sangue controle e após administração intravenosa de FM-DMSA	35
VI. RESULTADOS	38
6.1. Avaliação histológica do pulmão	39
6.2. Estudo da biodistribuição e biocompatibilidade de FM-DMSA no tecido pulmonar mediante MET	43
6.3. Avaliação histológica do fígado	46
6.4. Avaliação histológica do rim	50
6.5. Avaliação histológica do baço	53
6.6. NPMs nos demais órgãos de estudo	55
6.7. Efeito da administração de FM-DMSA na hematologia e bioquímica sérica	55
6.7.1. Hematologia	56
6.7.2. Bioquímica sérica	58
6.7.2.1. Enzimas hepáticas	58
6.7.2.2. Enzimas renais	58
6.7.2.3. Níveis de ferro sérico no organismo	59
6.8. Sinais clínicos nos animais experimentais	60
VII. DISCUSSÃO	61
VIII. CONCLUSÕES	79
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
X. ANEXO	91

I. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico tem permitido reduzir o tamanho dos materiais usados no campo da ciência. A redução no tamanho de partículas da microescala para a nanoescala não somente oferece benefícios para as diversas áreas da ciência como traz, também, riscos potenciais para organismos e para o meio ambiente. Portanto, para se obter uma aplicação exitosa dos nanomateriais no campo da biociência, é essencial entender o impacto que suas propriedades, tais como: tamanho, forma, composição, propriedades de superfície, taxas de degradação e de remoção, possam ter quando em contacto com modelos *in vitro* e *in vivo* (Longmire *et al.*, 2008; Moghimi *et al.*, 2001; Chouly *et al.*, 1996).

Como foi ressaltado em trabalho publicado por Tosi e colaboradores (2008), antes de se poder utilizar nanomateriais, tais como nanopartículas (NPs), na área biomédica, devem ser realizados estudos preliminares de biodistribuição, biocompatibilidade e toxicidade, objetivando um melhor conhecimento sobre os efeitos biológicos que esses nanomateriais poderiam ter, antes de serem empregados em seres humanos. Nesse sentido, a investigação da biodistribuição, ou seja, o estudo dos locais de deposição das NPs no organismo, bem como o tempo de permanência nesses sítios, analisando-se também uma possível redistribuição, são de fundamental importância, pois permitem a obtenção de informações a respeito da capacidade de absorção, armazenamento e excreção das NPs, permitindo o conhecimento não apenas do seu comportamento no organismo, como também das interações dessas NPs com as células. Dentre os testes de biocompatibilidade, encontram-se os estudos de toxicidade aguda, subcrônica e

crônica, que visam a análise de efeitos adversos ao organismo induzidos pelas NPs a curto, médio e longo prazo (Garcia, 2005; Chouly *et al.*, 1996).

Uma das aplicações mais promissoras das NPs é na terapia do câncer. Uma vez testada a biocompatibilidade e biodistribuição de diversos tipos de NPs, estas poderiam ser acopladas com fármacos antineoplásicos e injetadas na corrente sanguínea, para em seguida, serem concentradas em um tecido alvo específico dentro do organismo. Uma vez acumuladas no local de interesse, o fármaco acoplado pode ser liberado por meio de atividade enzimática ou mudanças nas condições fisiológicas (pH, osmolaridade, temperatura, etc.) (Alexiou *et al.*, 2000) para assim tratar os tecidos afetados pelo câncer.

Considerando os pontos supramencionados, o objetivo do presente estudo foi avaliar a distribuição biológica, a biocompatibilidade e a toxicidade potencial de NPs magnéticas à base de maguemita recobertas com ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (DMSA) em um modelo de primata não-humano, visando a aplicação futura das NPs-DMSA na detecção, diagnóstico e tratamento de doenças.

II. REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. NANOTECNOLOGIA: GRANDES AVANÇOS A PARTIR DE UM MUNDO DIMINUTO.

A nanotecnologia consiste na habilidade de trabalhar nos níveis atômico, molecular e supramolecular (na escala de 1-100 nm) (L'Azou *et al.*, 2008). Na última década, a nanotecnologia tem se desenvolvido significativamente, possibilitando a invenção, caracterização, manipulação, fabricação e utilização de materiais com novas propriedades e funções, resultantes do seu tamanho nanométrico (Gupta e Gupta, 2005; Roco, 2003).

O campo da nanotecnologia é caracterizado pela sua habilidade de arranjar moléculas para formar objetos e desmontar objetos para obter moléculas. Esse rearranjo de matéria na nanoescala utiliza interações moleculares fracas, tais como: forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio, dipolos eletrostáticos e processos que requerem de um baixo consumo energético e permitem mudanças subsequentes ou reversíveis. Esse tipo de procedimento já é realizado pela natureza nos sistemas vivos e no meio ambiente, levando em consideração que todos os sistemas biológicos e os criados pelo ser humano possuem seu primeiro nível de organização na nanoescala, onde suas propriedades fundamentais e funções são definidas (Roco, 2003).

A nanotecnologia tem sido aplicada, de uma forma geral, em três grandes áreas: materiais, energética e sistemas médicos e de saúde. Segundo estimativas da Fundação Nacional de Ciência dos Estados Unidos de América, até o ano 2015, o campo da nanotecnologia se converterá em uma indústria mundial equivalente a um trilhão de dólares, sendo que o maior segmento será ocupado pelos

nanomateriais, representando 31% da renda total dos mercados de nanotecnologia global. Outros segmentos incluem o campo da eletrônica (28%), farmacêuticos (17%), manufatura química (9%), aeroespacial (6%) e outros (9%) (Willems & van den Wildenberg, 2004).

Na indústria química e de materiais nanoestruturados, a nanotecnologia tem permitido a produção de materiais ultraleves e resistentes; membranas e filtros para remover o sal da água; novos pigmentos, adesivos e substâncias resistentes à corrosão; barreiras térmicas e ópticas; materiais catalíticos de alta eficiência e produtos têxteis mais resistentes. No caso da área da eletrônica e da informática, a nanotecnologia permite diminuir o tamanho de supercomputadores; fabricar semicondutores mais rápidos e microprocessadores. Já no campo de geração energética, a nanotecnologia auxilia na criação de finas películas de fotovoltz para uma produção mais barata e efetiva de energia solar; produção de células de combustível para aplicações automotivas; células de micro-combustível para servir como energia portátil e baterias de alta capacidade, rapidamente carregáveis (Willems & van den Wildenberg, 2004; Alexiou *et al.*, 2000). As aplicações da nanotecnologia na indústria da farmacêutica e na área de saúde serão exemplificadas a seguir.

2.2. A NANOBIOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES

A nanobiotecnologia é definida como o campo que aplica técnicas e princípios biológicos e nanotecnológicos que permitem entender e transformar biosistemas, mediante a formação de novas ferramentas e sistemas integrados. Dessa maneira, a capacidade de desvendar a estrutura e a função dos sistemas biológicos no nível

da nanoescala tem estimulado pesquisas conduzidas a melhoras no campo da biologia, biotecnologia, medicina e saúde (Roco, 2003).

O campo da nanobiotecnologia oferece uma ampla plataforma tecnológica para aplicações em diversas áreas, entre elas, a indústria farmacêutica e o campo da saúde. Nessas áreas, a nanotecnologia é empregada para o desenvolvimento de novos fármacos mais efetivos, vacinas e cosméticos; vetorização de fármacos para a detecção, o diagnóstico e o tratamento de doenças; seqüenciamento de DNA; bioeletrônicos; proteção contra armas biológicas; cirurgia na nanoescala (Willems & van den Wildenberg, 2004). A nanobiotecnologia é também aplicada em outras áreas, tais como: no bioprocessamento industrial; na toxicologia pesquisando os efeitos dos nanomateriais no meio ambiente e na saúde dos seres humanos; no melhoramento do desempenho humano, integrando sistemas neurais com materiais nanoestruados, aumentando as capacidades sensoriais (Roco, 2003).

2.3. CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DAS NANOPARTÍCULAS

Um tipo de nanomaterial utilizado na área da nanotecnologia são as nanopartículas (NPs), as quais são definidas como partículas coloidais sólidas variando em tamanhos de 1 a 100 nm e que podem ser compostas à base de carbono, metais, polímeros e fosfolipídeos (L'Azou *et al.*, 2008). As NPs possuem propriedades químicas e físicas, relacionadas ao próprio tamanho nanométrico, que podem ser controladas de uma forma diferente em comparação com materiais em escalas maiores (Kreuter, 2007; Cheon e Lee, 2008).

O pequeno tamanho e a grande área superficial das NPs lhes conferem propriedades específicas. Por exemplo, as NPs exibem maior atividade biológica por massa, em comparação com partículas maiores. Esse aumento da atividade

biológica pode ser positivo e desejável, quando as NPs se envolvem em funções antioxidantes ou como carreadores de terapêuticos para a entrega de fármacos; ou podem apresentar efeitos negativos e indesejáveis, como por exemplo, toxicidade, indução de estresse oxidativo ou disfunção celular. Considerando esses efeitos negativos, surgiu a área da nanotoxicologia, uma disciplina emergente definida como a ciência das nanoestruturas que se preocupa com os efeitos dessas nos organismos vivos e no meio ambiente (Oberdörster *et al.*, 2005). Uma série de trabalhos recentes tem se dedicado precisamente ao estudo dos nanomateriais e sua potencial nanotoxicidade nos diversos órgãos, tecidos e células (Choi *et al.*, 2009; L'Azou *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Longmire *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2007; Sayes *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Oberdörster *et al.*, 2005; Chaves *et al.*, 2002).

2.4. NANOPARTÍCULAS À BASE DE FERRO E SUAS APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Partículas nanométricas formadas por metais são conhecidas como nanopartículas magnéticas (NPMs). Dentre os metais mais utilizados para a produção de NPMs são considerados os óxidos de ferro, sendo que, os mais comumente estudados incluem a maguemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, e a magnetita, Fe_3O_4 (Gupta e Gupta, 2005), devido a suas propriedades magnéticas e compatibilidade biológica (Pankhurst *et al.*, 2003).

Quando essas NPMs são estabilizadas com coberturas de superfície, surge a possibilidade de serem dispersas em solventes, formando suspensões coloidais homogêneas conhecidas como ferro-fluidos (FF) ou fluidos magnéticos (FM), os

quais possuem uma combinação única de fluidez com capacidade de interagir com campos magnéticos (Bailey, 1983).

Nos últimos anos, as NPMs têm sido empregadas no campo biomédico. Uma vantagem de se utilizar NPMs em relação a outros tipos de nanocarreadores (micelas, NPs poliméricas, lipossomas, etc.) é que suas propriedades magnéticas permitem o monitoramento e a determinação quantitativa da sua biodistribuição mediante técnicas não invasivas, tais como: a imagem por ressonância magnética e magnetometria (Koning e Krijger, 2007). A seguir, são colocadas as principais aplicações biomédicas dadas às NPMs.

2.4.1. NA VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS

A vetorização de fármacos representa uma das aplicações mais promissoras para os FMs, empregando as propriedades magnéticas das NPMs, a variedade de arranjos de sua camada estabilizante bem como características de tamanho e carga para, assim, carregar medicamentos para sítios específicos. Esse carregamento permite direcionar o tratamento às células alvo e evitar os efeitos colaterais associados a altas doses de fármacos utilizadas nos tratamentos convencionais (Alexiou *et al.*, 2006; Gupta e Gupta, 2005; Berkovisky *et al.*, 1993). Portanto, para garantir a utilização de FMs no tratamento de doenças, as NPMs devem possuir superfícies com funções interativas que permitam a associação de anticorpos ou quimioterápicos. Além disso, as NPMs devem apresentar uma alta saturação magnética, para que na hora que é aplicado um campo magnético externo, facilitar o direcionamento das NPMs para o local alvo. Também, deve ser evitada a retenção de qualquer tipo de magnetismo quando o campo magnético externo é retirado (Gupta e Gupta, 2005). De tal modo, os FMs podem ser usados para conduzir dentro

do organismo, drogas ou fármacos até os alvos específicos, empregando-se campos magnéticos externos (Pankhurst *et al.*, 2003).

A técnica de vetorização tem sido aplicada em uma série de estudos pré-clínicos, tal como o conduzido por Kumar e colaboradores (2009), que utilizaram NPMs recobertas com quitosan e conjugadas com plasmídios de DNA, que expressam proteína verde fluorescente (GFP). As partículas foram injetadas em camundongos e direcionadas, por meio de um campo magnético externo, para o coração e rim. As partículas se concentraram no coração, pulmões e rins dos camundongos e a expressão de GFP nesses órgãos foi monitorada. Esse trabalho demonstrou que um campo magnético externo simples é tudo que é preciso para vetorizar um fármaco para um local específico dentro do organismo, sem a necessidade de funcionalizar as NPMs. Em outro estudo, conduzido por Alexiou e colaboradores (2006), foram utilizadas NPs de óxido de ferro recobertas por derivados de amido com grupos fosfato capazes de ligar mitoxantrona e quimioterápico para tratar tumores em coelhos. As NPMs foram, então, administradas em coelhos com tumor e depois foi aplicado um campo magnético externo no local do tumor. O objetivo desse trabalho foi comprovar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a internalização das NPMs, as quais foram vistas no citoplasma das células tumorais.

Como observado nos trabalhos de Kumar e coautores (2009) e Alexiou e colaboradores (2006), a utilização de ímãs externos para vetorizar NPMs funcionalizadas, é um método eficiente para a entrega direcionada de fármacos. Um forte candidato que poderia se beneficiar em um futuro próximo com esse tipo de tecnologia é a terapia contra o câncer. Um dos principais motivos que impulsiona pesquisas nessa área é que a utilização da nanotecnologia no tratamento do câncer

permite maximizar o efeito do medicamento usado, minimizando seus efeitos colaterais. A ação não específica por parte dos tratamentos convencionais com quimioterápicos implica certo grau de toxicidade para os tecidos saudáveis sob condições ótimas. Dessa forma, é muito importante ter a capacidade de direcionar o antineoplásico para o local alvo para, então, reduzir no sistema os efeitos tóxicos secundários advindos da distribuição sistêmica. Isto abre a possibilidade de utilizar tratamentos com doses menores de medicamentos, o que reduz os efeitos tóxicos (Langer, 2001; Alexiou *et al.*, 2000).

Existe uma série de estratégias que podem ser empregadas para vetorizar tratamentos para o câncer, tais como: vetorização associada à angiogênese, vetorização para marcadores de proliferação celular não controlada e vetorização para células tumorais. Esses tipos de vetorização, utilizando sistemas de NPMs, sugerem o grande potencial que a entrega direcionada de fármacos tem para revolucionar o tratamento ao câncer (Byrne *et al.*, 2008).

2.4.2. NAS IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

A penetração de campos magnéticos através de tecidos e a habilidade de detectar remotamente ou manipular materiais magnéticos, têm sido alvo de pesquisa médica nos últimos séculos. Uma das mais recentes e significativas aplicações dadas às NPMs tem sido nas imagens por ressonância magnética, como modalidade não invasiva capaz de fornecer imagens anatômicas de alta resolução. O potencial das imagens clínicas pode ser expandido por meio do uso de FMs, permitindo assim melhorar a diferenciação entre os tecidos malignos e os saudáveis, realizar diagnósticos e controlar as terapias contra tumores sólidos (Sun *et al.*, 2008).

Os FMs agem como agentes modificadores da relaxação na ressonância magnética de tecidos, potencializando o contraste de imagens e, quando associados a anticorpos monoclonais, proporcionam um diagnóstico mais precoce de patologias (Lanza *et al.*, 2004). Dessa forma, a imagem por ressonância magnética associada ao FM, pode ser aplicada em vários campos, tais como: na oncologia, para o mapeamento por imagem do câncer; na detecção e diagnóstico de doenças cardiovasculares e em associação com técnicas moleculares (Sun *et al.*, 2008). Entre os estudos realizados na área molecular, Moore e colaboradores (2001) utilizaram a tecnologia de imagem por ressonância magnética para quantitativamente caracterizar a expressão de transferrina humana modificada (ETR), que atua como marcador gênico. Foram utilizadas células 9L de gliosarcoma de ratos, as quais expressam de forma estável o receptor de transferrina humano. Células ETR- não transfectadas serviram como controle. Um conjugado de transferrina e NPs de óxido de ferro monocristalino (Tf-MION) foram sintetizados para servir como sonda para monitorar a atividade da ERT. Foi observado que os tumores ETR+ internalizaram a sonda pela ação do receptor de transferrina em quantidades que podem ser detectadas pelo método de imagem por ressonância magnética.

NPMs têm sido também empregadas com técnicas de imagem por ressonância magnética para acompanhar tratamentos terapêuticos contra tumores *in vivo*, possibilitando a observação de mudanças no contraste das imagens, indicando processos de apoptose celular (danos na membrana e diminuição no volume celular) (Zhao *et al.*, 2001; Thompson, 1995). A detecção específica de células em apoptose utilizando o agente de contraste SPION tem sido demonstrada tanto *in vitro*, com

células tumorais apoptóticas isoladas, quanto *in vivo*, em tumor tratado com fármacos quimioterapêuticos (Francis *et al.*, 1997).

2.4.3. NA MAGNETOTERMOCITÓLISE

O emprego de NPMs funcionalizadas com ligantes capazes de reconhecer uma célula alvo e fazer com que essa célula internalize a NPM, permite localizar uma área de interesse para assim dirigir um fármaco para esse local. Essas NPMs funcionalizadas também apresentam a possibilidade de se associar a uma outra técnica já há muito tempo utilizada, a hipertermia. Uma vez que a célula esteja associada às partículas magnéticas, pode-se fazer com que essas partículas, pela ação de um campo magnético alternado externo ao organismo, comecem a vibrar. Essa vibração das partículas magnéticas dissipa calor nas células associadas, provocando sua lise e morte subsequente (Sawada *et al.*, 1998). As células cancerígenas são destruídas a temperaturas maiores que 43°C, enquanto que as células normais sobrevivem a temperaturas maiores (Gordon *et al.*, 1979). Tal processo, conhecido como magnetotermocitólise (morte celular por calor gerado magneticamente) representa mais uma aplicação das NPMs na área biomédica, pois permite à destruição específica da célula alvo, sem afetar as células dos tecidos vizinhos, sendo mais eficiente do que a hipertermia convencional, normalmente realizada por meio de micro-ondas, radiofrequência ou agulhas ferromagnéticas (Sawada *et al.*, 1998).

Em estudo conduzido por Kim e colaboradores (2009), foi utilizado o método da magnetotermocitólise para vetorizar sementes térmicas mediante campos magnéticos externos. Nesse estudo, foram sintetizadas NPMs sem cobertura, NPMs recobertas com quitosan e outras com cobertura de amido para, então, serem

usadas como sementes hipertérmicas. Foram utilizadas células normais L929 e células de carcinoma KB para examinar a citotoxicidade e afinidade de cada amostra. Foi observado que NPMs recobertas com quitosan são biocompatíveis e possuem uma afinidade seletiva pelas células KB. Dessa forma, o estudo concluiu que a técnica de hipertermia pode ser melhorada por meio da utilização conjunta de campos magnéticos controlados e pelo recobrimento das NPMs com quitosan.

2.4.4. NA MARCAÇÃO CELULAR E SEPARAÇÃO MAGNÉTICA

Na área da biomedicina é comumente vantajoso separar componentes biológicos específicos a partir do seu ambiente de origem para, assim, concentrar amostras para análises ou usos subsequentes. Uma forma de alcançar esse objetivo é por meio de separação magnética utilizando NPMs biocompatíveis. Um exemplo dessa aplicação é na separação de células por meio de um campo magnético, o que envolve dois processos: a marcação do componente biológico alvo utilizando material magnético e a separação dos componentes marcados por meio de um dispositivo magnético. Dessa maneira, as NPMs são recobertas, permitindo acoplar anticorpos específicos ou macromoléculas biológicas de modo que, após interagirem com as células desejadas e expostos a um campo magnético, os complexos célula-FM/anticorpo possam ser filtrados e separados do conjunto restante (Pankhurst *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 1997).

As técnicas de separação têm sido exitosamente aplicadas em uma série de pesquisas biomédicas, como por exemplo, em estudo conduzido por Liberti e coautores (2001), em que as técnicas mostraram-se altamente sensíveis para a seleção de células tumorais raras no sangue. Nessa linha, a técnica tem sido usada

na detecção de parasitas da malária em amostras sanguíneas por meio do uso das propriedades magnéticas do parasita (Paul *et al.*, 1981) ou pela marcação de eritrócitos com FMs imuno-específicos (Seesod *et al.*, 1997).

2.4.5. NA REGENERAÇÃO DE TECIDOS

As NPMs também podem ser utilizadas para a regeneração de tecidos, ao ser acopladas com proteínas, fatores de crescimento e subsequentemente, com células tronco e células progenitoras. Por exemplo, o complexo célula tronco-NPM tem a capacidade de ser enviado para locais onde há tecidos danificados, promovendo a sua regeneração. Para atingir esse objetivo, é importante contar com técnicas de marcação para ativar essas células tronco que se encontram no local de injúria. Nessa linha, Bulte e colaboradores (2001) conduziram uma pesquisa na qual foram utilizados magnetodendrimeros capazes de marcar magneticamente células de mamíferos, inclusive células tronco neurais de humanos e células tronco mesenquimais, e monitorar células tronco *in vivo*. Essa técnica mostra um alto potencial quando considerada para tratar doenças, tais como: diabetes, câncer, problemas cardíacos, Alzheimer e Parkinson.

2.5. O ÁCIDO MESO-2,3-DIMERCAPTOSUCCÍNICO (DMSA) COMO COBERTURA ESTABILIZANTE PARA AS NPMS

Em condições fisiológicas (pH 7,4 e 0,2 M NaCl), as nanopartículas de maguema não recobertas têm uma superfície eletricamente neutra. Sob essas circunstâncias, a formação de agregados resulta fácil e rapidamente. Para controlar a estabilidade coloidal durante a interação nano- $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ e célula, as NPMs são

recobertas por moléculas estabilizantes, como por exemplo o ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), uma molécula orgânica composta por dois carboxilatos e duas funções tioladas (Figura 1). No final do processo de recobrimento, o DMSA fica presente como uma camada na superfície da nano- $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ fornecendo uma carga superficial negativa (Auffan *et al.*, 2006).

A utilização do DMSA é vantajosa por uma série de motivos. Primeiro, o DMSA é um agente quelante de metais, o que facilita a sua interação com as NPMs. Além disso, o grupo $-\text{SH}$, que permanece livre na partícula, pode se acoplar com biomoléculas, aumentando a interação das NPMs com as células. Também, o DMSA é um produto não tóxico usado em uma variedade de áreas, dentre estas, na medicina para tratar casos de envenenamento por mercúrio em seres humanos (Fauconnier *et al.*, 1999).

Além do acima mencionado, o DMSA é um ligante de menor tamanho, por exemplo, quando comparado com o dextran, o que o torna vantajoso quando utilizado em condições *in vivo*, facilitando a sua bioestabilidade, difusão, processos circulatórios e diminuindo a chance de ser capturado pelo SRE (Huh *et al.*, 2005). Como ressaltado por Auffan e colaboradores (2006), os mecanismos de interação do DMSA com as NPMs condicionam a sua estabilidade durante a interação com as células.

Uma vez observadas as vantagens no uso do DMSA como estabilizante de superfície, tem sido usado como cobertura para NPMs de magnetita (Parca, 2006; Garcia *et al.*, 2005; Chaves *et al.*, 2002) e maguemita (Braz, 2008; Soler *et al.*, 2007; Auffan *et al.*, 2006), tornando-as hidrossolúveis, biocompatíveis, altamente bioestáveis e evita a agregação das mesmas (Huh *et al.*, 2005; Jun *et al.*, 2005).

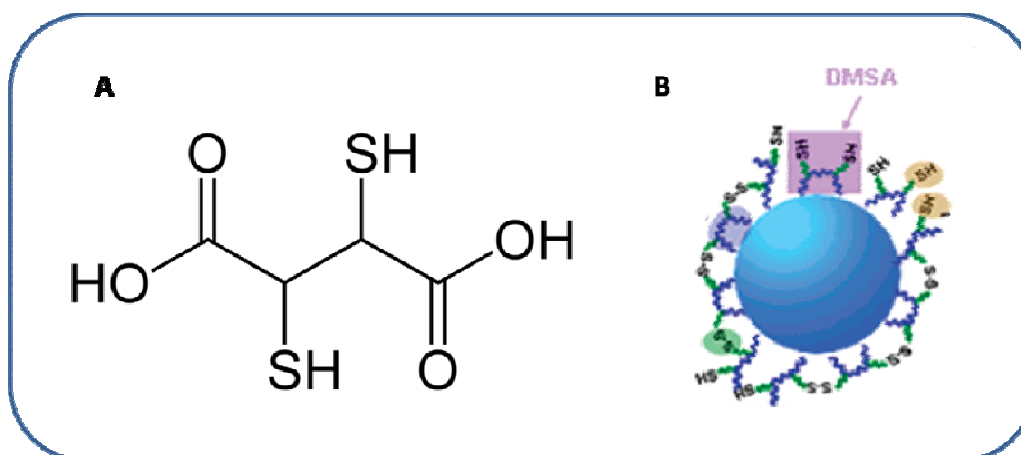


Figura 1. Fórmula estrutural (A) da molécula de DMSA, mostrando os tipos de átomos que a compõem, ligações químicas e estrutura. (B) Nanopartícula recoberta com estabilizante de DMSA. Em laranja, grupo reativo $-SH$ para bioconjugação; em roxo, ligação estável com a superfície da NPM; em verde, ligação cruzada via ponte de dissulfeto (Jun *et al.*, 2005).

2.6. ESTUDOS ANTERIORES UTILIZANDO FLUIDOS MAGNÉTICOS CONTENDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS PELO ESTABILIZANTE DMSA

Estudos anteriores também têm sido conduzidos com a finalidade de pesquisar os efeitos do FM-DMSA em modelos *in vitro* (Soler *et al.*, 2007; Auffan *et al.*, 2006) e *in vivo* (Braz, 2008; Parca, 2006; Garcia *et al.*, 2005; Chaves *et al.*, 2002).

FMs contendo NPMs à base de magnetita recobertas com DMSA têm sido estudados *in vivo* em camundongos, mostrando por meio de ressonância magnética, uma maior deposição inicial no tecido pulmonar. Porém, a partir do sétimo dia, o acúmulo de FM-DMSA é maior no fígado, sendo que atingiu um valor seis vezes maior que no pulmão após 30 dias da administração intravenosa das NPMs. O baço mostrou-se ser um órgão também depositário de NPMs-DMSA, porém, em uma

quantidade menor (Garcia, 2005; Chaves *et al.*, 2002). NPMs à base de magnetita recobertas com DMSA também foram utilizadas por Parca (2006), que analisou os possíveis efeitos causados pela presença de NPMs-DMSA no fígado de camundongos. Parca observou NPMs-DMSA no interior de hepatócitos, no conjuntivo do espaço-porta, na veia centro-lobular e em torno de ductos biliares, não tendo observado alterações morfológicas no órgão de estudo.

Considerando FMs com NPMs à base de maguemitita estabilizadas pelo seu recobrimento com DMSA, Soler e colaboradores (2007) pesquisaram as interações *in vitro* entre as NPMs e eritrócitos de camundongos, mostrando a internalização das mesmas e indicado que esse processo de internalização depende da concentração de NPs e do seu diâmetro hidrodinâmico. Auffan e colaboradores (2006), também realizaram estudos *in vitro* utilizando NPMs à base de maguemitita estabilizadas com DMSA em fibroblastos humanos, mostrando NPMs-DMSA dentro de vesículas. Não foram observados agregados de NPMs no citoplasma, nas mitocôndrias ou no núcleo. A presença das NPMs-DMSA dentro dos fibroblastos não mostrou indícios de genotoxicidade nem citotoxicidade na maior parte das células estudadas.

Uma revisão da literatura mostra que, aparentemente, não têm sido conduzidas pesquisas em camundongos com a finalidade de entender possíveis efeitos tóxicos ou a biodistribuição de FMs contendo NPMs à base de maguemitita recobertas com DMSA. Porém, NPMs à base de maguemitita, recobertas com DMSA associado com anfotericina B foram pesquisadas em camundongos fêmeas Swiss por Peixoto (2008). Nesse estudo, foram investigadas a biocompatibilidade, toxicidade e órgão especificidade de duas formulações: amostras de anfotericina B livre e de FM associado com anfotericina B (FM-AnfoB). Foi observado que o FM-AnfoB mostrou-se biocompatível, tendo sido notada a sua afinidade pelo tecido

pulmonar, indicando, assim, a sua viabilidade para uso posterior no tratamento de Pbmicose.

Em relação a estudos realizados com NPMs-DMSA à base de maguemita em animais além de roedores, Braz (2008) administrou esse tipo de FM em primatas não-humanos da espécie *Cebus spp.*. A finalidade deste estudo foi avaliar, por meio de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, possíveis alterações morfológicas no baço, linfonodo e fígado para os tempos experimentais de 12 horas e 90 dias. O baço e linfonodos mostraram morfologias normais para todos os tempos experimentais, porém, no caso do fígado, Braz observou alterações no espaço de Disse e mitocôndrias com volume aumentado para o tempo experimental de 90 dias.

Considerando os estudos acima mencionados, observou-se a necessidade de conduzir uma pesquisa que visasse entender, de uma forma mais completa, os efeitos que NPMs-DMSA à base de maguemita poderiam ter quando injetadas em primatas não-humanos. Portanto, o presente estudo se propôs estudar a biocompatibilidade, a toxicidade potencial e a distribuição biológica em todos os órgãos de primatas não-humanos da espécie *Cebus spp.*

III. JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, os estudos na área dos nanomateriais magnéticos têm possibilitado um melhor entendimento sobre suas propriedades e comportamento, permitindo que sejam utilizados na área biomédica para o desenvolvimento de novos tratamentos mais específicos e eficazes, e como alternativa para o diagnóstico precoce de vários tipos de patologias, por exemplo, o câncer.

No entanto, para que esses avanços possam ser utilizados na prática clínica, é indispensável conhecer os resultados pré-clínicos sobre a biodistribuição e biocompatibilidade que os novos nanomateriais terão ao serem administrados no organismo. Tais experimentos envolvem diferentes fases, iniciando com testes *in vitro* e continuando com pesquisas *in vivo*. De acordo com a Resolução número 01 de 13 de junho de 1988 do Conselho Nacional de Saúde, Capítulo VII, Artigo 52: “os estudos pré-clínicos devem ser realizados em três espécies de mamíferos, sendo pelo menos uma, não roedor”. De tal modo, tendo observado na literatura que já existem trabalhos nos quais foram pesquisados os efeitos de FM-DMSA em células e em camundongos, o presente trabalho se propôs testar os efeitos desses nanomateriais em primatas não-humanos. Nesse sentido, primatas não-humanos têm se mostrado relevantes modelos pré-clínicos para doenças humanas e para a investigação de procedimentos de transplantação por causa do seu alto nível de homologia gênica, fisiológica e anatômica com os seres humanos, em comparação com qualquer outro animal (Giavedoni, 2005). Além disso, como foi indicado pelo Comitê Científico Internacional Steering (Reino Unido), os primatas não-humanos são necessários para a pesquisa biomédica para garantir segurança, evitando assim a chance de respostas autoimunes e hiperimunes não esperadas. Por exemplo,

novas vacinas devem ser testadas para especificidade e segurança em sistemas imunes semelhantes ao ser humano, antes de serem usadas na clínica (Herodin *et al.*, 2005).

Um outro ponto que vale a pena ressaltar é em relação ao número de animais utilizados para conduzir o presente estudo. O fato de ter escolhido primatas não-humanos como modelo experimental, implica, de forma geral, trabalhar com um número de indivíduos baixo, pois, sabe-se que se trata de animais nobres e de difícil acesso. Além disso, segundo a Resolução número 01 de 13 de junho de 1988 do Conselho Nacional de Saúde, Capítulo VII, Artigo 52: “os estudos devem ser planejados de maneira a obter o máximo de informações utilizando-se o menor número possível de animais”.

No nosso conhecimento, a literatura relata unicamente um trabalho conduzido por Heidel e colaboradores (2007), no qual foram administradas nanopartículas contendo subunidades M2 da redutase ribonucleotídeo em uma espécie de primata não-humano. Dessa forma, o presente trabalho somado aos resultados obtidos por Braz (2008), representam as únicas pesquisas nas quais têm sido estudados os efeitos de nanopartículas magnéticas quando injetadas em primatas não-humanos. Vale ressaltar que tanto o presente estudo como o trabalho de Braz (2008) representam trabalhos complementares, do mesmo grupo de pesquisa, nos quais foram utilizados os mesmos indivíduos experimentais e a mesma amostra de FM-DMSA, porém, os focos de estudo foram diferentes. Assim, o presente trabalho se propôs estudar um tipo de nanobiomaterial, FM-DMSA, e analisar a sua biocompatibilidade, possível toxicidade e biodistribuição ao ser administrado em macacos-prego, um primata neotropical não-humano.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a biodistribuição e a biocompatibilidade de FM-DMSA em um modelo animal de primata não-humano (macaco-prego, *Cebus spp.*) mediante o uso de técnicas histológicas, hematológicas e bioquímicas do soro.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Determinar a biodistribuição tecidual de NPMs nos períodos de doze horas e trinta e noventa dias após a administração intravenosa de FM-DMSA.
- B) Avaliar a localização ultra-estrutural de NPMs recobertas com DMSA no tecido pulmonar.
- C) Verificar a presença de possíveis alterações morfológicas nos tecidos de estudo, provocadas pela administração do FM-DMSA no organismo dos animais experimentais.
- D) Analisar possíveis danos hepáticos e renais advindos da presença do FM-DMSA no organismo, mediante exames de bioquímica de soro.
- E) Monitorar os níveis de ferro sérico após injeção de FM-DMSA no organismo.

V. MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO MAGNÉTICO CONTENDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM O ESTABILIZANTE DMSA

Foram utilizadas amostras de FM contendo nanopartículas de maguemita (γ - Fe_2O_3) estabilizadas pelo recobrimento com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) em meio aquoso (Figura 2). As amostras foram produzidas no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiânia (UFG), pela aluna Eloiza S. Nunes, membro da equipe de pesquisa da Professora Dra. Emília Lima.

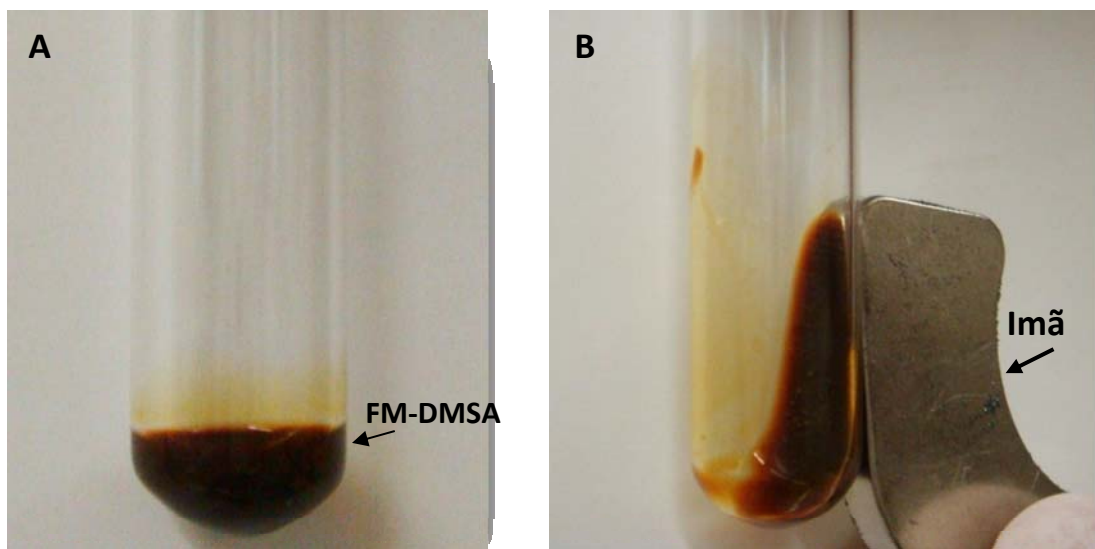


Figura 2. Aspecto e comportamento magnético do FM-DMSA. A) Amostra de FM recoberta com DMSA. **B)** Comportamento magnético do fluido. Observar o deslocamento do fluido em direção ao campo magnético externo (ímã).

As características do FM-DMSA utilizado neste trabalho se encontram detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características do FM-DMSA utilizado neste trabalho. Fonte: Eloiza S. Nunes, aluna do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiânia (UFG).

Composição das nanopartículas	Maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)
Solvente	água
Diâmetro médio de cada nanopartícula (conforme observado por difração de raios-x (DRX))	5,3 nm
Número de nanopartículas/mL	$6,5 \times 10^{16}$
Concentração de ferro	18,7 mg/mL
Cobertura Estabilizante	Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA)
Cor	Marrom escuro

5.2. MODELO ANIMAL

Com a finalidade de avaliar a biocompatibilidade e biodistribuição do FM-DMSA em um sistema biológico, foram utilizados primatas não-humanos da espécie *Cebus spp.* (macacos-prego). Para a análise histológica, foram utilizados dois machos e duas fêmeas juvenis (idade aproximada de 18 meses), sadios e com peso entre 1.500 a 2.000 g (Figura 3). Esses animais foram doados pelo Zoológico de Carajás, no Pará para o Centro de Primatologia da Universidade de Brasília, com licença número 005/2007 emitida pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Para pesquisar os possíveis efeitos na hematologia e bioquímica sérica decorrentes da presença de FM-DMSA no organismo, foi utilizado um quinto macaco-prego juvenil, macho, morador

permanente do Centro de Primatologia, com um peso de 2.455 g no início do experimento.

No lapso entre a chegada dos animais ao Centro de Primatologia e sua eutanásia, os mesmos foram mantidos em uma gaiola apropriada, situada no setor de quarentena do Centro de Primatologia da Universidade de Brasília. Durante a sua permanência nesse local, os macacos foram alimentados uma vez ao dia com uma dieta à base de frutas, ração, tenébrions, ovos, legumes e vegetais e o fornecimento de água foi *ad libitum*. Além disso, durante esse período, os animais estiveram sob os cuidados do veterinário e tratadores do Centro, que se mantiveram atentos aos sinais clínicos dos macacos e ao possível aparecimento de doenças. Cabe ressaltar que todos os procedimentos realizados no presente trabalho, foram aprovados anteriormente à sua execução pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília, no dia 27 de fevereiro de 2007 (Anexo 1).



Fonte: Maria Clotilde Henriques Tavares

Figura 3. Foto ilustrativa de um exemplar de macaco-prego (*Cebus spp.*) juvenil no seu viveiro no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília.

5.3. PROCEDIMENTOS

5.3.1. ADMINISTRAÇÃO DE FM-DMSA NOS ANIMAIS

Os animais foram designados aleatoriamente, tendo assim uma fêmea como animal controle (AC) e uma fêmea e dois machos como animais experimentais que receberam uma única injeção intravenosa de FM-DMSA, administrada via veia femoral. A seguir, foram eutanasiados 12 horas (AE12H), 30 dias (AE30D) e 90 dias (AE90D) após injeção. No caso do animal controle, não foi administrado FM-DMSA nem nenhum outro tipo de substância.

A dose de FM injetada nos macacos foi calculada com base em estudos prévios conduzidos por pesquisadores do grupo, que injetaram FM-DMSA em camundongos, considerando-se assim: a concentração inicial do FM-DMSA, o peso em gramas de cada animal, a concentração final do FM já diluído em solução salina e o volume total injetado. Desta forma, todos os macacos experimentais receberam 1 mL de FM-DMSA diluído em solução salina, contendo $8,25 \times 10^{11}$ nanopartículas/g de peso corporal (Tabela 1).

5.3.2. EUTANÁSIA E NECROPSIA DOS SUJEITOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS

Após anestesia por injeção intramuscular de quetamina e xilazina aplicada na dose de 10 e 1 mg/kg, respectivamente, os animais foram eutanasiados mediante a administração de tiopental endovenoso, o qual produziu parada cardio-respiratória. Uma vez constatado o óbito do animal, procedeu-se à necropsia, sendo retirados os seguintes órgãos: baço, cerebelo, cérebro, coração, fígado, intestinos delgado e grosso, pâncreas, pulmão e rim.

Cabe ressaltar que todos os procedimentos de eutanásia e necropsia foram realizados por, e sob, a supervisão de veterinários credenciados pelo Conselho Regional de Medicina Veterinária do Distrito Federal (CRMV-DF). Larissa Borges Cardozo (CRMV-DF 1967), residente do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, esteve encarregada de realizar os procedimentos de anestesia e eutanásia e Danilo Teixeira Simonini (CRMV-DF 1664), veterinário do Centro de Primatologia da Universidade de Brasília, teve a função de administrar o FM, realizar a coleta de sangue e a necropsia de todos os animais.

5.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

5.4.1. PREPARAÇÃO DO MATERIAL E PROCESSAMENTO PARA VISUALIZAÇÃO MEDIANTE MICROSCOPIA DE LUZ

Imediatamente após a retirada de cada órgão, os mesmos foram rapidamente lavados com solução salina 0,9% e posteriormente fixados. Um estudo preliminar determinou que os rins, corações e pulmões são melhor fixados com paraformaldeído 4% em PBS por três horas à temperatura ambiente e os demais órgãos coletados são mais bem fixados com fixador Davidson (9 partes de solução Davidson estoque- 400 mL de glicerina, 800 mL de formaldeído 37%, 1200 mL de etanol 95%, 1200 mL água destilada- e uma parte de ácido acético glacial (Shaw & Battle, 1957)) durante 24 horas à temperatura de 4°C.

Após a fixação, as amostras foram desidratadas com etanol, em uma série de concentrações crescentes (70, 80 e 90%) e três vezes em etanol absoluto. Em seguida, as amostras foram diafanizadas ao serem colocadas em uma solução 1:1 de álcool e xilol, seguido por três banhos em xilol puro. Para a inclusão, o material

foi submetido a três banhos de parafina Histosec[®] (Merck, Alemanha) em estufa a 58°C. Todos os banhos do material nas soluções e na parafina tiveram uma duração de 1 hora cada. Por último, o material foi incluído em blocos de Histosec[®] moldados por barras de Leuckhart. Após a solidificação dos blocos de parafina, foi utilizado um micrótomo Leica[®] modelo RM2125RT para realização de microtomia. O tipo de corte realizado foi o semi-seriado, definido aqui pela obtenção inicial de quatro cortes, cada um com uma espessura de 5 µm, colocados em uma lâmina de vidro. Em seguida, desprezaram-se 10 cortes, cada um com espessura de 10 µm. Após, cortaram-se mais quatro cortes com espessura de 5 µm cada, os quais foram colocados em outra lâmina de vidro, produzindo para cada órgão uma média aproximada de cinco lâminas controle e outras cinco para cada tempo experimental. Todas as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C, durante 48 horas, para garantir uma melhor aderência dos cortes.

5.4.2. COLORAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Uma vez obtidos os cortes histológicos, procedeu-se às colorações destes pelos métodos de hematoxilina e eosina (H&E) e de Perls ou azul da Prússia, o último empregado com o objetivo de identificar, em azul, depósitos intracitoplasmáticos e intersticiais de Fe⁺³ e visualizar em coloração rosa os núcleos e o citoplasma (Prophet *et al.*, 1992).

As lâminas selecionadas foram submetidas a um processo de desparafinização e hidratação, com três banhos em soluções de xileno (um minuto cada), três de soluções de etanol 100% (um minuto cada), etanol 90%, 80% e 70% (um minuto cada). Para a coloração com H&E, as lâminas foram colocadas primeiro

no corante hematoxilina, lavadas por um minuto em água corrente e, posteriormente, coradas em eosina. Os tempos de coloração tanto na hematoxilina como na eosina variaram dependendo do tipo de tecido sendo corado e de quão frescas as soluções de coloração eram.

Para a coloração pelo método de Perls (Perls, 1867), as lâminas foram colocadas em água destilada, duas vezes (um minuto cada), solução 1:1 de ferrocianeto de potássio 10% e ácido clorídrico 20% por 30 minutos, um banho de 30 segundos em água destilada; contra-coradas com solução de vermelho neutro 1% por cinco minutos e submersas em água corrente por dois minutos.

Depois da coloração por qualquer um dos métodos descritos acima, o material foi desidratado em uma concentração crescente de etanol 70%, 80%, 90%, 100% (três vezes) e xileno puro (três vezes), geralmente menos de meio minuto nos banhos de etanol (principalmente para o método de Perls) e um minuto no último banho de etanol e nos de xileno. Após o último banho de xileno, as lâminas foram recobertas com lamínulas utilizando-se Entellan[®] (Merck, Alemanha) como meio de montagem e colocadas para secar em estufa, a 37°C, por 24 horas.

5.4.3. OBSERVAÇÃO DO MATERIAL HISTOLÓGICO

As lâminas histológicas foram analisadas ao microscópio de luz da marca Leica[®] modelo DM1000 e documentadas digitalmente mediante o uso de câmara Leica[®] DFC280, acoplada ao microscópio, e o *software* Leica[®] Application Suite Version 2.7.0 R1 Copyright© 2003-2007, Leica[®] Microsystems Switzerland Limited.

5.5. PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA VISUALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A utilização do MET teve como objetivo determinar a citolocalização do FM-DMSA no tecido pulmonar, assim como verificar as possíveis alterações ultraestruturais advindas pela presença do FM no tecido.

De tal modo, amostras de tecido pulmonar colhidas durante a necropsia foram imediatamente seccionadas em pedaços de aproximadamente 1 mm³ e colocadas em um tubo plástico do tipo Eppendorf® de 1,5 mL contendo aproximadamente 1 mL de solução fixadora de Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose, 0,5 mM de cloreto de cálcio e 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2). As amostras foram mantidas durante 12 horas à temperatura de 4°C. Posteriormente, foram efetuadas três lavagens de 10 minutos cada em 0,1M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2). A etapa de pós-fixação foi feita por meio da adição de tetróxido de ósmio 1% 1:1 (v/v) à solução de ferricianeto de potássio 0,08% e cloreto de cálcio 5 mM, diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante uma hora e mantendo as amostras protegidas da luz. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 10 minutos, sendo então submetidas à contrastação *in block* com acetato de uranila 0,5% diluído em água destilada e protegido da luz, durante duas horas. Depois, o material foi lavado duas vezes com água destilada, por 10 minutos cada.

A seguir, foi iniciado o processo de desidratação em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90%) por 15 minutos cada e três banhos de acetona absoluta por 10 minutos cada. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas com mistura crescente de resina Spurr® e decrescente de acetona iniciando a mistura na proporção (acetona:resina) de 2:1, 1:1, 1:2 e resina pura. Cada infiltração

teve uma duração de 12 a 20 horas sendo a última realizada com a resina Spurr[®] pura, durante seis horas e mantendo o tubo plástico tipo Eppendorf[®] aberto para facilitar a evaporação da acetona remanescente. Em seguida, as amostras foram incluídas em fôrmas apropriadas de silicone, contendo resina Spurr[®] pura. O material foi mantido em estufa à temperatura de 57°C, por aproximadamente 72 horas para, assim, permitir a polimerização da resina.

Posteriormente, o material foi seccionado em ultramicrótomo Reichert Supernova[®], utilizando-se navalhas de vidro para a obtenção de cortes semi-finos (2-5 µm de espessura) e navalha de diamante para cortes ultrafinos (80-100 nm). Os cortes ultrafinos foram coletados em telas de cobre de 300 *mesh* e contrastados com acetato de uranila 3% diluído em água destilada por um lapso de 30 minutos. Depois, foram lavados em água destilada, submetidos a banho em solução de citrato de chumbo saturado por 10 minutos e novamente lavados em água destilada. Vale ressaltar que toda a etapa de contrastação foi protegida da luz para dessa forma evitar a precipitação dos sais de metais sobre o material.

Finalmente, o material foi analisado no Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo Jeol[®] 1011C operado a 80 kV para observação; fotografia e captura de imagens pela câmara Gatan Digital Micrograph[™] 3.11.0 Copyright© 1996-2006. As imagens digitais capturadas foram gravadas em formato TIFF.

5.6. ANÁLISE HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO SANGUE CONTROLE E APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE FM-DMSA

Um quinto macaco-prego juvenil macho foi usado para efetuar os estudos hematológicos e de bioquímica sérica. Esse sujeito experimental não foi sacrificado no final do experimento, possibilitando assim futuras avaliações, além das programadas para constar do presente trabalho. O objetivo deste experimento foi o de avaliar qualquer tipo de dano hepático ou renal que poderia advir como consequência da presença do FM-DMSA no organismo do macaco. Além disso, pretendeu-se monitorar os níveis de ferro no soro do animal. Portanto, inicialmente, foi realizada uma coleta sanguínea controle, com o intuito de fazer uma avaliação geral do indivíduo e obter os parâmetros de referência do animal. Caso os resultados estivessem dentro da normalidade, de acordo com dados por Wirz e colaboradores (2008), o animal seria então considerado apto para ser utilizado como modelo experimental nessa parte do estudo.

De tal forma, o macaco recebeu uma injeção intravenosa única de FM-DMSA, na mesma dose ($8,25 \times 10^{11}$ nanopartículas/g de peso corporal) administrada nos demais animais experimentais que participaram da parte histológica do presente trabalho. Em seguida, foram coletadas, via veia femural, amostras de sangue 12h e 7, 15, 30, 60, 90 dias após a administração do FM. Para cada coleta de sangue controle e experimental, o animal foi mantido em jejum de aproximadamente 15 horas e era seguidamente anestesiado via inalatória com isoflurano (Isoforine da Cristália, Brasil). Em cada coleta, foram colhidos 5 mL totais de sangue, a partir dos quais, separaram-se 2 mL em um tubo Vacuette® com anticoagulante EDTA, para realizar o hemograma e 3 mL foram colocados em um tubo Vacuette® com gel separador para determinar os valores bioquímicos do soro. Ambos os tubos foram

colocados em uma caixa de isopor contendo gelo e dentro do lapso de uma hora foram levados ao laboratório de análises clínicas SABIN, situado em Brasília.

Foram medidos parâmetros hematológicos totais (contagem total de eritrócitos, contagem de leucócitos, hematócrito, hemoglobina), realizados por método de automação Cell-Dyn 3500 (Abbott Diagnostics, Estados Unidos de América). Nas análises bioquímicas, foi determinado o nível de bilirrubina total, bilirrubina direta e indireta, transaminase pirúvica (ALT), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina, transaminase oxalacética (TGO), desidrogenase láctica, creatinina e ferro sérico, todos realizados mediante analisador bioquímico ADVIA 1650 (Bayer HealthCare, Estados Unidos de América). A tabela 2 mostra o tipo de método utilizado para mensurar cada um dos parâmetros de análise bioquímica supracitados. Vale ressaltar que a escolha do método para mensurar os diversos parâmetros solicitados e sua possível modificação ou otimização é responsabilidade do laboratório de análises clínicas SABIN.

Para poder interpretar e analisar os resultados obtidos no hemograma e bioquímica sérica do macaco-prego, *Cebus spp.*, juvenil foram utilizados os resultados obtidos de suas próprias amostras controle e os valores de referência obtidos no trabalho publicado por Wirz e colaboradores (2008), onde foram determinados valores padrão de hematologia e bioquímica do soro para animais juvenis da espécie *Cebus apella* (N=17).

Tabela 2. Especificação do tipo de método usado pelo laboratório de análises clínicas Sabin para mensurar os vários parâmetros bioquímicos do soro.

Parâmetro bioquímico mensurado	Método de mensuração utilizado
Bilirrubina total e frações	Colorimétrico
Transaminase piruvica (ALT)	Cinético otimizado
Gama Glutamil Transferase (GGT)	Cinético colorimétrico
Fosfatase alcalina	Cinético otimizado U.V.
Transaminase oxalacética (TGO)	Cinético otimizado U.V.
Desidrogenase láctica	Cinético otimizado
Creatinina	Colorimétrico (Jaffe)
Ferro sérico	Ferrozine

VI. RESULTADOS

RESULTADOS

6.1. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PULMÃO

A morfologia do pulmão, assim como a distribuição dos aglomerados de nanopartículas magnéticas contidas no FM-DMSA nesse órgão foram avaliadas mediante ML e MET. A figura 4 mostra fotomicrografias de pulmões do animal controle e dos animais experimentais sacrificados 12 horas, 30 e 90 dias após administração do FM-DMSA.

Tanto as amostras de pulmão do animal controle, como as experimentais, mostraram uma boa preservação do tecido e não foram visualizadas alterações morfológicas, tais como: anormalidades nas células, locais de necrose, hemorragias ou qualquer comprometimento estrutural do órgão (Figuras 4 A-D). Porém, no pulmão AE12H e AE90D foram vistos alguns processos inflamatórios de pequeno porte, principalmente próximos aos epitélios do brônquio e bronquíolo; e nas amostras AE90D também foram vistos em alguns alvéolos. Esses processos inflamatórios estavam ou não associados com a presença de NPMs (Figura 5). No caso da amostra AE30D também foram vistos indícios de processos inflamatórios próximos ao epitélio cúbico do bronquíolo, porém, não se encontravam associados às NPMs.

Em relação à presença de NPMs no tecido, para todos os tempos experimentais, foram achadas praticamente em todas as estruturas pulmonares (Figura 6). No caso do material AE12H corado com H&E, foi vista grande quantidade de aglomerados de NPMs em todas as estruturas pulmonares: paredes alveolares, alvéolos, na cartilagem hialina (tanto nos condrócitos, como na matriz e pericôndrio), na parede de vasos, junto com hemácias dentro de vasos, em algumas regiões

perivasculares, no músculo liso da parede do brônquio, no tecido conjuntivo e no epitélio cúbico do bronquíolo, no epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado do brônquio, em algumas glândulas seromucosas, no interior de alguns macrófagos e no lúmen do brônquio.

Ao analisar as lâminas AE30D coradas com H&E e Perls, foi observada a presença de muitos aglomerados pequenos de NPMs dispersos (Figura 4 C) em todas as estruturas pulmonares supracitadas para AE12H. Já os resultados para as lâminas de AE90D demonstraram, na sua maioria, que as NPMs encontravam-se na forma de poucos aglomerados (Figura 4 D).

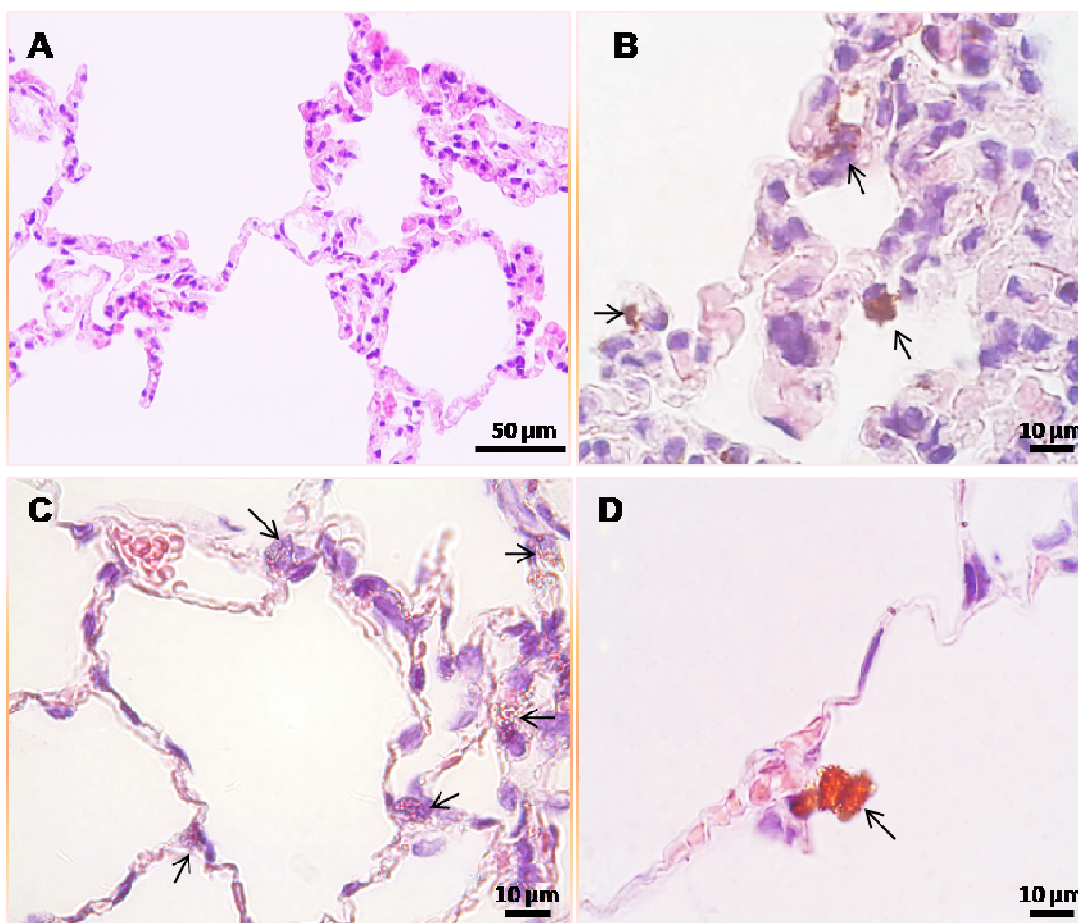


Figura 4. Fotomicrografias de seções de pulmões de macaco-prego. Controle (A) e 12 horas (B), 30 (C) e 90 dias (D) após administração do FM-DMSA. Observar a presença de NPMs indicadas por setas. Notar que nos menores tempos experimentais, existem menos aglomerados de NPMs no tecido e que conforme avançaram os tempos experimentais, o acúmulo de NPMs tornou-se mais raro. **Coloração:** H&E

Além disso, as lâminas correspondentes para o tempo experimental 90 dias diferem em relação aos demais tempos experimentais, no sentido de que os aglomerados observados foram vistos em um número menor de estruturas, não sendo encontrados nos condrócitos, nem no epitélio cúbico do bronquíolo. De tal forma, pode-se dizer que foi observada uma clara correlação direta entre a quantidade de NPMs presentes nos tecidos e o tempo experimental, mostrando que conforme o tempo experimental aumentou, menos aglomerados de NPMs foram vistas e estavam presentes em um número menor de estruturas pulmonares.

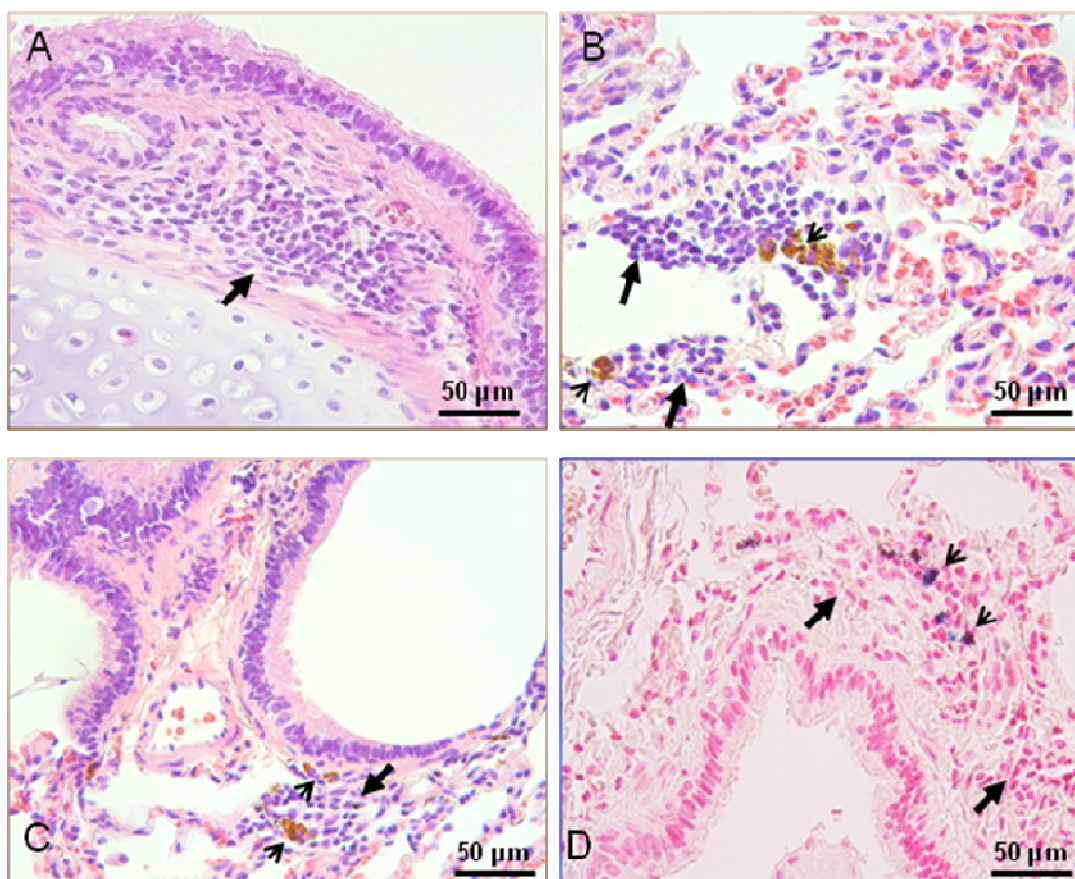


Figura 5. Fotomicrografias de secções de tecido pulmonar de AE90D, mostrando com setas grossas a presença de processos inflamatórios em: **A)** tecido conjuntivo próximo ao epitélio pseudoestratificado do brônquio; **B)** parênquima pulmonar; **C e D)** no tecido conjuntivo próximo ao epitélio cúbico do bronquíolo. Em **A**, o foco inflamatório não se encontra associado às NPMs, enquanto que em **B-D**, a alteração morfológica conta com a presença de NPMs em coloração marrom castanho (B e C) e azul (D) (seta finas e curtas). **Coloração:** A-C= H&E; D= Perls.

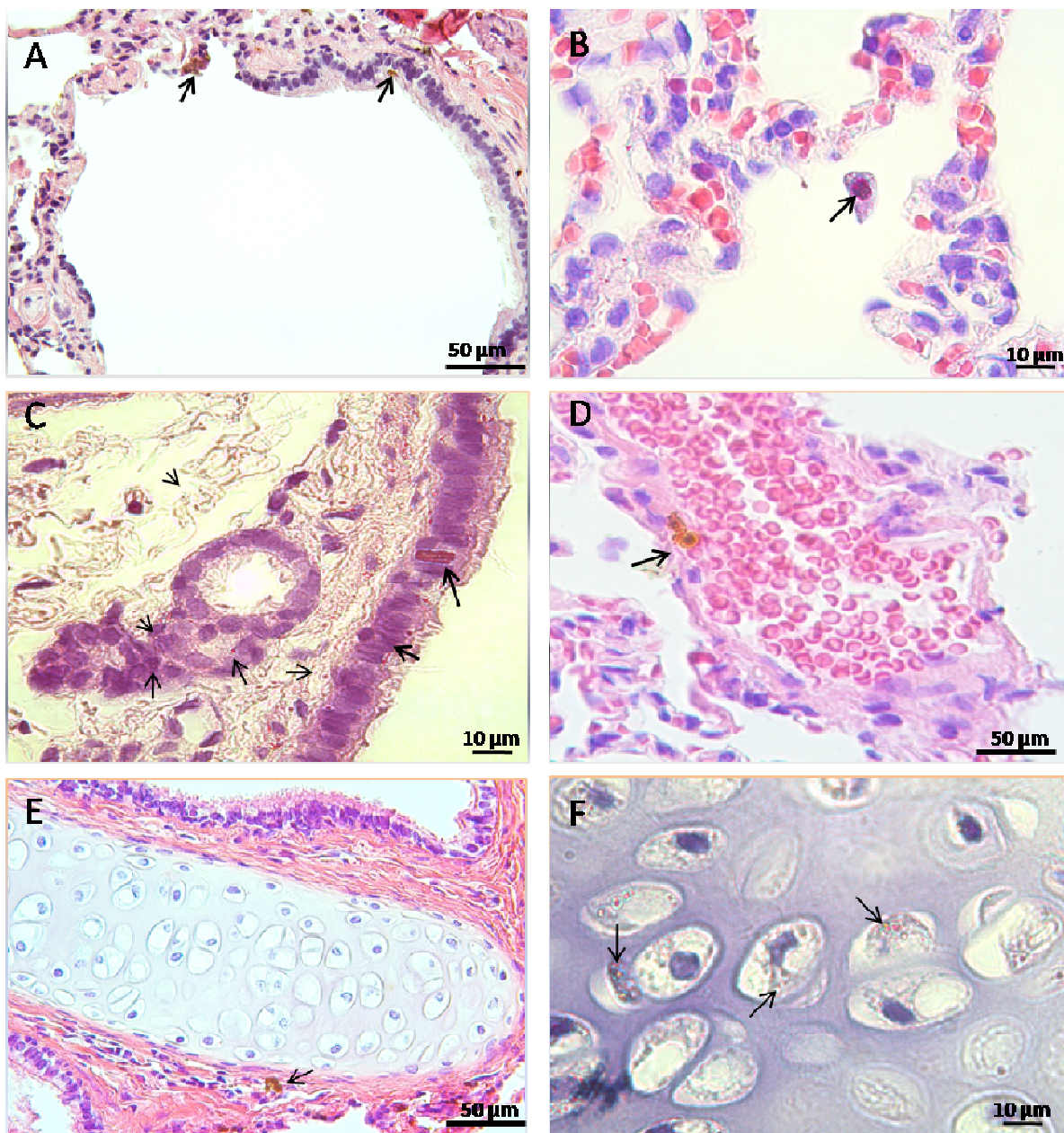


Figura 6. Secções histológicas de pulmão de macaco-prego mostrando aglomerados de NPMS (setas) em diversas estruturas pulmonares para diferentes tempos experimentais. **A)** NPMS no epitélio cúbico do bronquíolo (AE12H); **B)** NPMS fagocitadas por um macrófago no alvéolo (AE30D); **C)** NPMS no epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado do brônquio, no tecido conjuntivo e nas glândulas seromucosas (AE30D); **D)** NPMS possivelmente no endotélio do vaso sanguíneo (AE90D). **E)** NPMS em condrócitos e matriz da cartilagem hialina (AE30D); **F)** NPMS no pericôndrio (AE12H). **Coloração:** H&E.

6.2 ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO E BIOCAMPATIBILIDADE DE FM-DMSA NO TECIDO PULMONAR MEDIANTE MET

A visualização da ultraestrutura de lâminas controle (Figura 7 A e B) e experimentais [Figura 7 (C e D), 8 e 9] do tecido pulmonar de macaco-prego revelaram uma morfologia normal, apresentando espaços alveolares divididos por septos interalveolares. No interior dos septos, foram visualizados inúmeros capilares sanguíneos, alguns densamente compactados e outros com presença de eritrócitos, plasma e leucócitos no seu interior. Os capilares se encontravam recobertos em ambos os lados por uma barreira hematoaérea, composta mais externamente pelo epitélio alveolar com pneumócitos do tipo I e pneumócitos do tipo II, uma lâmina basal e mais internamente, o capilar estava diretamente recoberto por endotélio. No parênquima pulmonar, também foi possível observar tecido conjuntivo frouxo com fibras colágenas, sendo mais espessas em algumas regiões.

A análise da ultra-estrutura de todas as amostras experimentais revelou a presença de aglomerados de NPMs de diversos tamanhos. No caso da amostra AE12H, esses aglomerados foram observados junto com fibras colágenas localizadas no parênquima pulmonar (Figura 7 C) e dentro de vesículas em células endoteliais (Figura 7 D). No caso da amostra AE30D, os aglomerados de NPMs-DMSA foram visualizados no citoplasma de células do endotélio (aglomerado não envolto por membrana) (Figura 8 A); dentro de lisossomos localizados provavelmente no citoplasma de plaquetas (Figura 8 B); em macrófago alveolar, tendo aglomerados tanto livres no seu citoplasma como envoltos por membrana (Figura 8 C) e no interior de hemácias (Figura 8 D). Já na amostra AE90D, a análise revelou a presença de aglomerados de NPMs dentro de lisossomos situados no

citoplasma de prováveis plaquetas (Figura 9 A) e no interior de vacúolo em macrófago alveolar (Figura 9 B).

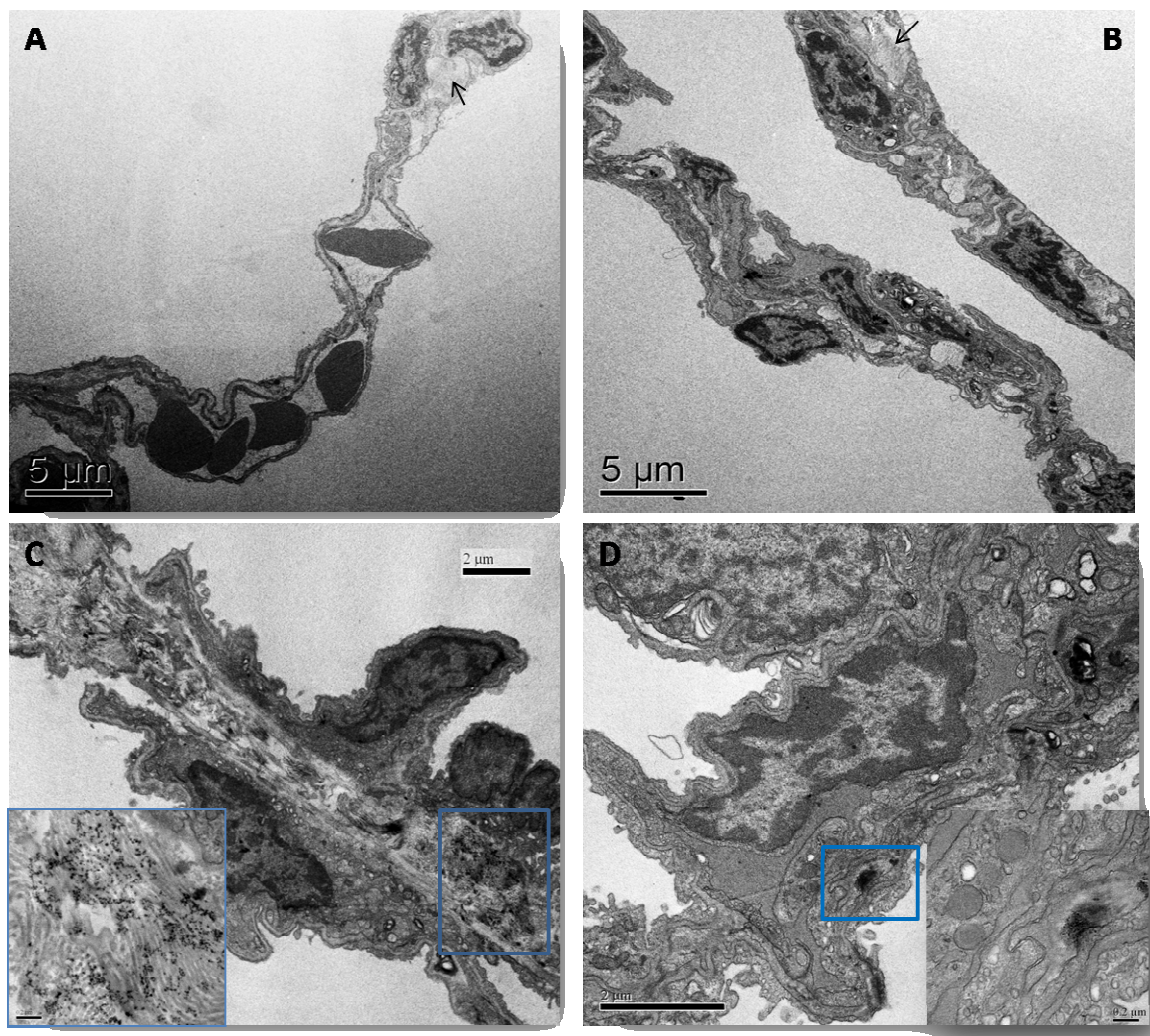


Figura 7. Eletronmicrografias de pulmão de macaco-prego, controle (A e B) e 12 horas após a administração de FM-DMSA (C e D). Em A e B, observar a integridade e morfologia normal do tecido, mostrando espaços alveolares divididos por septos interalveolares recobertos em ambos lados pela barreira hematoaérea e internamente contam com capilares sanguíneos com eritrócitos, plasma e leucócitos. Notar no parênquima pulmonar a presença de tecido conjuntivo frouxo com fibras colágenas, sendo mais espessas em algumas regiões. Em C, presença de FM associado com fibras colágenas no parênquima pulmonar. Em D notar FM dentro de vesículas em células endoteliais. **Barra de escala:** A e B: [5 μm]; C e D: [2 μm e na imagem em destaque = 0.2 μm].

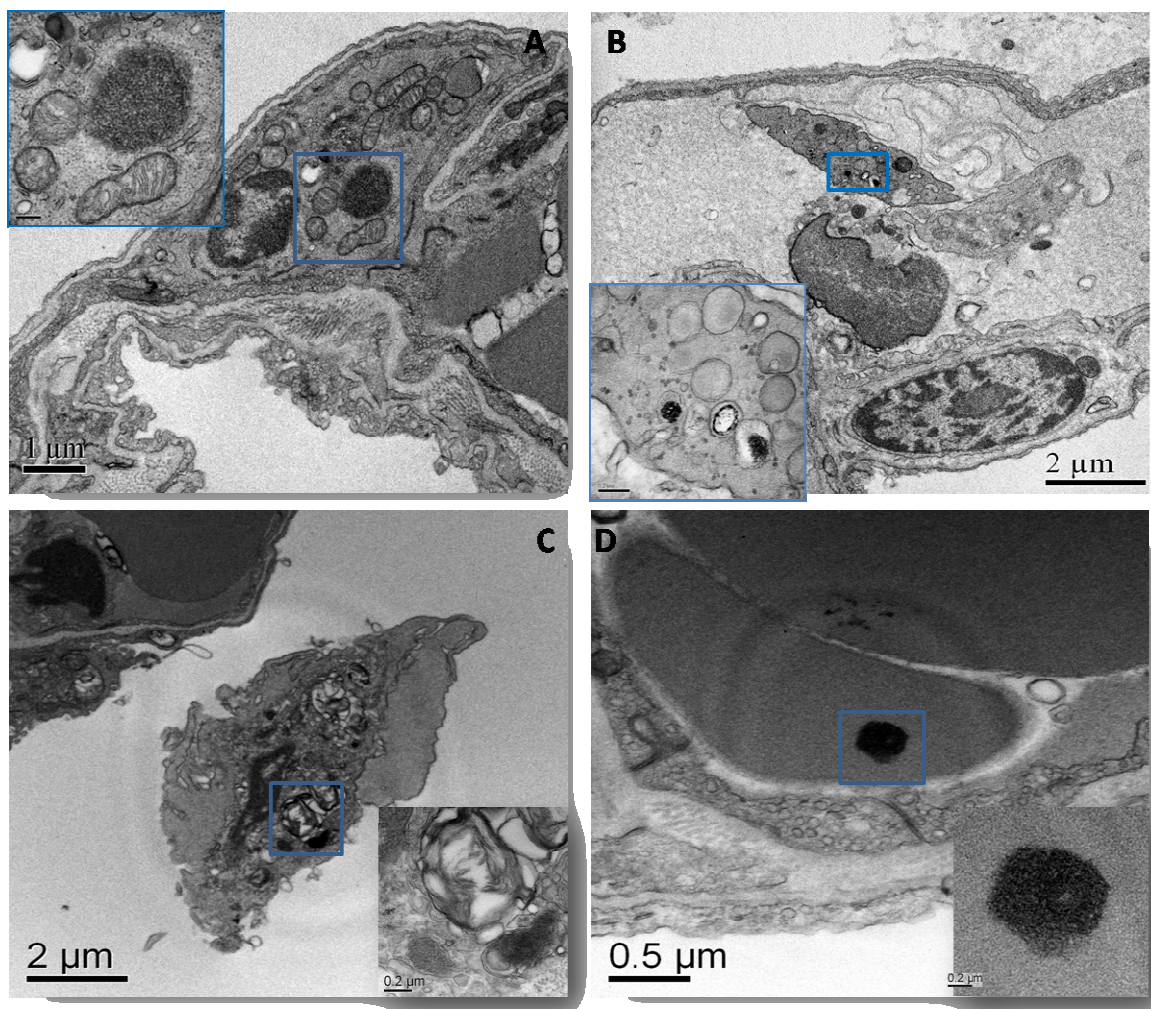


Figura 8. Micrografias eletrônicas de pulmão de macaco-prego 30 dias após a administração de FM-DMSA. Foi observada a presença de aglomerados de NPMs em: citoplasma de células do endotélio (A); dentro de lisossomos no citoplasma de plaquetas (B); macrófago alveolar, tendo aglomerados tanto livres no seu citoplasma como envoltos por membrana (C); e no interior de hemácias (D). **Barra de escala:** A: [1 μm e na imagem em destaque = 0.2 μm]; B e C: [2 μm e na imagem menor = 0.2 μm]; D: [0.5 μm e na imagem em destaque = 0.2 μm].

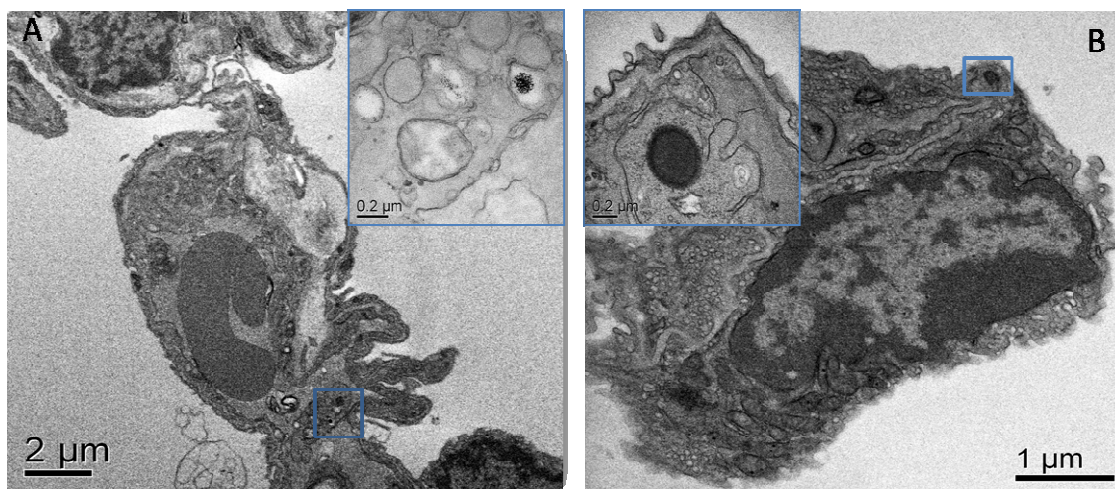


Figura 9. Eletronmicrografias de pulmão de macaco-prego 90 dias após a administração de FM-DMSA. Aglomerados de NPMs foram visualizados dentro de lisossomos situados no citoplasma de prováveis plaquetas **(A)** e no interior de vacúolo em macrófago alveolar **(B)**. **Barra de escala:** **A:** [2 µm e na imagem menor, = 0.2 µm]; **B:** [1 µm e na imagem em destaque, = 0.2 µm].

6.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO

O fígado do animal controle apresentou suas características histológicas típicas normais. Em menor aumento, foi evidente a organização do fígado em unidades estruturais conhecidas como lóbulos hepáticos, apresentando um formato mais ou menos hexagonal, intimamente justapostos uns aos outros. Nos cantos dos lóbulos, foram observados espaços porta que apresentavam no seu interior uma vênula e uma arteríola (ramos da veia porta e da artéria hepática, respectivamente), um ducto biliar e vasos linfáticos, envoltos por uma bainha de tecido conjuntivo. No centro de cada lóbulo, observou-se uma veia centrolobular. Cada lóbulo estava constituído por cordões de hepatócitos dispostos radialmente e separados por

sinusóides hepáticos, com suas paredes revestidas por células endoteliais típicas, além da presença de células de Kupffer no seu interior (Figura 10 A e B).

Assim como no material controle, nas lâminas AE12H e AE30D, a morfologia hepática mostrou-se inalterada, não tendo sido observado qualquer indício de processo inflamatório ou comprometimento estrutural do órgão. Cabe ressaltar que, tanto os sinusóides, como os espaços perisinusoidais de Disse mostraram uma largura normal. Ao mesmo tempo, assim como na amostra controle, os hepatócitos das amostras experimentais apresentaram um aspecto heterogêneo (Figura 10 C e D). Já para a amostra obtida 90 dias após a administração do FM-DMSA, foi claramente observado um grande espaço entre o cordão de hepatócitos e o endotélio sinusoidal, indicativo que houve um aumento na área ocupada normalmente pelo espaço de Disse (Figura 10 C e D).

A coloração de Perls permitiu identificar em azul todos os depósitos de Fe (III) presentes no tecido hepático. Em todas as lâminas experimentais, foram vistos depósitos azuis nos hepatócitos (Figura 11 B-F), principalmente nos mais próximos aos espaços porta e veias centrolobulares (Figura 11 C, D), sendo mais intensamente corados em AE12H (Figura 11 B) e distribuídos em grande parte do tecido em AE30D (Figura 11 C). Nas lâminas experimentais de fígado, depósitos azuis foram também observados no tecido conjuntivo interlobular, intensamente corado em torno de alguns ductos biliares no caso da amostra AE30D (Figura 11 C). Para esse mesmo tempo experimental, também foram observados alguns aglomerados nos sinusóides (Figura 11 E). Nas lâminas para o AE90D, acúmulos azuis foram vistos no espaço de Disse (Figura 11 F) e também junto de hemácias.

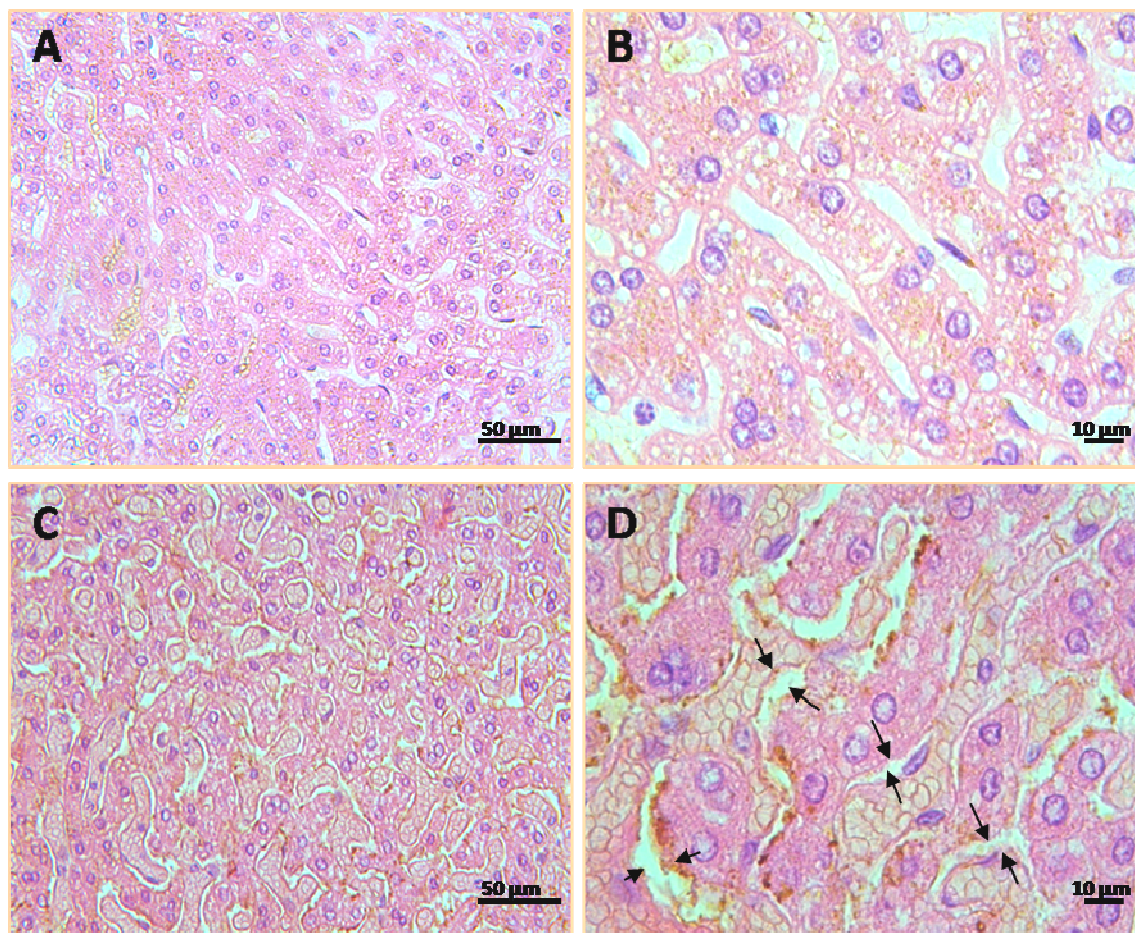


Figura 10. Fotomicrografias de seções de tecido hepático de macaco-prego coradas mediante método de H&E. Observa-se que tanto nas lâminas preparadas para o animal controle, ilustradas pelas figuras **A** e **B**, e nas lâminas experimentais AE12H e AE30D (dados não mostrados) é observado o típico padrão estrutural do fígado, com sinusóides e espaço de Disse de largura normal e hepatócitos com aspecto heterogêneo típico. Porém, no caso das lâminas de AE90D, ilustradas nas figuras **C** e **D**, observa-se um espaço bastante evidente entre toda a extensão dos cordões de hepatócitos e o endotélio sinusoidal (**setas**), o que indica um provável aumento na área ocupada pelo espaço de Disse. Os hepatócitos das lâminas AE90D mostram um aspecto normal.

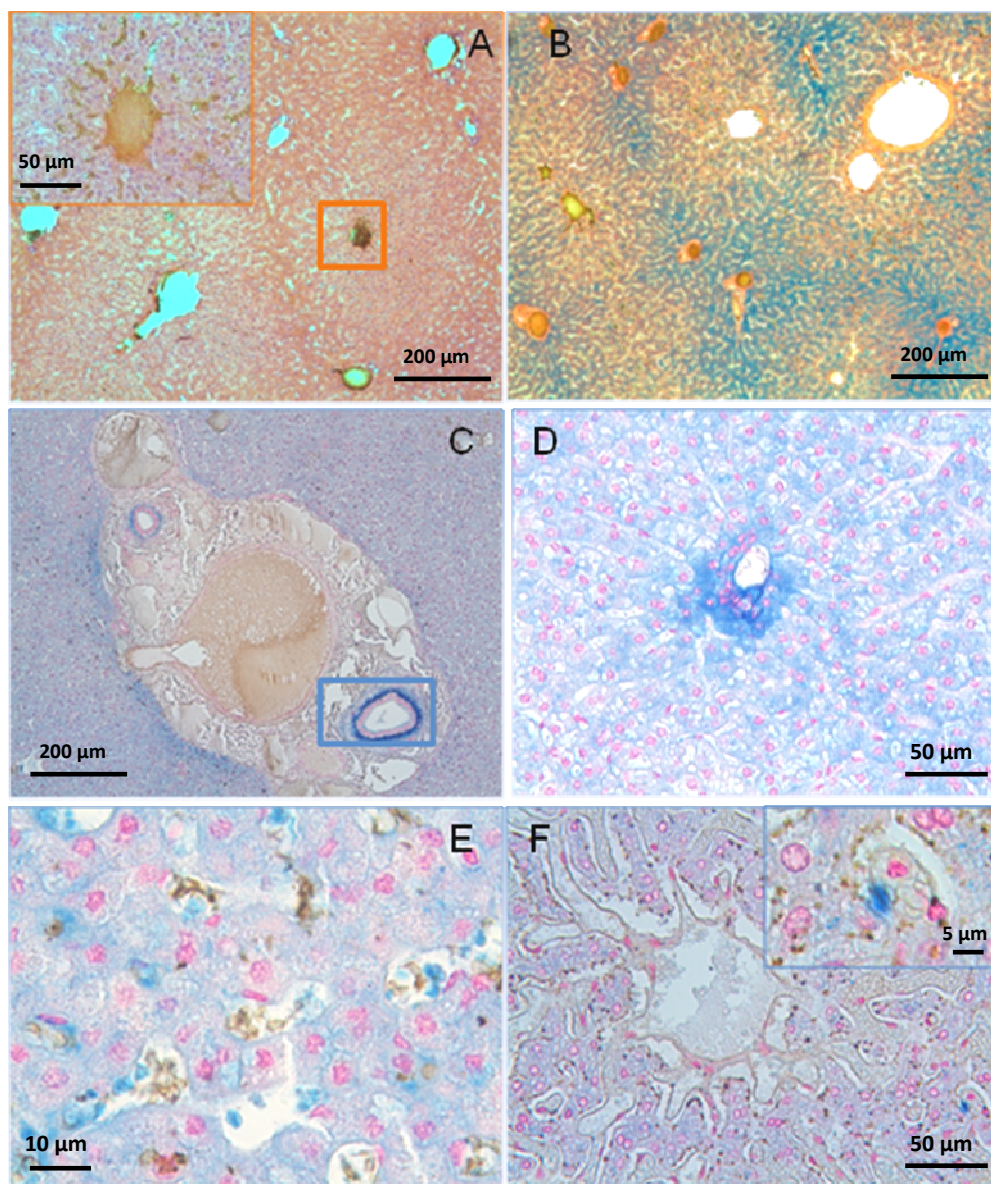


Figura 11. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de macaco-prego, mostrando a distribuição de Fe (III) no órgão, após a administração de FM-DMSA. Controle (A) e experimentais, 12 horas (B), 30 (C-E) e 90 dias (F). Em A: morfologia normal do tecido hepático e em B-F: distribuição tecidual de aglomerados de Fe (III) corados em azul, observados nos cordões de hepatócitos em todos os tempos experimentais; no tecido conjuntivo interlobular, principalmente em volta do ducto biliar (C); nos hepatócitos e sinusóides mais próximos da veia centro-lobular (D); nos sinusóides (E); no espaço de Disse (F). Notar a diminuição de aglomerados de NPMs (em azul) conforme avançou o tempo experimental. **Coloração: A= H&E e B-H=método de Perls.**

6.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO RIM

Os cortes histológicos de rim apresentaram-se dentro dos padrões normais tanto para o animal controle, como para os experimentais, uma vez que na análise ao microscópio de luz, foi observado mais externamente uma cápsula de tecido conjuntivo denso e mais internamente uma zona cortical seguida por uma zona medular. Na zona cortical, foram visualizados os corpúsculos renais ou de Malpighi (glomérulo e cápsula de Bowman), os túbulos contorcidos proximais e os túbulos contorcidos distais. Já na zona medular foram observados a alça de Henle e o ducto coletor. A figura 12 mostra fotomicrografias em pequeno aumento das lâminas experimentais (B-D) coradas pelo método de Perls, evidenciando que quanto menor o tempo experimental, maior é o acúmulo de NPMs no tecido.

No caso das lâminas de AE12H, coradas pelo método de Perls, foi vista a presença de aglomerados de NPMs principalmente na zona cortical renal, principalmente nos túbulos contorcidos proximais (tanto na luz dos mesmos como no citoplasma celular do epitélio) (Figura 13 A, B, D) e na região de transição entre a zona cortical e a zona medular (provavelmente nos túbulo coletores) (Figura 12 B). Além dessas estruturas, foram encontrados alguns aglomerados de NPMs na luz de vasos sanguíneos e nos capilares dos glomérulos (Figura 12 C) .

As lâminas correspondentes para AE30D coradas pelo método de Perls mostraram túbulos contorcidos proximais corados em azul tanto no epitélio, como na luz dos mesmos (Figura 14 A). Já no caso das lâminas preparadas para AE90D, foi visto que os aglomerados de NPMs foram fracamente corados em azul e visualizados principalmente na luz dos túbulos contorcidos proximais, no pólo urinário (Figura 14 B) e nos capilares glomerulares.

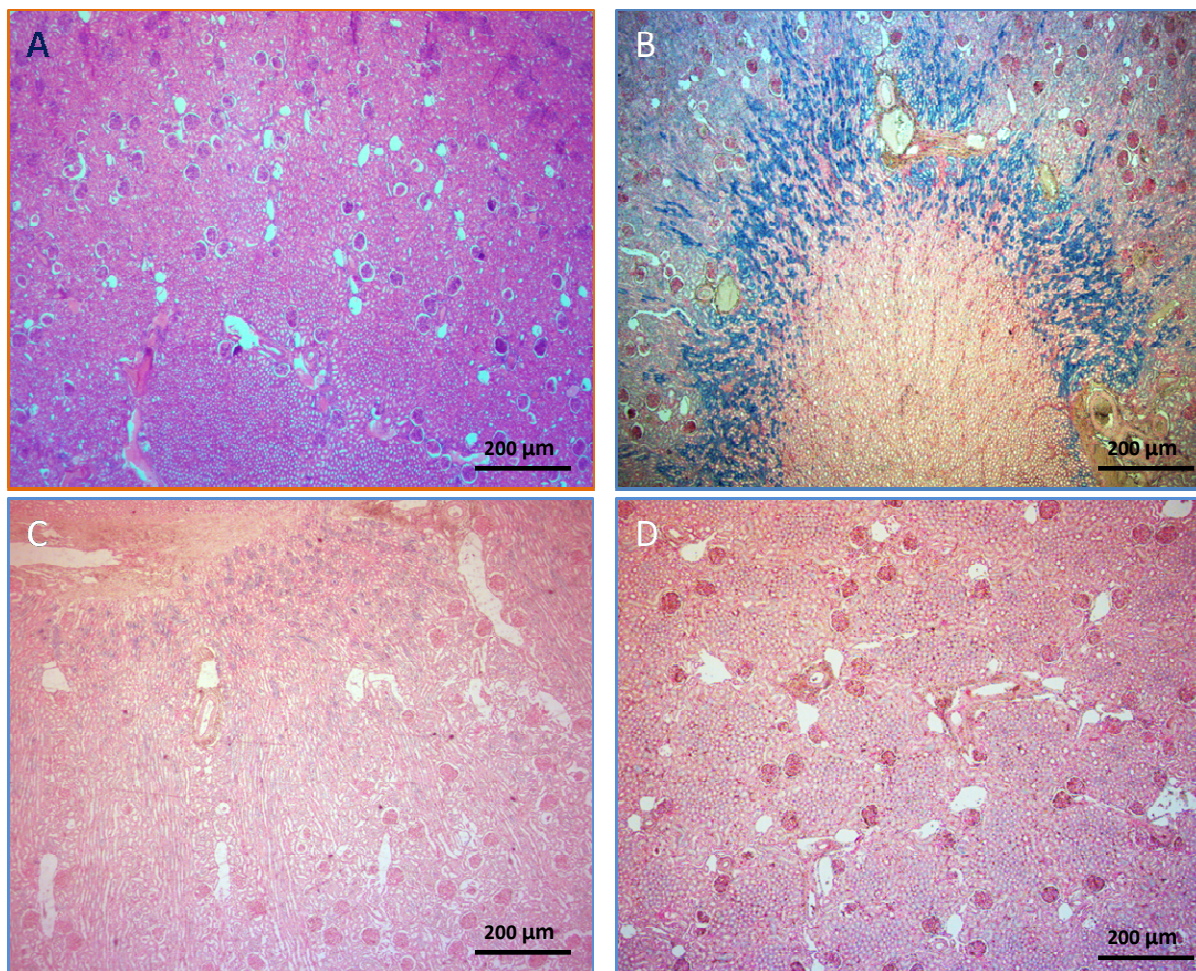


Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de macaco-prego mostrando uma visão geral de lâmina controle **(A)** e lâminas experimentais, 12 horas **(B)**, 30 **(C)** e 90 dias **(D)** após injeção de FM-DMSA. Observar em B a grande quantidade de aglomerados de NPMs intensamente corados em azul. Notar que conforme o tempo experimental avançou, os aglomerados de NPMs corados em azul diminuíram. **Coloração:** A= H&E e B-D=método de Perls.

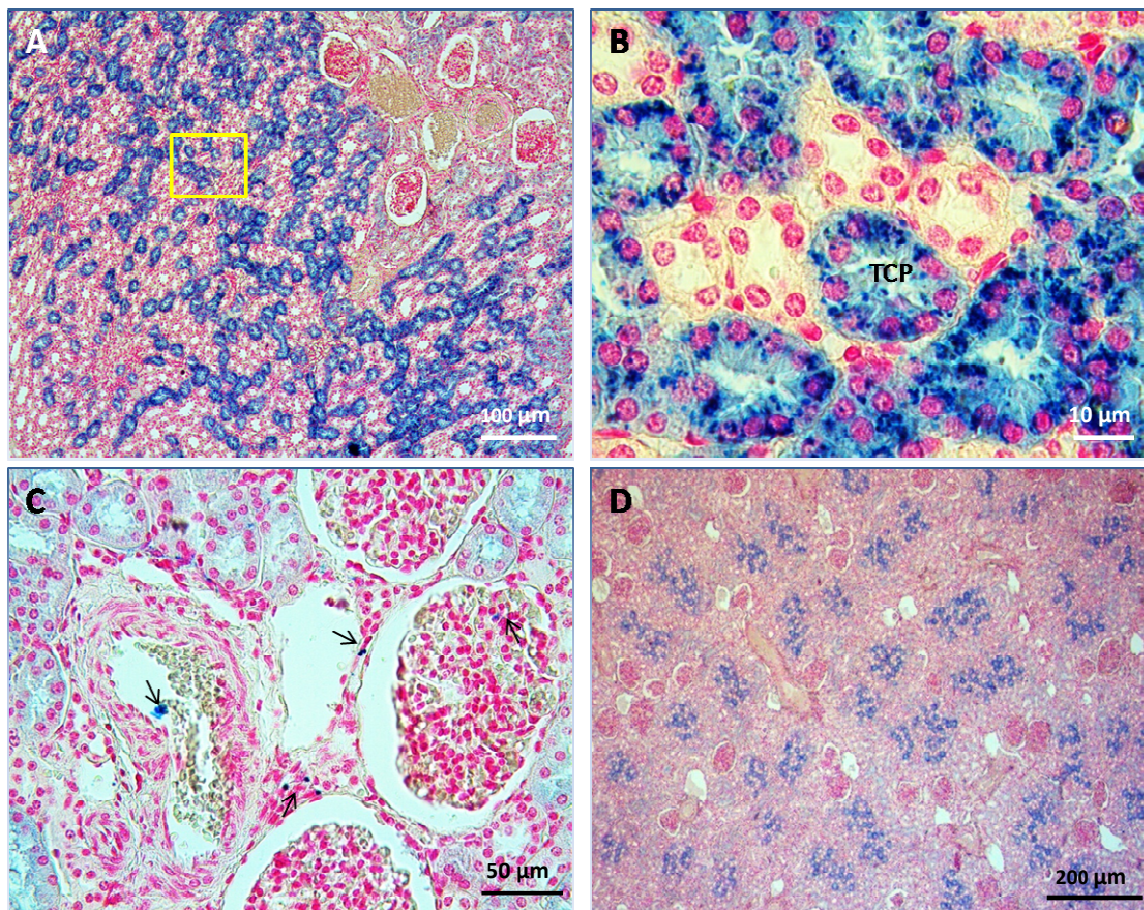


Figura 13. Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de macaco-prego AE12H. Em (A) observa-se grande acúmulo de Fe (III), numa visão geral e em maior aumento (B), no epitélio dos túbulos contorcidos proximais. Em (C) temos pequenos aglomerados de NPMs (*setas*) localizados na luz de artéria, nos capilares glomerulares e no tecido intersticial. (D) mostra grupos de túbulos contorcidos proximais com grande quantidade de NPMs. Coloração: método de Perls.

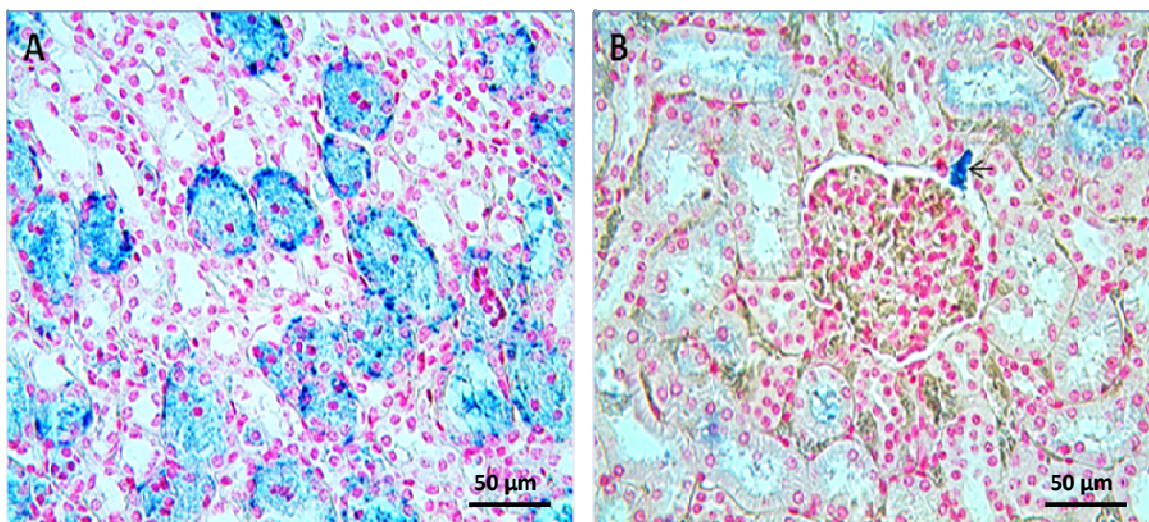


Figura 14. Fotomicrografias de rim de macaco-prego obtido 30 (A) e 90 dias (B) após administração de FM-DMSA. Observam-se aglomerados de NPMs (setas) em (A) tanto no epitélio como na luz dos túbulos contorcidos proximais e em alças de Henle; (B) na luz dos túbulos contorcidos proximais, no pólo urinário e em capilares glomerulares. Coloração: método de Perls.

6.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO BAÇO

A análise das amostras controle e experimentais do tecido esplênico, coradas mediante técnica de H&E, revelou uma morfologia normal e íntegra, mostrando uma cápsula de tecido conjuntivo denso que envolve o órgão e emite uma série de trabéculas que dividem o parênquima ou polpa esplênica. No parênquima, observou-se arteríolas e áreas esbranquiçadas descontínuas (nódulos linfáticos), que formam a polpa branca e áreas com tecido vermelho escuro, que compõem a polpa vermelha com seus cordões e seios esplênicos (Figura 15 A). Cabe ressaltar que no caso da amostra AE30D, foi visualizada grande quantidade de hemácias oxidadas.

Mediante a técnica de coloração de Perls, foi possível observar tanto nas lâminas de AE12H e AE30D a presença de aglomerados de NPMs localizados no tecido conjuntivo das trabéculas (Figura 15 B), no tecido conjuntivo em volta de arteríolas (Figura 15 C) e na polpa branca e vermelha (Figura 15 D-F). Já no caso das lâminas para o tempo experimental 90 dias, tais aglomerados foram vistos na polpa vermelha e branca e no tecido conjuntivo em volta de vasos.

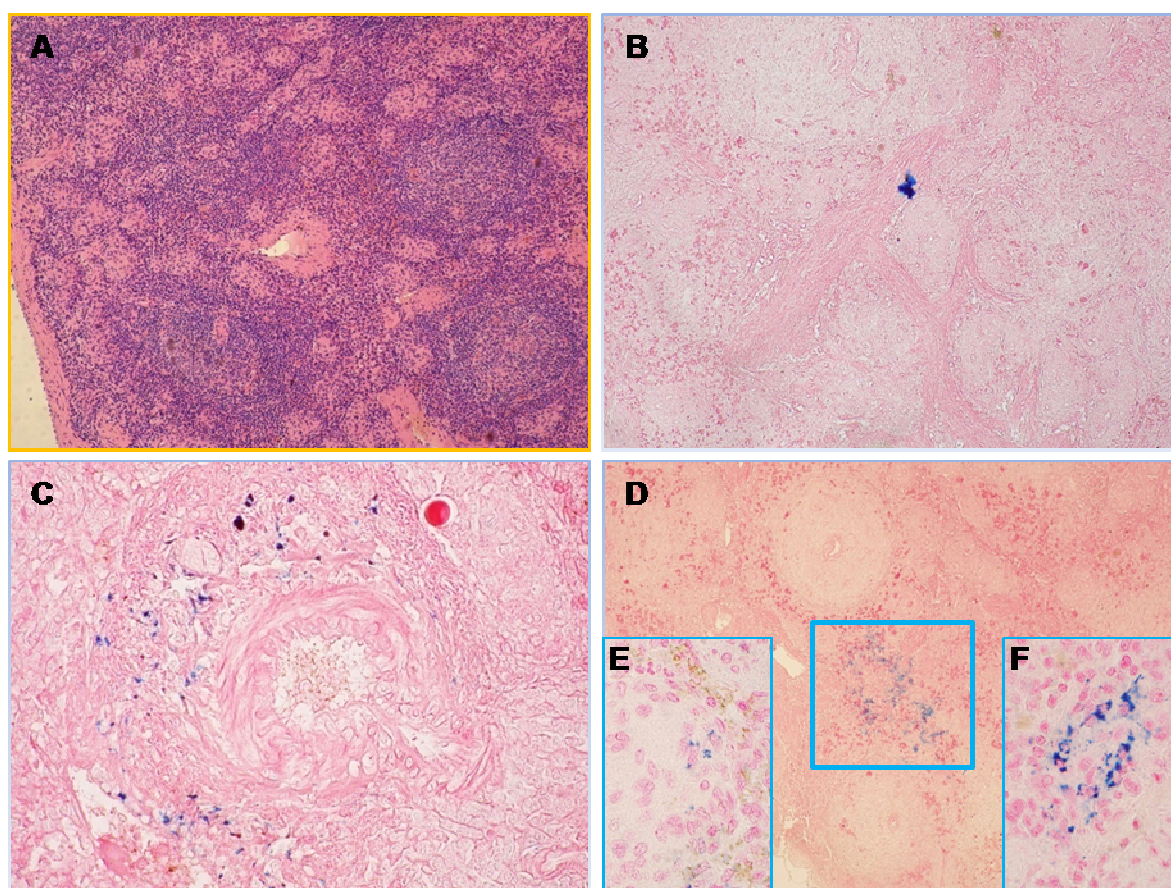


Figura 15. Fotomicrografias de baço de macaco-prego. Controle (A), 12 horas (B e C) e 30 dias (D-F) após a administração de FM-DMSA. Aglomerados de NPMs corados pelo método de Perls foram observados no tecido conjuntivo de trabéculas nas amostras AE12H (B) e AE30D (dado não mostrado); em tecido conjuntivo em volta de vasos (C); na polpa branca e vermelha (D), em detalhe em E (polpa branca) e F (polpa vermelha) em todos os tempos experimentais. **Coloração:** A= H&E e B-F=método de Perls.

6.6. NPMs NOS DEMAIS ÓRGÃOS DE ESTUDO

A análise histológica dos demais órgãos coletados, a saber: cerebelo, cérebro, coração, intestinos delgado e grosso e pâncreas; revelou uma presença ínfima de NPMs no parênquima desses órgãos, de modo que, tais resultados não teriam nenhum significado de importância terapêutica e, portanto, não estão apresentados aqui.

6.7. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE FM-DMSA NA HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SÉRICA

Visando determinar qualquer tipo de inflamação, comprometimento do sistema imune, alteração no funcionamento hepático e/ou renal e analisar o nível de ferro no organismo do macaco-prego após administração de FM-DMSA, foram realizados exames hematológicos e de bioquímica sérica. Foram colhidas uma amostra controle e uma amostra para cada um dos seguintes tempos experimentais: 12 horas, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Cabe ressaltar que todos os dados obtidos correspondem a um único animal experimental, sendo representativos somente para as condições dadas para esse sujeito especificamente. Os valores de referência foram obtidos a partir de trabalho publicado por Wirz e colaboradores (2008), onde foram determinados os valores padrão de hematologia e de bioquímica sérica para animais da espécie *Cebus apella* (N=17). Vale ressaltar que a amostra para análise hematológica correspondente para o tempo experimental de 12 horas, foi descartada devido a complicações no momento da sua obtenção.

6.7.1. HEMATOLOGIA

Ao analisar os resultados do eritograma, foi observado que, tanto para os valores controle, como experimentais, o número de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócitos se encontravam normais, ou seja, dentro dos valores de referência (Tabela 3).

Na análise do leucograma, os níveis de leucócitos tiveram uma tendência de redução durante o andamento do experimento, no entanto, sempre permaneceram dentro dos valores de referência considerados como normais (Tabela 3). Porém, cabe ressaltar que, principalmente nos dias experimentais 15° e 90°, houve uma diminuição na contagem de leucócitos de aproximadamente 35% e 37,5%, respectivamente. Essa redução ocorreu principalmente no número de linfócitos e monócitos. No caso dos valores experimentais e controle para os linfócitos, apesar de que se encontraram dentro do normal em relação ao valor de referência, ao compararmos os valores experimentais com o fisiológico individual aqui demonstrado pela amostra controle, observa-se que no caso do tempo experimental de 90 dias houve uma diminuição acentuada de aproximadamente 56% na quantidade de linfócitos. Os monócitos também apontaram um comportamento semelhante, estando seus valores experimentais e controle dentro do normal, porém, observaram-se diminuições acentuadas nos seus valores experimentais em relação ao valor controle. Por exemplo, foi vista uma diminuição de 67,5% para o tempo experimental de 15 dias; 58,75% para o tempo experimental de 30 dias e para o tempo experimental 90 dias, foi mostrada uma diminuição de 58%. Também, ao comparar os valores de 60 e 90 dias, nota-se que em um período de somente um mês, a contagem de monócitos caiu em 63%.

Tabela 3. Valores hematológicos para amostras controle e experimentais de macaco-prego após administração de FM-DMSA. N=1.
Valores de referência obtidos a partir de Wirz e colaboradores (2008).

	Valor de referência	Controle	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Eritrograma							
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	4,40 - 6,57	5,84	4,97	5,13	5,75	5,86	6,07
Hemoglobina (mg/dl)	10,70 - 14,80	13,6	11,2	12,6	13,2	13,9	13,8
Hematócrito (%)	29 - 44,70	42,2	35,9	39,1	41,7	43,4	43,5
Leucograma							
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	3 - 11,90	8	8,1	5,2	6,6	6,8	5
Linfócitos (% e $10^3/\text{mm}^3$)	12% - 60%	68 5,44	56 4,536	72 3,744	50% 3,300	53 3,604	48 2,400
Eosinófilos (% e $10^3/\text{mm}^3$)	0% - 5%	1 80	1 81	0 0	1 66	1 68	0 0
Basófilos (% e $10^3/\text{mm}^3$)	0% - 1%	2 160	1 81	1 52	1 66	0 0	1 50
Monócitos (% e $10^3/\text{mm}^3$)	0% - 10%	6 480	7 567	3 156	3 198	8 544	4 200
Neutrófilos (% e $10^3/\text{mm}^3$)	40% - 84%	23 1840	35 2835	24 1248	44 2904	38 2584	46 2300

6.7.2. BIOQUÍMICA SÉRICA

6.7.2.1. ENZIMAS HEPÁTICAS

Com a intenção de analisar o funcionamento do fígado, foram dosadas as seguintes enzimas de origem hepática: fosfatase alcalina (FA), transaminase glutâmico pirúvica (ALT), gama glutamil transferase (GGT), bilirubina total (direta e indireta), transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e desidrogenase láctica (LDH). Dentre os parâmetros analisados, somente a GGT teve valores diferentes dos de referência (37-94 U/L) considerados como normais, apresentando resultado de 32 U/L para os tempos experimentais de 15, 30 e 60 dias.

Nenhum dos resultados obtidos para as enzimas hepáticas mostrou valores acima do nível superior de referência para cada um dos parâmetros estudados (Tabela 4). Porém, a partir do 15º dia após a administração do FM-DMSA, foi observado um aumento gradativo e contínuo nos valores da FA sérica.

6.7.2.2. ENZIMA RENAL

Para analisar qualquer comprometimento funcional que levasse à insuficiência renal, foi dosada a creatinina plasmática. Estes resultados tiveram a tendência de variar entre os valores de 0.7 e 0.9 mg/dL, mantendo-se sempre dentro dos valores de referência (0.4-1.13 mg/dL) normais (Tabela 4).

Tabela 4. Valores obtidos na dosagem de algumas enzimas de origem hepática e renal, e do ferro sérico para amostras controle e experimentais de macaco prego após ter recebido injeção de FM-DMSA. N=1. Valores de referência obtidos a partir de Wirz e colaboradores (2008).

Parâmetros	Valor de referência	Controle	12 horas	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Bilirrubina total e frações								
Bilirrubina totais (mg/dL)	0.04-0.57	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
Bilirrubina direta (mg/dL)		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1
Bilirrubina indireta (mg/dL)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Transaminase glutâmico pirúvica (TGP) (U/L)	27-86	42	34	39	35	41	45	53
Gama Glutamil Transferase (GGT) (U/L)	37-94	47	42	45	32	32	32	38
Fosfatase alcalina (FA) (U/L)	110-891	155.0	164	136	183	217	245	467
Transaminase glutâmico oxalacética TGO (U/L)	42-116	59	63	64	55	45	65	69
Desidrogenase láctica (U/L)	271-732	289	338	311	413	185	532	356
Creatinina mg/dL	0.4-1.13	0.7	0.7	0.9	0.9	0.9	0.7	0.7
Ferro sérico µg/dL	35-198	104	61	95	129	65	162	97

6.7.2.3. NÍVEIS DE FERRO SÉRICO NO ORGANISMO

Com a intenção de avaliar a possibilidade de toxicidade férrica aguda decorrente da presença do FM-DMSA injetado, foi mensurado o ferro sérico. Ao compararmos tanto o valor controle, como os experimentais, com os valores de referência, foi observado que se mantiveram dentro do considerado como normal. Ao confrontar os valores experimentais com o fisiológico individual, aqui demonstrado pela amostra controle, observou-se que os valores oscilaram no decorrer do experimento, mostrando um aumento de 24% e 55% nos tempos experimentais de 15 e 60 dias, respectivamente (Tabela 4).

6.8. SINAIS CLÍNICOS NOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

As observações clínicas consideradas englobaram possíveis mudanças comportamentais e perda do apetite. Segundo Heidel e colaboradores (2007) e Kim e coautores (2005), esses são parâmetros utilizados para adicionalmente avaliar a possível toxicidade de nanomateriais. Durante o decorrer dos experimentos, nenhum dos animais injetados com FM-DMSA demonstrou alterações comportamentais, tais como: apatia, agressividade, ansiedade ou estresse.

Em relação à ingestão de alimentos em todos os animais experimentais, não foi registrada anorexia. Para analisar a ingestão alimentar de uma forma mais detalhada, o peso do animal que participou do estudo hematológico e bioquímico foi monitorado, mostrando que ao compararmos o maior e o menor dos valores obtidos no decorrer do experimento, houve uma variação entre 2.455 e 2.050 g, o que representa uma queda de 16.5% em relação ao peso inicial. Porém, vale ressaltar que a partir do 15º dia experimental, o peso do animal mostrou um aumento gradativo, o que indica uma tendência de recuperação (Tabela 5).

Tabela 5. Monitoramento do peso de macaco-prego (*Cebus spp.*) 12 horas até 90 dias após administração de FM-DMSA.

Tempo experimental	Peso (g)
12 horas	2.455
7 dias	2.215
15 dias	2.050
30 dias	2.075
60 dias	2.295
90 dias	2.230

VII. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Trabalhos recentes mostraram que, em camundongos, NPMs à base de magnetita recobertas com dextran possuem afinidade essencialmente pelo fígado e baço, não tendo sido observadas no tecido pulmonar (Lacava *et al.*, 2002). Nanopartículas de magnetita recobertas com ácido cítrico (Garcia, 2002) ou com ácido poliaspártico (Sadeghiani, 2004), mostraram preferência pelo fígado, baço e pulmão, nessa ordem. Já as recobertas com ácido glucômico acumularam-se em grande quantidade no pulmão, pouco no fígado e não foram observadas no baço (Barbosa, 2004). Nanopartículas de maguemitita recobertas com fosfato (Portilho-Corrêa, 2007) mostraram uma deposição preferencial no tecido pulmonar, seguida pelo fígado e baço. Já as recobertas com polímeros de albumina depositaram-se apenas nos pulmões, não tendo sido observadas NPMs no fígado ou baço (Estevanato, 2008). Diferentemente, foram observadas NPMs de maguemitita recobertas com uma bicamada de ácido láurico somente no pulmão nas primeiras 24 horas após a injeção e nos períodos de tempo maiores, foram observadas também no fígado e baço (Chaves, 2008). A biodistribuição de NPMs à base de magnetita recoberta com DMSA, em camundongos, também já foi estudada e revelou-se, por meio de ressonância magnética (Garcia, 2005; Chaves *et al.*, 2002) que, inicialmente, há uma deposição maior de NPMs no tecido pulmonar, mas que a partir do sétimo dia, o acúmulo de FM-DMSA é maior no fígado, sendo que atingiu um valor seis vezes maior que no pulmão após 30 dias da administração intravenosa das NPMs. O baço mostrou-se ser um órgão também depositário de NPMs-DMSA, porém em uma quantidade menor.

No presente trabalho, foram administradas NPMs à base de maguemita recobertas pelo estabilizante DMSA com a intenção de avaliar a sua biodistribuição, biocompatibilidade e possível toxicidade em uma espécie de primata não-humano. Uma vez injetadas intravenosamente, as NPMs entraram na corrente sanguínea para depois serem distribuídas nos órgãos e tecidos periféricos do organismo. Dentro do compartimento vascular, as NPMs entram em contato com células endoteliais e sanguíneas, plaquetas, fatores de coagulação e proteínas plasmáticas. Dependendo da carga e tamanho, as NPMs podem ser adsorvidas ou opsonizadas. Esses processos, além de aumentar o reconhecimento das NPs pelo sistema imune do organismo injetado, também aumentam o tamanho efetivo da partícula ou o seu diâmetro hidrodinâmico (DH), o qual é maior em comparação com a mesma NPM usada em estudos *in vitro*. O DH afeta a remoção das NPMs a partir do sangue e influencia a biodistribuição no organismo (Longmire *et al.*, 2008).

A monocamada celular do endotélio vascular atua como uma barreira dinâmica semi-seletiva que regula o transporte de fluidos e macromoléculas entre o compartimento vascular e o espaço extracelular (Csortos *et al.*, 2007). De acordo com Choi e colaboradores (2007), a estrutura do endotélio varia, dependendo da região do organismo, sendo que o tamanho efetivo dos poros no endotélio intacto normal é de aproximadamente 5 nm. Assim, partículas com tamanhos menores que 5 nm apresentam um rápido equilíbrio entre o espaço intravascular e o parênquima do órgão. No presente estudo, ao terem sido utilizadas partículas com um diâmetro maior que 5 nm, esperou-se uma circulação destas por períodos mais prolongados devido ao transporte lento através do endotélio. No entanto, Chaves e colaboradores (2002) demonstraram que, em camundongos, o FM-DMSA é rapidamente retirado da circulação, mesmo com partículas de diâmetro de 9 nm. Adicionalmente, os

resultados de ferro sérico do presente trabalho demonstram que, de fato, não houve grande diferença na dosagem do mesmo nos diferentes tempos experimentais, indicando que o FM-DMSA é rapidamente removido da circulação. O fato de já 12 horas após a injeção de FM-DMSA, órgãos como pulmão, fígado e rim apresentaram grande quantidade de FM-DMSA, demonstra claramente que os mesmos foram seqüestrados por esses órgãos.

A modificação do tamanho e superfície química das NPMs pode alterar significativamente as propriedades cinéticas *in vivo* (Longmire *et al.*, 2008). Considerando assim o tamanho das NPMs utilizadas no presente estudo, pode-se dizer que a preferência inicial de deposição no tecido pulmonar, poderia ser explicada por um processo físico. De tal modo, logo após a injeção intravenosa do FM-DMSA, este seria levado aos pulmões e uma boa parte das NPMs já ficariam mecanicamente retidas nesse órgão devido ao diminuto calibre de seus capilares, conhecidamente reconhecidos como os menores do organismo. Considerando a cobertura estabilizante utilizada, outra explicação para o grande acúmulo de NPMs-DMSA no pulmão seria que os grupos -SH da cobertura poderiam estar sendo atraídos por moléculas da superfície endotelial dos capilares pulmonares e ficariam então quimicamente retidos. Nenhuma das duas hipóteses foi testada até o presente. Assim, a aparente preferência do FM-DMSA pelo tecido pulmonar é uma característica que lhe favorece na hora de pensar em utilizá-lo para uma entrega específica de fármacos, pois o fármaco associado seria capaz de alcançar a circulação sistêmica mediante a sua absorção pela fina camada de células epiteliais (Patton e Byron, 2007; Patton *et al.*, 2004) e assim ser depois distribuído no tecido pulmonar.

No caso do presente estudo, os resultados de biodistribuição nos pulmões dos macacos-prego mostraram que houve uma correlação direta entre a frequência de aglomerados de NPMs observados nos tecidos e o tempo experimental, mostrando que conforme o tempo experimental aumentou, menos aglomerados foram vistos e estavam presentes em menos estruturas pulmonares. Uma possível explicação para esse achado é que ao administrar intravenosamente o FM, inicialmente muitas das NPMs-DMSA se depositaram no tecido pulmonar e conforme o tempo experimental foi avançando, migraram para outros órgãos, havendo uma redistribuição. Esse processo de redistribuição foi sugerido, em camundongos, por Garcia (2005), que observou a diminuição do acúmulo de NPMs-DMSA no pulmão e um aumento destas no fígado.

Em relação à biodistribuição de FM-DMSA nos tecidos de estudo, o tecido pulmonar apresentou a presença de NPMs-DMSA no epitélio cúbico simples de bronquíolos, no epitélio pseudoestratificado ciliado de brônquio, no interior de macrófagos, assim como na luz de brônquio e alvéolos, o que sugere que as NPMs foram internalizadas, como também, podem ter sido eliminadas pelas vias aéreas. Resultado similar, com exceção da observação de NPMs na luz de brônquios e no seu epitélio, foi mostrado em trabalho por Garcia (2005) em camundongos injetados com NPMs à base de magnetita recobertas com DMSA.

Entre as estruturas do tecido pulmonar analisadas, cabe ressaltar a presença de NPMs na cartilagem hialina, o que levanta a questão de como as NPMs conseguiram se acumular nessa estrutura, lembrando que o tecido cartilaginoso é desprovido de vasos sanguíneos. De tal forma, o achado de NPMs no pericôndrio, matriz e condrócitos sugere que as NPMs utilizaram o mesmo mecanismo pelo qual os nutrientes são transportados pelo sangue através do pericôndrio e depois

penetram na matriz da cartilagem e chegam até os condrócitos mais profundos. De acordo com Junqueira e Carneiro (2008), os mecanismos dessa movimentação de moléculas ocorre principalmente por meio do processo de difusão. Um dado que reforça essa possível explicação, relaciona a semelhança de tamanhos entre as NPMs e as macromoléculas, lembrando que a NPM usada nesta pesquisa possui um diâmetro de 5,3 nm e os açúcares, aminoácidos e nucleotídeos contam com um tamanho aproximado entre 0,5-1 nm e as proteínas globulares possuem um tamanho aproximado entre 2-10 nm (Alberts *et al.*, 1997). O raro achado de NPMs-DMSA na cartilagem hialina avascular do pulmão, aponta à necessidade de explorar mais a fundo esse aspecto, visando a sua futura aplicação médica para o tratamento de doenças pulmonares que afetam a cartilagem.

As análises conduzidas no tecido pulmonar mediante MET permitiram citolocalizar as NPMs-DMSA, o que possibilitou detalhar de melhor maneira o tipo de mecanismo usado pelas NPs para se movimentar dentro do tecido. A observação de muitas vesículas de transporte e a presença de aglomerados de NPMs dentro de algumas dessas vesículas em células endoteliais para o tempo experimental de 12 horas, sugere que as NPMs se encontravam em movimento mediante o processo de transcitose, no qual, receptores na superfície de células epiteliais polarizadas transportam macromoléculas, a partir de um espaço extracelular para outro (Alberts *et al.*, 1997). De fato, resultados do presentes estudo mostraram que NPMs-DMSA encontravam-se não apenas no lúmen dos vasos ou dentro de células, como também associadas a fibras colágenas do tecido conjuntivo do parênquima pulmonar, o que reforça a hipótese do movimento de NPMs entre os compartimentos pulmonares.

Observações mediante MET também permitiram identificar NPMs-DMSA internalizadas em macrófagos alveolares nos tempos experimentais de 30 e 90 dias, o que indica que as NPMs foram fagocitadas para serem então degradadas. Segundo Weiss e colaboradores (1995), existe um sistema autoregulador nos macrófagos e monócitos, vinculando a manutenção da homeostase do ferro nas células com as funções imunes celulares. A microscopia eletrônica de transmissão também revelou NPMs dentro de lisossomos de prováveis plaquetas também nos tempos experimentais de 30 e 90 dias, o que reforça que de fato, nesses tempos experimentais, as NPMs se encontravam em processo de degradação.

Os resultados do presente trabalho mostraram a ausência de danos patológicos no tecido pulmonar, apesar de terem sido observados alguns pequenos focos inflamatórios, localizados principalmente próximos aos epitélios do brônquio e bronquíolo. O fato de que os processos inflamatórios estavam ou não associados com NPMs, sugere que não é possível relacionar diretamente a presença das NPMs como única fonte causadora dessa reação imunológica. Além disso, a presença de focos inflamatórios é um achado comum no tecido pulmonar, devido ao alto contato existente entre o parênquima pulmonar e o meio externo (Junqueira e Carneiro, 2008), recrutando células inflamatórias com a finalidade de atacar e eliminar qualquer corpo estranho que, por ventura, tenha ingressado pelas vias respiratórias.

Vale a pena lembrar que a posição do fígado no sistema circulatório e a sua estrutura resultam ideais para captar, transformar e acumular metabólitos, neutralizar e eliminar substâncias tóxicas. De tal forma, o papel central do fígado no metabolismo do ferro (Graham *et al.*, 2007) sustenta o fato de que no presente trabalho foram observados muitos aglomerados de NPMs nesse órgão em todos os

tempos experimentais, sendo que com 30 dias, a observação dos aglomerados foi mais freqüente e a sua distribuição tecidual foi mais dispersa. Em camundongos, a maior quantidade de FM-DMSA também foi observada no tempo experimental de 30 dias (Garcia, 2005). Em relação à localização estrutural dos aglomerados de NPMs no presente estudo, foram observados no interior de hepatócitos, no conjuntivo do espaço-porta, na veia centro-lobular e em torno de ductos biliares, repetindo as mesmas localizações observadas por Parca (2006) em camundongos tratados com FM-DMSA. Porém, não foi visualizada a presença de NPMs nos canalículos biliares, o que foi mostrado na ML do trabalho de Parca (2006), sugerindo uma metabolização das NPMs pelos hepatócitos, seguida da eliminação por meio da bile.

Nossos resultados mostraram a presença de NPMs no tecido renal, para todos os tempos experimentais, principalmente no tempo de 12 horas. O fato de ter sido observadas NPMs-DMSA tanto nos capilares glomerulares, como nos túbulos contorcidos proximais para todos os tempos experimentais, indica que se manteve um constante processo de filtração das NPs. Porém, o grande acúmulo de NPMs observado nas lâminas AE12H, mostrou que o processo de filtração foi mais intenso durante as primeiras horas após a administração do FM. Portanto, as NPs circulantes no tecido renal, possivelmente, seguiram a seguinte trajetória: entraram nos capilares glomerulares por meio da arteríola aferente, a seguir, as moléculas foram filtradas pela parede capilar glomerular e em seguida reabsorvidas pelo túbulo contorcido proximal (TCP).

Resultados obtidos por Wareing e colaboradores (2000) em ratos, indicam que uma proporção significativa de ferro no soro é ultrafiltrado pelo glomérulo e somente 0.8-1.5% desse ferro filtrado é excretado pela urina, indicando que uma

quantidade considerável é reabsorvida, semelhantemente ao observado na presente pesquisa. Nossos resultados não mostraram aglomerados de NPMs nos túbulos contorcidos distais (TCD). Em linha com nossos resultados, Wareing e coautores (2000) também colocam que nada ou pouquíssimo ferro é reabsorvido pelos túbulos contorcidos distais. Esses autores sugerem também que existem vias de reabsorção do ferro tanto na alça de Henle como no túbulo coletor, indicando que essas estruturas seriam as que reabsorveriam, preferencialmente, o ferro. No presente trabalho, por meio da coloração de Perls, foi observado que a maior parte do ferro proveniente das NPMs injetadas se localizou nos TCPs (tanto no epitélio como na luz dos túbulos) corados em azul, não excluindo a possibilidade de que as alças de Henle também tenham internalizado parte do ferro. O fato de termos observado reabsorção de ferro pelos TCPs, indica que não se encontrava em excesso, sendo reabsorvido para sua posterior utilização pelo organismo (Berne *et al.*, 2000).

Nos órgãos analisados, não foi observada a formação de aglomerados de NPMs que impedissem a circulação sanguínea. Em concordância com os resultados apresentados no presente estudo, L'Azou e colaboradores (2008) colocam que as NPMs nem sempre mantêm seu tamanho nanométrico quando em solução, formando aglomerados de tamanhos muito maiores, comparados com o tamanho inicial da partícula isolada. Em relação a isso, Tosi e colaboradores (2008) descrevem que NPs com pequenos diâmetros possuem uma área de superfície relativa grande, o que promove a sua aglomeração. Sugere-se que a aglomeração das NPMs ocorre porque estas podem ter perdido a sua cobertura em alguma parte do processo, a partir da preparação da amostra ou já dentro do organismo. Além disso, é importante notar que na hora da preparação do FM, nem todas as NPs

ficam recobertas pelo estabilizante, o que levaria a sua eventual aglomeração. Além dessa possível explicação, a aglomeração poderia ter sido causada por processos físicos, tais como forças de atração e magnetização (Pankhurst *et al.*, 2003).

Mediante observação por MET, foi possível notar a presença de NPMs internalizadas por eritrócitos. Esse dado está em concordância com os resultados relatados por Soler e colaboradores (2007), que observaram de forma direta e indireta mediante MET e espectroscopia Raman, respectivamente, em experimentos *in vitro*, a internalização de NPMs de maguema biocompatíveis em eritrócitos de camundongo. Os autores colocam que esse processo de internalização ocorre por difusão passiva ou endocitose mediada por receptores. Porém, em trabalho publicado por Geiser e colaboradores (2005), foi colocado que a captação celular de NPs não envolve endocitose, pois os eritrócitos não possuem receptores fagocitários. Isso sugere que as NPs são capazes de cruzar a membrana celular mediante processos diferentes à fagocitose e endocitose. A difusão, canais transmembrana, interações de adesão ou processos transmembrana podem ter um papel importante nesse tipo de captação celular. O processo de captação de NPs pelos eritrócitos é sensível a uma série de fatores, tais como: a concentração de NPs, o diâmetro hidrodinâmico (DH) da NP e a capacidade que o material estabilizante tem para se aderir eficientemente à membrana celular. Isso indica que a dose de FM-DMSA utilizada, o DH das NPs, assim como os grupos ativos orgânicos livres presentes no DMSA usado como cobertura estabilizante, são fatores que favorecem a interação e internalização de NPMs-DMSA nas células de uma forma geral.

Como colocado anteriormente no presente trabalho, o sucesso do FM utilizado experimentalmente vai depender da sua capacidade de ser não tóxico e ser biocompatível (Gupta e Gupta, 2005). Trabalhos recentes do grupo têm demonstrado que em camundongos, o FM-DMSA apresenta boa biocompatibilidade, com baixa toxicidade (Garcia *et al.*, 2005; Chaves *et al.*, 2002). Resultados semelhantes foram observados no presente estudo. Um dos pontos que pode explicar por que não foram observados efeitos tóxicos importantes nos tecidos de estudo deve-se à natureza química do agente de recobrimento escolhido na presente pesquisa. A estabilidade fornecida pelo DMSA evita o contato direto entre a célula e a superfície fortemente oxidada do nano-óxido, tornando as NPMs mais biocompatíveis e menos tóxicas (Auffan *et al.*, 2006). De fato, dentre todos os órgãos coletados, somente o fígado do AE90D mostrou algum tipo de alteração morfológica (aumento do espaço de Disse), tendo os demais órgãos mantidos a sua integridade histológica.

Uma revisão bibliográfica sobre o tema de NPMs e sua eventual toxicidade no organismo ou na célula nos permitiu determinar que, no geral, os órgãos analisados para avaliar esse quesito são o fígado e o rim, os quais representam as principais rotas de remoção de NPs (L'Azou *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2008; Longmire *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2007). Por exemplo, em trabalho publicado por Chen e colaboradores (2006), foi observado que as NPs de cobre usadas (diâmetro de 23,5 nm), em camundongos, causaram danos renais, especificamente nas células do TCP, levando a uma glomerulonefrite. Além disso, foi observada uma alteração nos valores bioquímicos do nitrogênio úrico e creatinina, o que corrobora as alterações nas funções renais. Pelo contrário, no presente estudo, apesar de termos utilizado

NPMs com um diâmetro menor ainda, o que de acordo com L'Azou e colaboradores (2008) seria mais citotóxico, não foram observadas alterações morfológicas no tecido renal ou nos valores bioquímicos da creatinina.

No nosso trabalho, somente as lâminas correspondentes para o fígado AE90D mostraram algum tipo de alteração morfológica. De tal maneira, somente os danos observados nesse órgão serão discutidos. Nas lâminas de fígado obtido 90 dias após injeção do FM-DMSA, observaram-se NPMs no interior do espaço de Disse, o que sugere que as partículas estavam sendo internalizadas por hepatócitos por meio da projeção de microvilosidades destas células no espaço perisinusoidal, ou por células de Ito, normalmente localizadas nesse espaço. No trabalho de Braz (2008), o FM-DMSA injetado nos macacos-prego, também mostrou por meio de MET a presença de NPMs no interior de hepatócitos, células endoteliais e em células de Ito presentes no espaço de Disse. Estudos de microscopia sugerem que nanopartículas de ferrita podem ser parcialmente degradadas e que o ferro resultante é retirado do fígado durante um período de três meses. O processo ocorre mediante a internalização das NPs pelas células reticuloendoteliais, não comprometendo as funções hepatocelulares e evitando danos induzidos pelo ferro das NPMs (Bacon *et al.*, 1987). No caso dos nossos resultados, de fato, conforme foi avançando o tempo experimental, o acúmulo de Fe (III) no tecido hepático foi diminuindo, apesar de que no tempo experimental de 90 dias ainda havia ferro no tecido. Além disso, foram observadas alterações no espaço de Disse.

Com a intenção de melhor entender as alterações observadas no fígado AE90D, foram considerados os resultados ultraestruturais para o tecido hepático obtidos por Braz (2008). Em concordância com nossos resultados de microscopia de

luz, Braz relatou que dentro dos órgãos analisados (fígado, linfonodos e baço), o fígado também mostrou uma série de alterações morfológicas. As micrografias eletrônicas referentes ao tempo experimental de 90 dias mostraram, de fato, um aumento na área normalmente ocupada pelo espaço de Disse. Além disso, Braz observou sinusóides aparentemente retraídos, alguns hepatócitos com alterações na membrana plasmática e numerosas mitocôndrias visivelmente mais volumosas. Com o intuito de verificar o aumento na área ocupada pelas mitocôndrias, Braz realizou uma análise morfométrica, na qual observou um aumento significativo das mitocôndrias de hepatócitos no animal AE90D, quando comparadas com as mitocôndrias das amostras controle e das experimentais 12 horas.

Essas alterações podem ser explicadas de duas maneiras. Primeiro, a hepatotoxicidade foi induzida, possivelmente, pelo ferro proveniente das nanopartículas observadas nessa estrutura (Bacon *et al.* 1990). O ferro é um mineral essencial para o funcionamento normal da fisiologia celular, mas um excesso deste pode acabar em danos celulares (Britton *et al.*, 2002). Quando o ferro se encontra na sua forma de peso molecular baixo, pode ter um papel catalítico na formação de reações de radicais livres. Essas espécies reativas de oxigênio possuem o potencial de lesar lipídios celulares, ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos, resultando em complicações nas funções e na integridade celular. Porém, as células estão dotadas de mecanismos citoprotetores (antioxidantes, enzimas de varredura e processos de reparo) que atuam para contrariar os efeitos da produção de radicais livres induzida pela presença de metais pesados. Portanto, esse efeito depende do balanço entre a produção de radicais e os sistemas citoprotetores. Como resultado, deve haver uma taxa de produção de radicais livres que deve ser excedida antes que ocorram danos celulares (Britton, 1996; Bacon *et al.*, 1990).

Desta forma, o fígado colhido nos tempos experimentais de 12 horas e 30 dias apresentou-se morfológicamente normal, pois o ferro das NPMs acumulado no tecido não foi o suficiente para contribuir na produção de radicais livres tóxicos para as estruturas celulares. Porém, vale ressaltar que no tempo experimental 30 dias, foram observadas mais áreas coradas em azul, em comparação com os demais tempos experimentais. Assim, é provável que entre o período de tempo experimental de 30 e 90 dias, houve um acúmulo excessivo de ferro, o que levou à formação de reações de radicais livres capazes de causar danos oxidativos aos lipídios *in vivo*, lesando, dessa forma, os componentes celulares. Possivelmente, foi assim que no tempo experimental de 90 dias, as alterações morfológicas ficaram evidentes, pois os níveis de radicais livres, possivelmente, excederam os níveis toleráveis pelas células.

Uma explicação alternativa para a manutenção de uma morfologia normal no fígado para os tempos experimentais de 12 horas e 30 dias, seria que nesses tempos, as NPMs ainda não tinham entrado no processo de degradação, não acumulando ferro livre no tecido. Já depois do tempo experimental de 30 dias, as NPMs encontravam-se nesse processo, acumulando ferro livre causador de toxicidade no tecido (Jain *et al.*, 2008). Um achado que reforça essa explicação faz referência à observação de NPMs internalizadas por macrófagos alveolares e no interior de lisossomos, o que indica um processo de degradação. É importante ressaltar que as células estão dotadas de mecanismos citoprotetores que atuam para contrabalancear os efeitos da produção de radicais livres induzida por metais (Britton, 1996). Partindo disto, no caso das alterações vistas nas lâminas AE90D, é possível que não tenha havido um balanço entre os sistemas citoprotetores e a produção de radicais livres induzida pelo excesso de ferro proveniente das NPMs.

No que se refere ao número de animais por grupo experimental utilizados neste trabalho, este é um dos problemas associados com o uso de primatas não-humanos como modelos experimentais, devido aos problemas éticos envolvidos, o que às vezes dificulta a interpretação de dados, como os encontrados para os valores dos exames de sangue. Ao considerar os resultados normais obtidos no eritrograma, ferro sérico e sinais clínicos observou-se que o animal não desenvolveu anemia ao longo do experimento (Dunn, 2001), o que indica que o FM-DMSA não causou alterações nos níveis de hemoglobina circulante nem nas hemácias.

Ao considerarmos os resultados para as enzimas de origem hepática, cujas mudanças são comumente utilizadas como marcadores bioquímicos da função do fígado (Jain *et al.*, 2008), foi visto que, de forma geral, não mostraram um aumento a partir do limite superior do valor de referência, o que indica que aparentemente não houve indício de doença hepática. Dentre os parâmetros analisados, somente a GGT teve uma discreta alteração, quando comparada aos valores de referência normais, mostrando uma diminuição para os tempos experimentais de 15, 30 e 60 dias, o que não é indicativo de hepatopatia, pois somente quando está aumentada demonstra indícios de cirrose ou esteatose (Wallac, 1999).

Vale a pena considerar os dados obtidos para a fosfatase alcalina (FA), já que, ao confrontar os valores experimentais com o fisiológico individual, aqui demonstrado pela amostra controle, foi observado que a partir do 15º dia experimental houve um aumento gradativo e contínuo nos valores dessa enzima hepática. Esse dado poderia ser um indicador de indício de colestase ou doença hepática. No entanto, é importante ressaltar que tal achado não demonstra degeneração de hepatócitos ou perda de funcionalidade hepática, principalmente ao considerarmos os valores normais obtidos para a ALT (enzima hepática mais

específica para detecção de danos no hepatócito) (Larsson *et al.*, 1997) quando comparados com os valores de referência, como também com o controle fisiológico. Esses dados são reforçados pelos resultados observados na histologia hepática, a qual mostrou que não houve presença de necrose, fibrose, ou acúmulo excessivo de lipídios nos hepatócitos em nenhuma região ou tempos experimentais das amostras analisadas.

De acordo com Wallac (1999), a medida da concentração de creatinina plasmática no soro sanguíneo é um teste simples usado como um dos indicadores mais sensíveis e específicos para diagnosticar doença ou insuficiência renal. A creatinina é um subproduto do metabolismo da creatina do músculo esquelético (Berne *et al.*, 2003). Nossos resultados se mantiveram dentro dos valores de referência normais, o que indica que provavelmente, a presença das NPMs no rim não afetou o seu funcionamento. Esse dado corrobora os resultados obtidos na histologia renal, aonde não foi observado nenhum tipo de alteração morfológica. Dessa forma, observa-se que ao não haver um possível excesso de ferro formador de radicais livres e de espécies de oxigênio ativo no rim, não houve danos nas células desse órgão (Ponka, 1999).

O sistema imune possui um papel de monitoramento dos níveis de ferro nos tecidos, mantendo uma homeostase mediante a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro. Essa relação entre o excesso de ferro e a reação imune é refletida principalmente pelos linfócitos, que atuam como compartimentos de estocagem de ferro, reconhecendo e ligando metais como uma forma de evitar toxicidade. Nos nossos resultados hematológicos, foi notado que o número de leucócitos totais diminuiu ao longo do tempo experimental. Destes, os

mais afetados foram os linfócitos e monócitos. De acordo com Porto e colaboradores (2007), uma baixa contagem total de linfócitos pode ser significativamente associada com um alto grau de excesso de ferro. Possivelmente, ao ter excesso de ferro nas células, ocorreu uma sinalização que evocou os linfócitos, os quais, conseqüentemente, estocaram o ferro. Um possível excesso de ferro internalizado nos linfócitos provavelmente levou à morte celular em função de processos de estresse oxidativo. Sabe-se que o ferro na presença de oxigênio pode gerar radicais livres por meio da reação de Fenton (Imlay *et al.*, 1988).

Ao considerarmos os sinais clínicos como resultados complementares para analisar a biocompatibilidade do FM-DMSA, notou-se os animais experimentais não apresentaram sinais de apatia, estresse ou ansiedade, os quais poderiam indicar a possibilidade de doença (Dunn, 2001). Além disso, ao considerarmos o peso do animal do estudo hematológico, observou-se que variou durante o decorrer do experimento, apresentando uma perda de 16,5%, ao compararmos o peso mínimo e o máximo. Porém, depois do 15º dia experimental, observou-se um aumento no peso do animal. Cabe ressaltar que o animal experimental é um indivíduo que vive em sociedade (Fragaszy *et al.*, 2004), onde a disponibilidade de alimento depende da hierarquia. Assim, é difícil relacionar essa perda de peso como um dado adicional para avaliar a biocompatibilidade do FM-DMSA. Porém, considerando de uma forma geral os sinais clínicos observados, foi notado que a administração do FM-DMSA não causou alterações clínicas nos animais (Heidel *et al.*, 2007).

No presente trabalho, os resultados obtidos para o ferro sérico se encontraram dentro dos valores de referência considerados como normais, o que

indica que a dose injetada de FM-DMSA não seria um fator causador de toxicidade férrica aguda. Além disso, os resultados mostraram valores oscilantes, sem um padrão definido, no decorrer do experimento. Isso poderia ser atribuído às variações no nível de ferro sérico, o qual é resultado de vários processos que ocorrem simultaneamente, tais como: degradação das partículas de ferro injetadas, ligação subsequente do ferro a proteínas séricas (por exemplo, transferrina), estocagem nos tecidos por meio da ligação com a ferritina, redistribuição do ferro e sua eliminação. Além disso, o ferro metabolizado a partir das NPMs, também pode ser incorporado no estoque de ferro corporal e ser progressivamente alocado para os eritrócitos na forma de hemoglobina, o que diminuiria a sua taxa de remoção (Jain *et al.*, 2008).

De forma geral, considerando os resultados histológicos, hematológicos, bioquímicos do soro e os sinais clínicos, observa-se que apesar de algumas pequenas alterações observadas no fígado, estas não são necessariamente impeditivas de possível aplicação biomédica do FM-DMSA. No entanto, é importante considerar a diminuição dos linfócitos do sangue em relação ao seu próprio controle, apesar de ainda estar dentro da faixa para os valores de referência, pois pode indicar uma possível imunossupressão relacionada com um excesso de ferro (Sousa, 1989) advindo da presença de FM-DMSA no organismo.

VIII. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Baseado nos resultados discutidos neste trabalho, conclui-se que:

- Aglomerados de NPMs-DMSA foram observados em todos os órgãos analisados, tendo sido localizada uma maior frequência de aglomerados no tecido pulmonar, hepático, renal e esplênico.
- A análise histológica do cerebelo, cérebro, coração, intestinos delgado e grosso e pâncreas; revelou uma presença ínfima de NPMs no parênquima desses órgãos, de modo que, tais resultados não teriam nenhum significado de importância terapêutica.
- Propõe-se uma provável correlação direta entre a quantidade de NPMs presentes nos tecidos de estudo e o tempo experimental, mostrando que conforme o tempo experimental aumentou, menos NPMs foram observadas.
- Baseado nos dados de biodistribuição, sugere-se que a principal via de remoção de NPMs-DMSA foi através do sistema hepatobiliar, seguido pela via renal, bem como das vias aéreas superiores.
- A amostra de FM-DMSA utilizada no presente estudo mostrou-se biocompatível para todos os tempos experimentais, nos seguintes órgãos: baço, cerebelo, cérebro, coração, pâncreas, pulmão, rim e intestinos.
- O fígado foi o único órgão no qual foram observadas leves alterações histológicas, mostrando um aumento na área ocupada pelo espaço de Disse

no tempo experimental de 90 dias. Essa alteração histopatológica poderia estar associada a um excesso de ferro no tecido

- NPMs-DMSA internalizadas em macrófagos alveolares e em lisossomos nos tempos experimentais de 30 e 90 dias foram observadas mediante MET, o que indica a degradação das NPMs.
- A análise das enzimas de origem hepática e renal não mostraram um aumento a partir do limite superior do valor de referência, o que indica que aparentemente não houve indício de doença hepática nem renal, respectivamente.
- No presente trabalho, os valores de ferro sérico indicaram que a dose injetada de FM-DMSA não seria um fator causador de toxicidade férrica aguda.
- Considerando conjuntamente os resultados histológicos, hematológicos, e bioquímicos, propõe-se o uso do fluido magnético composto por nanopartículas magnéticas de maguemita recobertas pelo estabilizante DMSA como nanomaterial promissor para aplicações biomédicas futuras em humanos.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed. 1997. 1294 p.

ALEXIOU, C.; SCHMID, R.J.; JURGONS, R.; KREMER, M.; WANNER, G.; BERGEMANN, C.; HUENGES, E.; NAWROTH, T.; ARNOLD, W.; PARAK, F.G. Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. **European Biophysics Journal**. v. 35, n. 5, p. 446-50, 2006.

ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KLEIN, R. J.; PARAK, F. G.; HULIN, P.; BERGEMANN, C.; ERHARDT, W.; WAGENPFEIL, S.; LÜBBE, A. S. Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting. **Cancer Research**. v. 60, p. 6641-6648, 2000.

AUFFAN, M.; DECOME, L.; ROSE, J.; ORSIERE, T.; DE MEO, M.; BRIOIS, V.; CHANEAC, C.; OLIVI, L.; BERGE-LEFRANC, J.L.; BOTTA, A.; WIESNER, M.R.; BOTTERO, J.I. In vitro Interactions between DMSA-Coated Maghemite Nanoparticles and Human Fibroblasts: A Physiolochemical and Cyto-Genotoxicity Study. **Environmental Science Technology**. v. 40, p. 4367-4373, 2006.

BACON, B. R. & BRITTON, R. S. The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? **Hepatology**. v. 11, p. 127-137, 1990.

BACON, B.R.; STARK, D. D; PARK, C. H.; SAINI, S; GROMAN, E. V.; HAHN, P. F.; COMPTON, C. C.; FERRUCCI, J. T. Ferrite particles: a new magnetic resonance imaging contrast agent. Lack of acute or chronic hepatotoxicity after intravenous administration. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 110, n. 2, p.164-171, 1987.

BAILEY, R. L. Lesser known applications of ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 39, n. 1-2, p. 178-182, 1983.

BARBOSA, L.S. **Avaliação in vivo da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico**. 2004. 64f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular- Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

BERKOVISKY, B.M.; MECVEDEV, V.F.; KRAKOV, M.S. **Magnetic fluids: engineering applications**. New York: Oxford University Press, 1993, 243p.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M. e STANTON, B.A. **Fisiologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 1034 p.

BRAZ, S.V. **Avaliação morfológica de baço, linfonodo e fígado de macacos-prego *Cebus apella* tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA**. 2008. 85f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

BRITTON, R.S. Metal-induced hepatotoxicity. **Seminars in Liver Disease**. v. 16, n. 1, p. 3-12, 1996.

BRITTON, R.S.; LEICESTER, K.L.; BACON, B.R. Iron Toxicity and Chelation Therapy. **International Journal of Hematology**. v. 76, p. 219-228, 2002.

BULTE JW, DOUGLAS T, WITWER, B.; ZHANG, S.; STRABLE E. LEWIS, B.; ZYWICKE, H.; MILLER, B.; VAN GELDEREN, P.; MOSKOWITZ, B.; DUNCAN, I.; FRANK, J.A. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and *in vivo* tracking of stem cells. **Nature Biotechnology**. v. 19, p. 1141–1147, 2001.

BYRNE, J.D.; BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, p. 1615–1626, 2008.

CHAVES, S. **Efeitos biológicos de nanopartículas magnéticas recobertas por bicamada de ácido láurico: estudos *in vitro* e *in vivo***. 2008.112f. Tese (Doutorado em Biologia Animal- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

CHAVES, S. B.; LACAVAL, L.M.; LACAVAL, Z.G.M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P.C. AZEVEDO, R.B. Light Microscopy and Magnetic Resonance Characterization of a DMSA-Coated Magnetic Fluid in Mice. **IEEE Transactions on Magnetics**. v. 38, n. 5, p. 3231-3233, 2002.

CHEN, Z.; MENG, H.; XING, G.; CHEN, C.; ZHAO Y.; JIA, G.; WANG, T.; YUAN, H.; YE, C.; ZHAO F.; CHAI, Z.; ZHU, C.; FANG, X.; MA B.; WAN L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. **Toxicology Letters**. v. 16, n. 2, p. 109-120, 2006. CHEON, J. e LEE, J. H. Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology. **Accounts of Chemical Research**. v. 41, n. 12, p. 1630-40, 2008.

CHOI, S.J.; OH, J.M.; CHOY, J.H. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 103, n. 3, p. 463-71. 2009.

CHOI, H.S.; LIU, W.; MISRA, P.; TANAKA, E.; ZIMMER, J.P.; IPE, B.I.; BAWENDI, M.G.; FRANGIONI, J.V. Renal remoção of quantum dots. **Nature Biotechnology**. v. 25, n. 10, p. 1165-1170, 2007.

CHOULY, C.; POULIQUEN, D.; LUCET, I.; JEUNE, J.J.; JALLET, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. **Journal of Microencapsulation**. v. 13, p. 245-255, 1996.

CSORTOS, C.; KOLOSOVA, I.; VERIN, A.D. Regulation of vascular endothelial cell barrier function and cytoskeleton structure by protein phosphatases of the PPP family. **American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology**. v. 293, p.L843–L854, 2007.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução número 01 de 13 de junho de 1988: Normas de Pesquisa em Saúde. Disponível em:

- <http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/cepsms/0009/Reso001.pdf>
 Acesso: 28 de maio, 2009.
- DA SILVA, M.F.; SHÜTT, W.; TELLER, J.; HÄFELI, U.; ZBOROWSKY, M. In: SHÜTT, W.; TELLER, J.; HÄFELI, U.; ZBOROWSKY, M. **Scientific and clinical applications of magnetic carriers: an overview**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1997, 652p.
- DUNN, J.K. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**. São Paulo: Editora Roca. 2001, 1075 p.
- ESTEVANATO, L.L.C. **Investigação da biocompatibilidade de polímeros de albumina magnéticos em camundongos**. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.
- FAUCONNIER, N.; BÉE, A.; ROGER, J.; PONS, J. N. Synthesis of aqueous magnetic liquids by surface complexation of maghemite nanoparticles. **Journal of Molecular Liquids**. v. 83, p. 233-242, 1999.
- FISCHER, H. e CHAN, W.C. Nanotoxicity : the growing need for *in vivo* study. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 18, p. 55-571, 2007.
- FRAGASZY, D.; E. VISALBERGHI, L. FEDIGAN. **The Complete Capuchin: The Biology of the Genus Cebus**. Cambridge University Press, Cambridge, 2004, 947 p.
- FRANCIS, G.; BLANKENBERG, P.; KATSIKIS, D.; STORRS, R.W.; BEAULIEU, C.; SPIELMAN, D.; CHEN, J.Y.; NAUMOVSKI, L.; TAIT, J.F. Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Blood**.v. 89, n. 10, p. 3778–3786, 1997.
- GARCIA, M.P. **Estudo *in vivo* dos efeitos sub-crônicos e crônicos de nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com DMSA**. 2005. 88f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.
- GARCIA, V.A.P. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos**. 2002. 155f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular- Universidade de Brasília, Brasília.
- GARCIA, M. P.; PARCA, R. M., CHAVES, S. B.; SILVA, L. P.; SANTOS, A. D.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 293, p. 277–282, 2005.
- GEISER, M.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; KAPP, N.; SCHURCH, S.; KREYLING, W.; SHULZ, H.; SEMMLER, M.; HOF, I.; HEYDER, V.; GEHR, P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. **Environmental Health Perspectives**. v. 113, n. 11, p. 1555-1560, 2005.

GIAVEDONI, J. . Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology. **Journal of Immunological Methods**. v. 301. p.89-101, 2005.

GORDON, R. T.; HINES, J. R.; GORDON, D. Intracellular hyperthermia: a biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations **Medical Hypotheses**. v. 5, p. 83–102, 1979.

GRAHAM, R.M.; CHUA, A.C.G.; HERBISON, C.E.; OLYNYK, J.K.; TRINDER, D. Liver iron transport. **World Journal of Gastroenterology**. v. 13:35, p. 4725-4736, 2007.

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

HEIDEL, J.D.; ZHONGPING, Y.; YI-CHING LIU, J.; RELE, S.M.; LIANG, Y.; ZEIDAN, R.K.; KORNBRUST, D.J.; DAVIS, M.E. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. **PNAS**. v. 104, p. 5715-5721, 2007.

HERODIN, F.; THULLIER, P.; GARIN, D.; DROUET, M. Nonhuman primates are relevant models for research in hematology, immunology and virology. **European Cytokine Network**. v. 16 , n. 2, p. 104-116, 2005.

HUH, Y. M.; JUN, Y.; SONG, H. T.; KIM, S.; CHOI, J.C.; LEE, J. H.; YOON, S.; KIM, K. S.; SHIN, J. S.; SUH, J. S.; CHEON, J. In Vivo Magnetic Resonance Detection of Cancer by Using Multifunctional Magnetic Nanocrystals. **Journal of American Chemical Society**. v.127, n. 35, p. 12387-12391, 2005.

IMLAY, J.; S. CHIN, S.; S. LINN. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. **Science**. v. 240:4852, p. 640-642, 1988.

JAIN, T. K.; REDDY, M. K.; MORALES, M.A.; LESLIE-PELECKY, D.L.; LABHASEWAR, V. Biodistribution, Remoção, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats. **Molecular Pharmaceutics**. v. 5, n. 2, p. 316-327, 2008.

JUN, Y.; HUH, Y. M.; CHOI, J.C.; LEE, J. H.; SONG, H. T.; KIM, S.; YOON, S.; KIM, K. S.; SHIN, J. S.; SUH, J. S.; CHEON, J. Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. **Journal of American Chemical Society**. v. 127, p. 5732-5733, 2005.

JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KIM, D.H.; KIM, K.N.; KIM, K.M.; LEE, Y.K. Targeting to carcinoma cells with chitosan- and starch-coated magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia. **Journal Biomedical Materials Research**. v. 88, n. 1, p. 1-11, 2009.

- KIM, J. S.; YOON, T. J.; YU, K. N.; KIM, B. G.; PARK, S. J.; KIM, H. W.; LEE, K. H.; PARK, S. B.; LEE, J. K.; CHO, M. H. Toxicity and Tissue Distribution of Magnetic Nanoparticles in Mice. **Toxicological Sciences**. v. 89, n. 1, p. 338-347, 2005.
- KONING, G. A. E KRIJGER, G. C. Targeted multifunctional lipid-based nanocarriers for image-guided drug delivery. **Anticancer Agents Medical Chemistry**. v. 7, p. 425-440, 2007.
- KREUTER, J. Nanoparticles- a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 33, p.1 -10, 2007.
- KUMAR, A.; JENA, P.K.; BEHERA, S.; LOCKEY, R.F.; MOHAPATRA, S.; MOHAPATRA, S. Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Targeted Delivery. **Nanomedicine**. Ahead of print. 13 maio, 2009.
- L'AZOU, B.; JORLY, J.; ON, D.; SELLIER, E.; MOISAN, F.; FLEURY-FEITH, J.; CAMBAR, J.; BROCHARD, P.; OHAYON-COURTÈS, C. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. **Particle and Fiber Toxicology**. v. 5, n. 22, 2008.
- LACAVA, L.M.; LACAVA, Z.G.M.; AZEVEDO, R.B.; CHAVES, S.B.; GARCIA, V.A.P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C., DA SILVA, M.F., MORAIS, P.C. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 252, p.367-369, 2002.
- LANGER, R. Drug delivery: drugs on target. **Science**. v. 293, p. 58–59, 2001.
- LANZA, G.M.; WINTER, P.M.; CARUTHERS, S.D.; MORAWSKI, A.M.; SCHMIEDER, A.H.; CROWDER, K.C.; WICKLINE, S.A. Magnetic resonance molecular imaging with nanoparticles. **Journal of Nuclear Cardiology**. v.11, p.733-743, 2004.
- LARSSON, M.H.M.A.; LUCAS, S.R.R.; MIRANDOLA, R.M.S.; LAZARETTI, P.; FEDULHOS, J.D.L.; GUIMARÃES, M.A.B.V. Valores de referência das provas de funções hepática, renal e de alguns eletrólitos em *Cebus apella*, anestesiados com cetamina. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 27, n. 2, p.257-262, 1997.
- LEI, R.; WU, C.; YANG, B.; MA, H.; SHI, C.; WANG, Q.; WANG, Q.; YUAN, Y.; LIAO, M. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid in vivo screening method for nanotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 232, p. 292-301, 2008.
- LI, S.D e HUANG, L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**. v. 5, n. 4, p. 496-504, 2008.
- LIBERTI, P. A.; RAO, C. G.; TERSTAPPEN, L.W. Optimization of ferrofluids and protocols for the enrichment of breast tumor cells in blood. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 225, p. 301–307, 2001.

LONGMIRE, M.; CHOYKE, P.L.; KOBAYASHI, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. **Nanomedicine**. v. 3, n. 5, p.703-711, 2008.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacological Reviews**. v. 53, p. 283 -318, 2001.

MOORE, A.; JOSEPHSON, L.; BHORADE, R.M.; BASILION, J.P.; WEISSLEDER, R. Human transferrin receptor gene as a marker gene for MR imaging. **Radiology**. v.221, n. 1, p. 244-50, 2001.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E., OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. **Environmental Health Perspectives**. v. 113, n. 7, p. 823-839, 2005.

PANKHURST, Q.A.; CONNOLLY, J.; Jones, S.K.; Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**. v. 36, R167–R181, 2003.

PARCA, R.M. **Estudos morfológicos dos efeitos de nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com DMSA, em fígado de camundongo Swiss**. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

PATTON, J.S. e BYRON, P.R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. **National Reviews in Drug Discovery**. v. 6, p. 67–74, 2007.

PATTON, J.S.; FISHBURN, C.S e WEERS, J.G. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. **Proceedings of the American Thoracic Society**. v. 1, p. 338–344, 2004.

PAUL, F.; MELVILLE, D.; ROATH, S.; WARHURST, D. A bench top magnetic separator for malarial parasite concentration. **IEEE Transactions on Magnetics**. v. 17, p. 2822–2824, 1981.

PEIXOTO, D.L.G. **Avaliação da biocompatibilidade da Anfotericina B em duas formulações: livre e associada com nanopartículas magnéticas**. 2008. 114f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular- Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília).

PERLS, M. Nachweis von Eisenoxyd in gewissen prigmentem. **Virchows Archiv**. v. 29, n. 42, 1867.

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

PORTO, G.; M. DE SOUSA. Iron overload and immunity. **World Journal of Gastroenterology**. v. 13, n. 35, p. 4707-4715, 2007.

PROPHET, E.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Métodos Histotécnicos**. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos (AFIP). ISBN: 1-881041-00-x. 1992.

ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**. United States. v. 14, p.337–346, 2003.

SADEGHIANI, N. **Avaliação in vivo da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico**. 2004. 90f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)- Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

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

SAYES, C.M.; REED, K.L.; WARHEIT, D.B. Assessing Toxicity of Fine and Nanoparticles: Comparing *In Vitro* Measurements to *In Vivo* Pulmonary Toxicity Profiles. **Toxicological Sciences**. v. 97, n. 1, p. 163-180, 2007.

SEESOD, N.; NOPPARAT, P.; HEDRUM, A.; HOLDER, A.; THAITHONG, S.; UHLEN, M.; LUNDEBERG, J. An integrated system using immunomagnetic separation, polymerase chain reaction, and colorimetric detection for diagnosis of *Plasmodium Falciparum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 56, p. 322–328, 1997.

SHAW, B. L., e BATTLE, H.I. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Canadian Journal of Zoology**. v. 35: p. 325-347, 1957.

SOLER, M. A.G.; BÁO, S.N.; ALCÂNTARA, G.; TIBÚRCIO, V.H.S.; PALUDO, G.R.; SANTANA, J.F.B.; GUEDES, M.H.; LIMA, E.C.D.; LACAVA, Z.G.M.; MORAIS, P.C. Interaction of Erythrocytes with Magnetic Nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 7, n. 3, p. 1069-1071, 2007.

SOUSA, M. Immune cell functions in iron overload. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 75, p. 1-6, 1989.

SUN, C.; LEE, J.S.H.; ZHANG, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, p. 1252–1265, 2008.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**. v. 267, n. 5203, p. 1456-62,1995.

TOSI, G.; COSTANTINO, L.; RUOZI, B.;FORNI, F.; VANDELLI, M. A. Polymeric nanoparticles for the drug delivery to the central nervous system. **Expert Opinion Drug Delivery**. v. 5, n. 2, p. 155 -174, 2008.

WALLAC, J. **Interpretação de exames de laboratório**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

WAREING, M.; FERGUSON, C.J.; RICCARDI, D.; SMITH, C.P. In vivo characterization of renal iron transport in the anaesthetized rat. **Journal of Physiology**. v. 524, n. 2, p. 581—586, 2000.

WEISS, G.; WACHTER, H.; FUCHS D. Linkage of cell mediated immunity to iron metabolism. **Immunology Today**. v. 16, n. 10, p. 495-500, 1995.

WILLEMS & VAN DEN WILDENBERG. NanoRoadMap: Work document on Nanomaterials. W&W España s.l. 2004.

WIRZ, A.; TRUPPA, V.; e RIVIELLO, C. Hematological and Plasma Biochemical Values for Captive Tufted Capuchin Monkeys (*Cebus apella*). **American Journal of Primatology**. v. 70, p. 1-10, 2008.

ZHAO, M.; BEAUREGARD, D.; LOIZOU, L.; DAVLETOV, B.; BRINDLE, K. Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent. **Nature Medicine**. v. 7, p. 1241—4, 2001.

X. ANEXO



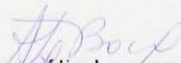
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 27 de fevereiro de 2007.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**INVESTIGAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DE FLUIDOS MAGNÉTICOS RECOBERTOS COM DMSA EM MACACO-PREGO (CEBUS SPP.)**”, sob responsabilidade do Prof. Ricardo Bentes Azevedo, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Prof. Anamélia Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA