

Danilo Antonio da Silva

**Síntese e caracterização de partículas de poli(álcool vinílico)
utilizadas em aplicações biomédicas: contribuição da análise
fractal e entropia de Shannon.**

São José do Rio Preto
2011

DANILO ANTONIO DA SILVA

**Síntese e caracterização de partículas de poli(álcool vinílico)
utilizadas em aplicações biomédicas: contribuição da análise
fractal e entropia de Shannon.**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

Co-orientadora: Dra. Rosa Sayoko Kawasaki-Oyama

São José do Rio Preto
2011

Silva, Danilo Antonio da.

Síntese e caracterização de partículas de poli(álcool vinílico) utilizadas em aplicações biomédicas: contribuição da análise fractal e entropia de Shannon / Danilo Antonio da Silva. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

98 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Geraldo Nery

Co-orientadora: Rosa Sayoko Kawasaki-Oyama

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Polimerização. 2. Polímeros de vinil. 3. Análise fractal. 4. Entropia de Shannon. 5. Poli(álcool vinílico). 6. Embolização. 7. Quimioembolização. I. Nery, José Geraldo. II. Silva, Danilo Antonio da. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título

CDU – 66.095.26

DANILO ANTONIO DA SILVA

**Síntese e caracterização de partículas de poli(álcool vinílico)
utilizadas em aplicações biomédicas: contribuição da análise
fractal e entropia de Shannon.**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Geraldo Nery
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy
Professor Adjunto
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
Professor Titular
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 06 de dezembro de 2011.

Dedico este trabalho

Ao meu pai (*in memoriam*)

Amarildo Antonio da Silva

vivo e presente em minhas lembranças, alimentando meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor pela saúde, família, pão e paz concedida.

Ao professor e orientador, Dr. José Geraldo Nery, exemplo de ética e profissionalismo. Não mediu esforços para proporcionar a oportunidade de adquirir conhecimento. Ao longo desses poucos anos de trabalho procurei retribuir a confiança, investimento e paciência que resultaram em minha evolução profissional e pessoal.

À toda minha família pelo amor, educação e apoio. À minha namorada, que me acompanha com imensa dedicação e carinho.

À profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto e ao prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade pela realização dos implantes das partículas de PVA, realizadas na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP – Câmpus de Araçatuba). Aos mestrandos Silmara e Gabriel pelo cuidado e carinho que tiveram com importantes personagens deste trabalho: os ratos que foram submetidos ao estudo histopatológico.

Ao prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy pelo auxílio nas análises de dimensão fractal, entropia de Shannon e análises estatísticas. Ao prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pelo auxílio na realização do estudo histopatológico e ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior pela confecção das laminas histológicas.

Aos companheiros de laboratório pelo excelente convívio, amizades e ótimo ambiente de trabalho. Um agradecimento especial à Glaucia e Vinícius pelo auxílio na síntese das microesferas, discussão da literatura e contribuições na redação. Aos amigos de curso na pós-graduação pelo apoio na realização das disciplinas.

Ao programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, ao Departamento de Física, à Seção de Pós-Graduação, aos técnicos do laboratório, à todos os professores e funcionários que souberam realizar suas atividades quando solicitados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido mediante bolsa de estudo, à Pró-Reitoria de Extensão Universitária (Proex) pelo auxílio financeiro para participação em Congressos e Simpósios, à empresa *Braile Biomédica* e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Fica aqui um agradecimento àquelas pessoas e instituições que não foram citadas, mas que contribuíram para a realização deste trabalho, minha formação pessoal e profissional.

MUITO OBRIGADO

*Se a ciência visa à verdade, deve visar à consistência; se ela renuncia à consistência, renuncia à verdade. Afirmar que “devemos ser modestos em nossas experiências”, que devemos resignar-nos às inconsistências - fracas ou fortes - continua a ser um vício metodológico.**

Niels Henrik David Bohr (1885-1962)

* Paráfrase de Bohr (*The Structure of the Atom*, 1922) retirado do ensaio “O Falseamento e a metodologia dos programas de Pesquisa Científica”, pág. 176 (LAKATOS, I. O falseamento e a metodologia dos programas de pesquisa científica. In: LAKATOS, I.; MUSGRAVE, A. **A crítica e o desenvolvimento do conhecimento**. São Paulo: Cultrix, 1979, p. 109-241).

RESUMO

Embolização e quimioembolização são exemplos de procedimentos minimamente invasivos aplicados em medicina com objetivo de evitar e/ou amenizar efeitos colaterais causados por tratamentos e intervenções cirúrgicas convencionais. Partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) destacam-se entre os materiais utilizados nesses procedimentos por apresentarem características físico-químicas desejáveis como elevada compressibilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. A proposta deste trabalho foi sintetizar e caracterizar microesferas de PVA/PVAc com tamanhos de partículas entre 30µm e 1200µm por reação de polimerização em suspensão seguida por uma etapa de saponificação. Além disso, estudar a influência da concentração de solução alcalina no processo de saponificação. A caracterização morfológica e estrutural foi feita com auxílio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-X (DRX). Além da caracterização físico-química, foi realizado o estudo histopatológico mediante implante subcutâneo das partículas em ratos, análise de dimensão fractal e entropia de Shannon. Os resultados mostraram que a concentração de solução alcalina exerce forte influência na cristalinidade, coloração e características superficiais do polímero obtido. As partículas com alta cristalinidade (saponificadas com solução 25 mol/L de NaOH) induziram à reação inflamatória similar ao comportamento observado para partículas disponíveis comercialmente, enquanto que as partículas menos cristalinas (saponificadas com solução 4 mol/L de NaOH) resultaram em baixa intensidade de reação inflamatória no tecido celular subcutâneo dos ratos. Dimensão fractal e entropia de Shannon apresentaram correlação satisfatória com a análise histopatológica: os valores obtidos sofreram alterações conforme o tempo de permanência das partículas nos ratos, comportamento foi satisfatório do ponto de vista clínico pois corrobora com as mudanças qualitativas observadas nos tecidos subcutâneos como resposta à perturbação do sistema imunológico devido ao implante das partículas. A intensidade de reação inflamatória induzida por cada partícula também apresentou correlação com os parâmetros observados na análise histopatológica: os tecidos subcutâneos que receberam as partículas cristalinas apresentaram dimensão fractal e entropia de Shannon significativamente maiores que os resultados obtidos para as partículas amorfas. Com relação aos tecidos que receberam a partícula cristalina e comercial, os resultados foram similares estatisticamente.

Palavras-chave: análise fractal; embolização; entropia de Shannon; análise histopatológica; polimerização; poli(álcool vinílico).

ABSTRACT

Embolization and chemoembolization are examples of minimally invasive procedures applied in medicine in order to avoid and/or reduce side effects caused by conventional treatments and surgeries. Particles of poly(vinyl alcohol) (PVA) stand out among these materials due to desirable physical and chemical characteristics such as high compressibility, biocompatibility and biodegradability. The purpose of this study was to synthesize and characterize PVA/PVAc microspheres with sizes between 30 μ m and 1200 μ m by reaction of suspension polymerization step followed by a process of saponification. Moreover, study the influence of the concentration of alkaline solution in the process of saponification. The morphological and structural characterization was made with scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD). In addition to the physico-chemical characterization, it was carried the histopathological study by subcutaneous implantation of particles in rats, analysis of fractal dimension and Shannon's entropy. The results indicated that the concentration of alkaline solution strongly influence the crystallinity, color and surface characteristics of the polymer. Highly crystalline particles (saponified with 25 mol/L NaOH) induced inflammatory reaction similar to the behavior observed for the commercial particles, while particles with lower crystallinity (saponified with 4 mol/L NaOH) presented lower inflammation in the subcutaneous tissue of rats. Fractal dimension and Shannon's entropy showed satisfactory correlation with the histopathological analysis: the values have changed as the permanence time of particles in rats, behavior was satisfactory from a clinical standpoint because it corroborates the qualitative changes observed in the subcutaneous tissues in response to disturbance of the immune system due to implantation of the particles. The intensity of inflammatory reaction induced by each particle also correlated with the parameters observed in the histopathological analysis: the subcutaneous tissues that received the crystalline particles were fractal dimension and Shannon's entropy significantly higher than the results obtained for the amorphous particles. With respect to the tissues that received the crystalline particle and commercial, the results were statistically similar.

Keywords: embolization; fractal analysis; histopathological analysis; polymerization; poly(vinyl alcohol); Shannon's entropy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Embolização de mioma uterino com partículas de poli(álcool vinílico) (PVA). (a) e (b) As partículas, compatíveis com o diâmetro das artérias, são conduzidas até o mioma com a utilização de um microcateter. (c) O bloqueio do fluxo sanguíneo resulta na necrose do mioma.	22
Figura 2: (a) e (b) Para um fígado normal, 25% do suprimento sanguíneo é fornecido pela artéria hepática enquanto 75% provém da veia porta. A região neoplásica é irrigada quase que exclusivamente pela artéria hepática. Assim, a embolização da artéria provoca a hipoxia e necrose do tumor, enquanto o fígado continua sendo irrigado pela veia porta (DODD et al., 2000). (c) Exame angiográfico realizando antes (A) e após (B) embolização de um tumor hepático. Na figura é possível visualizar a desvascularização do tumor após implante dos agentes embólicos (MALAGARI et al., 2008a).	23
Figura 3: Investimentos de empresas americanas em pesquisa e desenvolvimento de produtos e tratamentos direcionados à aplicação em medicina veterinária.	26
Figura 4: O diagrama representa um procedimento de embolização de artérias renais. (a) Partículas com pequeno diâmetro provocam oclusão de um vaso sanguíneo próximo ao órgão onde é necessária a embolização, enquanto que (b) partículas com maior diâmetro ocluem artérias distantes do local desejado, induzindo à isquemia de uma grande região (LÓPEZ-BENÍTEZ et al., 2009).	28
Figura 5: Esquema do tubo de raios catódicos e ilustração da produção de radiação (CULLITY, 1978).	32
Figura 6: Exemplo de cela unitária para o cloreto de sódio (CULLITY, 1978).	33
Figura 7: (a) Ilustração do fenômeno de difração. Os raios-X são difratados após interação com os elétrons do material, resultando na emissão de ondas eletromagnéticas em fase e defasadas, (b) Esquema para dedução da Lei de Bragg.	33
Figura 8: (a) Detalhe do sistema de obtenção de dados: tubo de raios catódicos (fonte de raios-X), porta amostra e detector de radiação, (b) Condições experimentais: a amostra gira de um ângulo θ enquanto o detector é girado em ângulo 2θ (CULLITY, 1978).	34
Figura 9: Diferentes padrões de difração de raios-X. Para um material cristalino, seus átomos estão ordenados e há periodicidade de sua cela unitária. Assim, seu padrão de difração apresentará picos estreitos e intensos. Diferentemente, nos sólidos amorfos suas estruturas moleculares estão menos organizadas, resultando em picos de difração alargados (CULLITY, 1978).	35
Figura 10: Detalhe dos elementos que constituem o microscópio eletrônico de varredura. Basicamente, é composto de uma coluna óptico-eletrônica (canhão de elétrons e sistema de redução do diâmetro do feixe eletrônico), unidade de varredura, câmara da amostra, sistemas de detectores e visualização da imagem (SKOOG et al., 2002).	36

Figura 11: Ilustração do conceito de auto-similaridade. As imagens fractais descritas são obtidas pela repetição de elementos que apresentam a mesma estrutura. (a) Curva de Koch (HEYMANS et al., 2000); (b) Triângulo de Sierpinski. Descrito pelo matemático polonês Wacław Sierpinski (1882-1969) consiste na formação de uma figura composta pela repetição de vários triângulos equiláteros.	38
Figura 12: Dimensão fractal para diferentes tipos de curvas, indicando a diferença entre os valores obtidos para a análise topológica (geometria euclidiana) e fractal (HEYMANS et al., 2000).	39
Figura 13: Exemplo do procedimento realizado pelo método box-counting. (a) Trata-se de um objeto preenchido com cubos de lado L . (b) A dimensão fractal é obtida mediante relação entre a dimensão L e o número de cubos $N(L)$ necessários para cobrir o objeto (KEDZIA et al., 2002).	40
Figura 14: Na figura são mostradas quatro imagens preenchidas com quadrados de diferentes tamanhos. Observe que o número $N(L)$ de caixas necessárias para cobrir a imagem é inversamente proporcional à dimensão (L) do quadrado (LANDINI, 2011).	40
Figura 15: (a) Exemplo de contorno irregular ajustado pelo método de <i>box-counting</i> . Quanto menor for o tamanho dos quadrados, maior será o número $N(L)$ de quadrados necessários para cobrir a imagem (BAISH, JAIN, 2000). (b) Gráfico log-log para obtenção da dimensão fractal.	41
Figura 16: A diferença entre o alto ordenamento dos fenótipos para tecidos normais e a heterogeneidade apresentada nas células neoplásicas deve-se à instabilidade genética. Essa diversidade e baixo nível de organização celular observada no câncer é uma característica de sistemas caóticos (COFFEY, 1998).	43
Figura 17: Para cada um dos genes hipotéticos, os valores para entropia de Shannon do sistema estão relacionados com a variação temporal para expressão gênica (FUHRMAN et al., 2000).	44
Figura 18: (a) Esquema básico do reator utilizado nas sínteses das microesferas de PVA; (b) e (c) Aparato experimental e detalhe do reator utilizado nas sínteses.	47
Figura 19: (a) Detalhe do tecido celular subcutâneo submetido ao implante das partículas e (b) Localização dos grupos de partículas implantadas (procedimento foi padronizado para todos os animais).	50
Figura 20: Exemplos de imagens de MEV utilizadas para cálculo de dimensão fractal e entropia de Shannon (a1, a2, a3: 4 mol/L com aumento 50X; b1, b2, b3: 25 mol/L com aumento 50X; c1, c2, c3: 4 mol/L com aumento 100X; d1, d2, d3: 25 mol/L com aumento 100X).	52
Figura 21: Exemplos de imagens de microscopia ótica utilizadas no cálculo de dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos celulares subcutâneos submetidos ao implante das partículas 4 mol/L (a1, a2, a3: aumento 4X; b1, b2, b3: aumento 10X; c1, c2, c3: aumento 20X; d1, d2, d3: aumento 40X).	53

Figura 22: Exemplos de imagens de microscopia ótica utilizadas no cálculo de dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos celulares subcutâneos submetidos ao implante das partículas 25 mol/L (a1, a2, a3: aumento 4X; b1, b2, b3: aumento 10X; c1, c2, c3: aumento 20X; d1, d2, d3: aumento 40X).	54
Figura 23: Exemplos de imagens de microscopia ótica utilizadas no cálculo de dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos celulares subcutâneos submetidos ao implante das partículas comerciais (a1, a2, a3: aumento 4X; b1, b2, b3: aumento 10X; c1, c2, c3: aumento 20X; d1, d2, d3: aumento 40X).	55
Figura 24: Exemplos de imagens de microscopia ótica utilizadas no cálculo de dimensão fractal e entropia de Shannon do tecido celular subcutâneo para o animal controle (a1, a2, a3: aumento 4X; b1, b2, b3: aumento 10X; c1, c2, c3: aumento 20X; d1, d2, d3: aumento 40X).	56
Figura 25: Padrões de difração de raios-X para as partículas sintetizadas usando diferentes concentrações de NaOH na saponificação (M = mol/L; u.a. = unidades arbitrárias).	57
Figura 26: Padrões de difração de raios-X para as partículas sintetizadas usando 4 mol/L, 25 mol/L de NaOH na saponificação e partícula comercial (<i>Contour PVA Embolization Particles</i> , Boston Scientific, Natick, USA).	58
Figura 27: MEV das amostras sintetizadas e partículas comerciais. (a), (b) Partículas sintetizadas usando solução 4 mol/L de NaOH na saponificação (aumentos de 50X e 100X); (c), (d) 25 mol/L de NaOH na saponificação (aumentos de 50X e 100X); (e) <i>Contour PVA Embolization Particles</i> , Boston Scientific, Natick, USA (aumento de 100X); (f) <i>PVA Foam Embolization Particles</i> , Cook Medical, Bloomington, USA (aumento de 100X).	59
Figura 28: Comparação entre as superfícies das partículas sintetizadas. (a), (b) e (c) 4 mol/L de NaOH na saponificação; (d), (e) e (f) 25 mol/L de NaOH na saponificação (aumentos de 500X, 5000X e 10000X).	60
Figura 29: Comparação entre reação inflamatória para as partículas do grupo 1 (4 mol/L) após diferentes períodos de permanência nos animais. (a) 7 dias; (b) 15 dias; (c) 30 dias; (d) Intensidades para cada período. Em todos os períodos houve encapsulamento das partículas, indicado pelas setas. A reação inflamatória evoluiu de um granuloma, aos 7 e 15 dias, para colágeno após 30 dias de permanência nos ratos.	61
Figura 30: Comparação entre reação inflamatória para as partículas do grupo 2 (25 mol/L) após diferentes períodos de permanência nos animais. (a) 7 dias; (b) 15 dias; (c) 30 dias; (d) Intensidades para cada período. Observa-se infiltração do tecido conjuntivo nas partículas em todos os períodos analisados, além da presença de células mononucleares e células gigantes multinucleadas.	62
Figura 31: Comparação entre reação inflamatória para as partículas do grupo 3 (comerciais) após diferentes períodos de permanência nos animais. (a) 7 dias; (b) 15 dias; (c) 30 dias; (d) Intensidades para cada período. As partículas apresentaram reação inflamatória constituída por células gigantes multinucleadas associadas com infiltrado histoplasmocitário e tecido conjuntivo.	63

Figura 32: Gráfico <i>box-plot</i> para dimensão fractal das partículas de PVA antes do implante subcutâneo (resultados de MEV): (a) aumento 50X e (b) aumento 100X.	65
Figura 33: Gráfico <i>box-plot</i> para entropia de Shannon das partículas de PVA antes do implante subcutâneo (resultados de MEV): (a) aumento 50X e (b) aumento 100X.	65
Figura 34: Gráfico <i>box-plot</i> para dimensão fractal dos tecidos subcutâneos. (a) Resultados agrupados por período de permanência nos ratos e (b) Valores para cada partícula nos diferentes períodos de permanência nos ratos.	70
Figura 35: Gráfico <i>box-plot</i> para entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos. (a) Resultados agrupados por período de permanência nos ratos e (b) Valores para cada partícula nos diferentes períodos de permanência nos ratos.	71
Figura 36: Fórmula estrutural do agente quimioterápico Cloridrato de Irinotecano ($C_{33}H_{38}N_4O_6 \cdot HCl$).	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros utilizados nas etapas de polimerização e saponificação das microesferas de PVA/PVAc.	47
Tabela 2: Avaliação patológica dos tecidos subcutâneos após diferentes períodos de permanência das partículas.....	60
Tabela 3: Resultados para dimensão fractal, entropia de Shannon e comparação estatística entre os valores obtidos para as partículas de PVA antes do implante subcutâneo.	64
Tabela 4: Dimensão fractal para os tecidos celulares subcutâneos nos diferentes períodos de permanência das partículas nos ratos.	67
Tabela 5: Entropia de Shannon para os tecidos celulares subcutâneos nos diferentes períodos de permanência das partículas nos ratos.....	67
Tabela 6: Análise estatística comparativa para dimensão fractal e entropia de Shannon – resultados para cada partícula nos diferentes períodos de permanência nos ratos.	68
Tabela 7: Análise estatística comparativa para dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos celulares subcutâneos – comparação entre as diferentes partículas implantadas nos ratos.	69
Tabela 8: Análise estatística comparativa dos tecidos subcutâneos - animal controle e animais submetidos ao implante das partículas.	75
Tabela 9: Dimensão fractal dos tecidos subcutâneos - animal controle e animais submetidos ao implante das partículas (resultados agrupados por período de permanência nos ratos).	90
Tabela 10: Dimensão fractal dos tecidos subcutâneos - animal controle e animais submetidos ao implante das partículas (resultados para cada partícula nos diferentes períodos de permanência).	91
Tabela 11: Entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos - animal controle e animais submetidos ao implante das partículas (resultados agrupados por período de permanência nos ratos).	92
Tabela 12: Entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos - animal controle e animais submetidos ao implante das partículas (resultados para cada partícula nos diferentes períodos de permanência).....	93

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Exemplos de agentes embólicos permanentes e temporários utilizados em procedimentos de embolização (VAIDYA et al., 2008).	21
Esquema 2: Representação do tautomerismo ceto-enólico: equilíbrio da reação desloca-se no sentido de formação de um ceto-composto, cuja estrutura apresenta um hidrogênio ligado ao átomo de carbono, diferentemente de uma estrutura enólica (MORRISON, BOYD, 1996). ...	30
Esquema 3: A reação se inicia com a formação de radicais livres a partir do peróxido de benzoíla. Esse processo ocorre quando a ligação entre os oxigênios é rompida, motivada pelo ganho de energia cinética das moléculas devido ao aumento na temperatura reacional do sistema.	30
Esquema 4: Na segunda etapa da polimerização, cada radical livre interage com o monômero (acetato de vinila) iniciando a propagação em cadeia para formação do PVAc.	31
Esquema 5: Após os radicais livres se ligarem aos monômeros, a polimerização entra no estágio de propagação com a ligação sequencial das unidades monoméricas.	31
Esquema 6: A polimerização é finalizada com a combinação e formação do PVAc.	31
Esquema 7: Reação de formação do PVA mediante adição de solução alcalina ao PVAc. O segundo produto da reação é o acetato de sódio (CH_3COONa).	31
Esquema 8: Fórmulas estruturais dos reagentes e produtos envolvidos na formação do PVA.	31
Esquema 9: Descrição dos procedimentos para síntese das microesferas de PVA/PVAc.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIATURAS

ADO – *Amplatzer duct occluder*

AVP – *Amplatzer vascular plug*

DRX – Difração de raios-X

EDS – *Energy dispersive spectroscopy*

EHPSS – *Extrahepatic portosystemic shunts*

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PDA – *Patent ductus arteriosus*

PVA – Poli(álcool vinílico)

PVAc – Poli(acetato de vinila)

PVPI – Poli(pivalato de vinila)

TGMS – *Trisacryl gelatin microspheres*

VAc – Acetato de vinila

UV – Ultravioleta

SIGLAS

CEEA – Comissão de Ética e Experimentação Animal

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos

IBILCE – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

FMVA – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

SUS – Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ESQUEMAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
INTRODUÇÃO	17
MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	18
CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
1.1. Radiologia Intervencionista.....	20
1.2. Embolização	21
1.2.1. Agentes embólicos	23
1.2.1.1. Aplicações de agentes embólicos em medicina veterinária	24
1.3. Quimioembolização.....	24
1.3.1. Partículas utilizadas em quimioembolização	25
1.3.2. Drug delivery em medicina veterinária.....	25
1.3.3. Embolização e quimioembolização com PVA em medicina veterinária	26
1.4. Partículas de poli(álcool vinílico) (PVA)	28
1.4.1. Polimerização em suspensão de PVA/PVAc	29
1.5. Caracterização físico-química	32
1.5.1. Difração de raios-X.....	32
1.7.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	35
1.8. Análise fractal e entropia de Shannon	37
1.8.1. Análise fractal	37
1.8.1.1. Cálculo de dimensão fractal pelo método de box-counting	39
1.8.2. Aplicações em medicina e sistemas biológicos	42
1.8.3. Entropia de Shannon	44
OBJETIVOS	45
Objetivo geral	45
Objetivos específicos.....	45
CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1. Materiais	46

2.1.1. <i>Síntese das microesferas de PVA</i>	46
2.2. Caracterização físico-química	48
2.2.1. <i>Caracterização estrutural por difração de raios-X</i>	49
2.2.2. <i>Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura</i>	49
2.3. Análise histopatológica	49
2.4. Dimensão fractal e entropia de Shannon	50
2.4.1. <i>Análise para as partículas antes do implante subcutâneo</i>	51
2.4.2. <i>Análise para os tecidos celulares subcutâneos</i>	52
CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1. Caracterização estrutural e morfológica	57
3.2. Análise histopatológica	60
3.3. Dimensão fractal e entropia de Shannon	64
3.3.1. <i>Dimensão fractal e entropia de Shannon antes do implante subcutâneo</i>	64
3.3.2. <i>Dimensão fractal e entropia de Shannon para os tecidos celulares subcutâneos</i>	66
CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES	78
CAPÍTULO V – PERSPECTIVAS	79
5.1. Suspensão e liberação das microesferas de PVA/PVAc	79
5.2. Funcionalização química das microesferas com o fármaco Irinotecano	79
5.2.1. <i>Determinação do nível de carregamento</i>	80
5.2.2. <i>Liberação da droga in vitro</i>	80
5.2.3. <i>Avaliação da compressibilidade das microesferas</i>	80
5.3. Experimentos in vivo com as microesferas de PVA/PVAc	80
REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE	90
APÊNDICE A: RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE DIMENSÃO FRACTAL E ENTROPIA DE SHANNON.....	90
ANEXOS	94
ANEXO A: PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS E ANAIS DE EVENTOS	94
ANEXO B: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE IMPLANTE SUBCUTÂNEO	95
ANEXO C: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE EMBOLIZAÇÃO	96

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da nanotecnologia e a decodificação do genoma humano estão entre as maiores conquistas do século XX. O conhecimento da estrutura genética permitiu a compreensão dos mecanismos que envolvem inúmeras doenças como neoplasias, doenças cardiovasculares, distrofias musculares e hemofilias. Como resultado, abriu-se uma variedade de possibilidades para criação de medicamentos e terapias. Assim, tratamentos avançados e controles de doenças específicas tornaram-se realidade (REINEKE, GRINSTAFF, 2005). Concomitantemente à busca por novas terapias e medicamentos, a nanotecnologia permitiu o desenvolvimento de vetores mais eficientes no transporte de medicamentos (*targeted drug delivery*). Esses vetores podem ser classificados em dois tipos: virais e não-virais. Os vetores virais são vírus desprovidos de sua carga genética, enquanto que os vetores não-virais são materiais orgânicos ou inorgânicos que possuem a capacidade de realizar transfecção celular (penetração da célula pelo vetor não viral) (LUO, 2005). O desenvolvimento destes materiais e o avanço nas pesquisas permitiu a otimização de vários fatores associados aos tratamentos médicos como a melhoria na cinética de liberação de medicamentos, diminuição dos efeitos colaterais, melhor direcionamento e acompanhamento dos tratamentos (DOSHI et al., 2009).

Biopolímeros são exemplos de vetores não-virais e destacam-se como tema das pesquisas atuais e futuras em biotecnologia, cujas estratégias de estudo baseiam-se na descoberta de novos materiais e desenvolvimento de métodos para sua fabricação (DOSHI et al., 2009). Propriedades fundamentais destes biomateriais incluem tamanho controlado, morfologia específica, peso molecular, baixa toxicidade e biodegradabilidade (EDLUND, ALBERTSSON, 2002). Partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) destacam-se por apresentarem características físico-químicas desejáveis como compressibilidade, elasticidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (PEIXOTO et al., 2006).

Os procedimentos de embolização e quimioembolização são exemplos de tratamentos minimamente invasivos alvo da aplicação de biopolímeros. Nesses tratamentos, a utilização de polímeros com morfologia esférica e tamanhos específicos pode minimizar a ocorrência de problemas associados à aplicação de partículas não-esféricas (floculares) que incluem aglutinação, oclusão incompleta e obstrução de cateteres em locais que antecedem o alvo desejado (LAURENT, 2007; RASULI et al., 2008). Dessa forma, o desenvolvimento de biopolímeros com essas características justifica-se pela potencialidade de aplicação em tratamentos minimamente invasivos.

MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

A pesquisa e desenvolvimento de novos materiais biopoliméricos para serem aplicados em procedimentos minimamente invasivos destaca-se como atraente linha de pesquisa, com grande potencial mercadológico. Os números de mercado para materiais utilizados em procedimentos de embolização e quimioembolização são expressivos: estima-se que em 2010 foram investidos US\$ 650 milhões em partículas para embolização de mioma uterino (ginecologia intervencionista minimamente invasiva) e US\$ 380 milhões em partículas destinadas à quimioembolização de câncer do fígado (oncologia intervencionista) nos Estados Unidos, China, Brasil, Japão e União Européia; além de um investimento de US\$ 110 milhões em partículas para embolização e quimioembolização de hiperplasia prostática benigna (urologia intervencionista) apenas no mercado norte americano (BIOSPHERE MEDICAL, 2010). Na América Latina, o consumo de produtos utilizados em embolização alcançou o valor de US\$ 35 milhões em 2008. O Brasil, com 40% deste mercado, destaca-se como maior responsável, seguido pela Argentina com 15%.

O mioma uterino, que dispõe da embolização como importante opção de tratamento, atinge cerca de 40% das mulheres brasileiras em idade fértil. A embolização do mioma uterino é um tratamento simples, com índice de 90% de sucesso e normalização do ciclo menstrual, sem comprometimento da fertilidade. O tratamento exige somente um dia de internação e quinze dias para completa recuperação, enquanto que a intervenção cirúrgica necessita internação mínima de sete dias e quarenta dias para recuperação, além do risco de comprometimento da fertilidade (BIOSPHERE MEDICAL, 2010).

O câncer de fígado, responsável pelo maior número de tratamentos por quimioembolização, destaca-se como 4º câncer mais letal no Brasil, sendo detectados cerca de três mil casos anualmente. No mundo, estima-se que ocorram 600 000 casos anualmente, sendo a China o maior responsável por esse índice (BIOSPHERE MEDICAL, 2010). Pode-se considerar a quimioembolização como tratamento relativamente recente no Brasil, pois não há números e estatísticas disponíveis sobre sua aplicação. Nos Estados Unidos, cerca de 50% dos pacientes com câncer de fígado são submetidos à quimioembolização (BIOSPHERE MEDICAL, 2010). O maior obstáculo para o tratamento por quimioembolização no Brasil é o custo. A maioria dos materiais são importados, impossibilitando sua realização por muitas instituições e pacientes, atingindo principalmente usuários do Sistema Único de Saúde (SUS).

Diante dessa problemática, o desenvolvimento de um projeto de pesquisa visando a síntese e caracterização de novos vetores poliméricos para utilização em embolização e quimioembolização justifica-se pois possibilitará a substituição das importações, implicando em benefícios mercadológicos e diminuição do valor cobrado pelo produto. A consequência será redução de gastos dos hospitais e convênios que comprem este material, possibilitando que o tratamento seja mais acessível à população, além da geração de avanços científicos na área de radiologia intervencionista. As partículas, com tecnologia nacional, serão produzidas em convênio com pesquisadores da empresa *Braile Biomédica Ind., Com. e Rep. Ltda* que fornecerão suporte técnico, científico e financeiro para realização do projeto de pesquisa.

Sendo assim, a proposta deste trabalho foi sintetizar e caracterizar novos vetores poliméricos para utilização em embolização e quimioembolização, com aplicação em medicina humana e veterinária. Os vetores são microesferas de PVA/PVAc obtidas por reação de polimerização em suspensão, seguida por uma etapa de saponificação, com tamanhos de partículas entre 30 μ m e 1200 μ m. Também foi estudada a influência da concentração de solução alcalina no processo de saponificação. A caracterização morfológica e estrutural foi realizada com auxílio das técnicas de difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura, além da análise de dimensão fractal, entropia de Shannon e estudo histopatológico mediante implante subcutâneo em ratos.

A apresentação e construção do trabalho dar-se-á em cinco capítulos. No primeiro capítulo são apresentadas as bases teóricas e objetivos de pesquisa. O segundo capítulo trata dos procedimentos para síntese e caracterização das partículas. No terceiro capítulo são apresentados e discutidos os resultados. O quarto capítulo apresenta as conclusões. O quinto capítulo finaliza o trabalho com as perspectivas para continuidade do projeto. Em anexo, as produções científicas e parecer da comissão de ética para realização dos experimentos *in vivo*.

CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste primeiro capítulo são apresentadas as bases teóricas que direcionaram o desenvolvimento da pesquisa. Inicialmente são descritas as motivações científicas do trabalho, abordando o campo de aplicação do biopolímero produzido. Essa parte divide-se na descrição sobre radiologia intervencionista, embolização, agentes embólicos, quimioembolização e exemplos de aplicações em medicina humana e veterinária. Em seguida, são discutidas as características físico-químicas e o método de síntese das partículas de PVA/PVAc. Posteriormente é apresentada uma breve descrição das técnicas experimentais para caracterização físico-química, seguida pela descrição dos fundamentos para análise de imagens: nesse trabalho são abordados os conceitos de análise fractal e entropia de Shannon. O capítulo é finalizado com a apresentação dos objetivos de pesquisa.

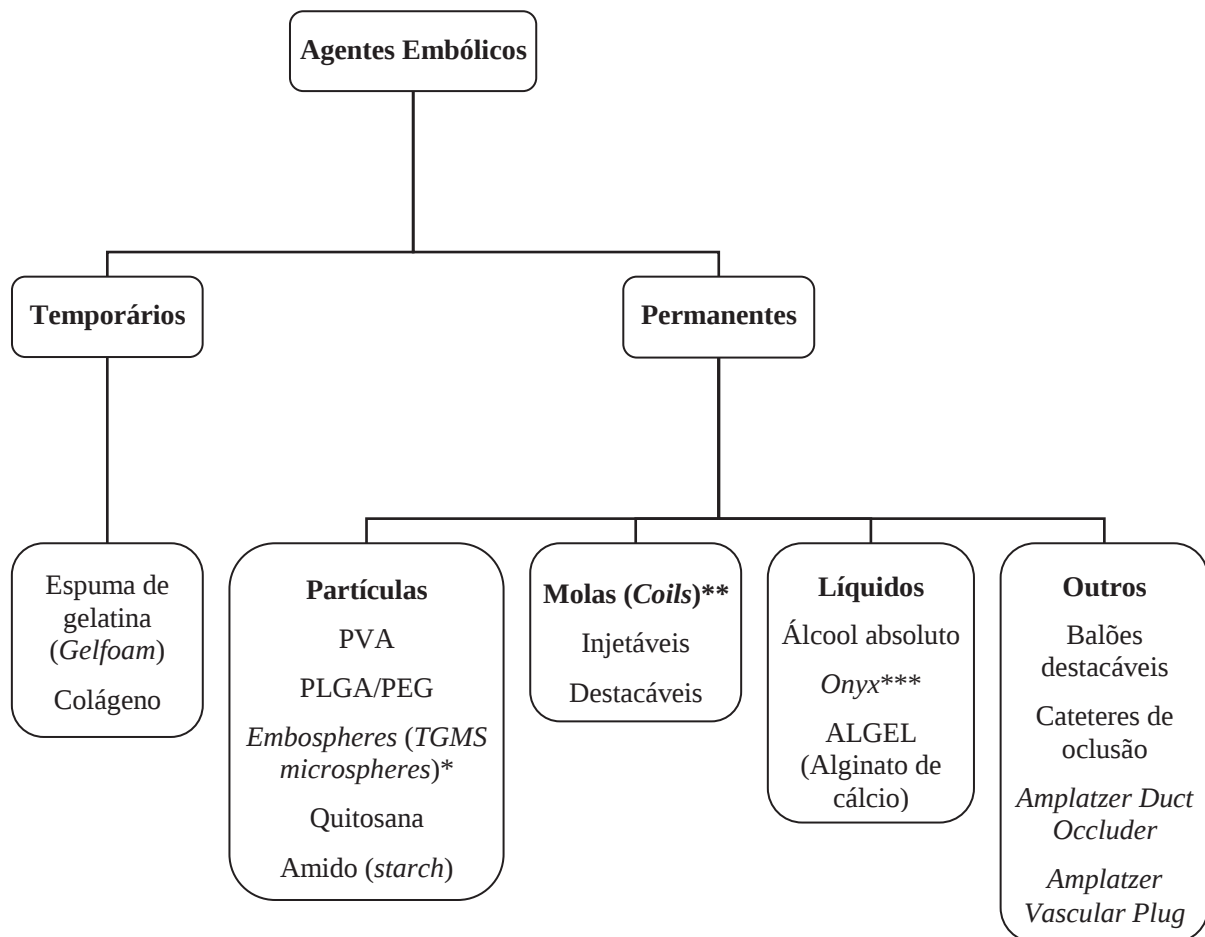
1.1. Radiologia Intervencionista

A radiologia intervencionista consiste em técnicas, procedimentos e materiais direcionados para aplicação médica com o objetivo de evitar e/ou amenizar efeitos colaterais causados por tratamentos e intervenções cirúrgicas convencionais. Nas últimas três décadas têm apresentado avanços consideráveis, sendo destacada por muitos pesquisadores como a cirurgia do século XXI (WEISSE et al., 2008). Sua aplicação e desenvolvimento envolvem o uso de modernos recursos e técnicas para imagem, como a fluoroscopia e ultrassonografia; equipamentos especializados como microscópios cirúrgicos, cateteres e *stents*, além de médicos e técnicos qualificados para a realização de procedimentos que incluem embolização, quimioembolização, exames angiográficos,² tratamentos de aneurismas e malformações arteriovenosas. O desenvolvimento de técnicas minimamente invasivas resulta em significativo aumento na eficiência dos tratamentos. Isso possibilita a otimização de importantes fatores em clínica médica como tempo de permanência hospitalar, utilização de anestésicos, custos e mortalidade pós-operatória (WEISSE et al., 2008; LÓPEZ BENÍTEZ et al., 2009).

² Exame radiográfico usado para diagnóstico de bloqueios e outros problemas em vasos sanguíneos. Utiliza-se um cateter (chamado cateter regular) e agente de contraste com a função de tornar os vasos sanguíneos visíveis aos raios-X (ANDERSON et al., 1994).

1.2. Embolização

A terapia por embolização consiste na oclusão de vasos sanguíneos que irrigam determinada região corporal na tentativa de obstruir mecanicamente a corrente sanguínea que circula por essa região. Após realização de um exame angiográfico, ocorre a introdução um microcateter no sistema vascular até o local onde é necessária a desvascularização. A obstrução dos vasos sanguíneos é feita pela injeção de diferentes materiais chamados agentes embolizantes (ou agentes embólicos) podendo ser permanentes ou temporários (esquema 1). A figura 1 ilustra o procedimento de embolização do mioma uterino com agentes embólicos permanentes (partículas de PVA). Na figura 2 pode ser observada a desvascularização do tumor hepático após embolização das artérias que irrigam a região neoplásica.



* *Embospheres (Trisacryl gelatin microspheres)* são microesferas fabricadas a partir de uma matriz polimérica de acrílico, impregnadas e incorporadas com gelatina (LAURENT et al., 1996; VAIDYA et al., 2008).

** Molas metálicas (ou espirais metálicas) usadas como agentes embólicos geralmente são fabricadas em aço inox, platina ou tungstênio.

*** Trata-se de um copolímero de álcool vinílico etileno (EVOH) preparado usando dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente e adicionando tântalo, em pó, para fornecer radiopacidade (*Onyx, Micro Therapeutics, Irvine, CA*). Ao entrar em contato com o sangue, DMSO permite a polimerização do EVOH, resultando na obstrução de vasos sanguíneos (VAIDYA et al., 2008).

Esquema 1: Exemplos de agentes embólicos permanentes e temporários utilizados em procedimentos de embolização (VAIDYA et al., 2008).

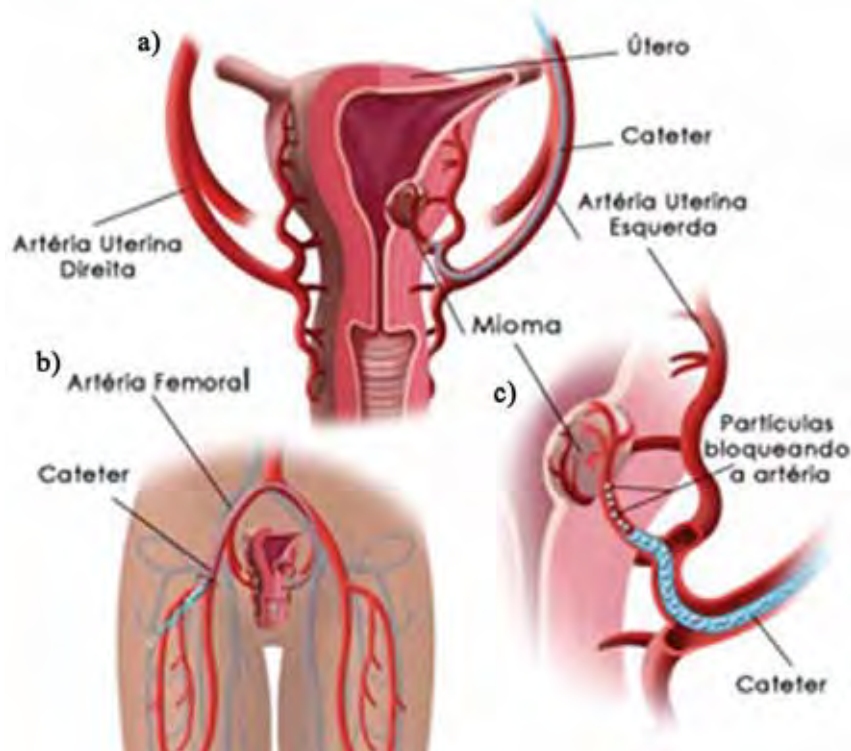


Figura 1: Embolização de mioma uterino com partículas de poli(álcool vinílico) (PVA). (a) e (b) As partículas, compatíveis com o diâmetro das artérias, são conduzidas até o mioma com a utilização de um microcateter. (c) O bloqueio do fluxo sanguíneo resulta na necrose do mioma.

A taxa de sucesso apresentada pela embolização resultou em grande interesse médico e acadêmico por este procedimento e pelos materiais utilizados para sua realização. Isso estimulou as pesquisas para o conhecimento do mecanismo de ação dos agentes embolizantes disponíveis, além do desenvolvimento de novos materiais.

Exemplos de procedimentos de embolização em medicina humana são a utilização de agentes embólicos compostos por PVA para embolização arterial uterina no tratamento do mioma uterino (KISILEVZKY, MARTINS, 2003; BILHIM et al., 2011), embolização das artérias hepáticas com partículas de PVA para tratamento de tumores no pâncreas com metástases no fígado (STROSBERG et al., 2006), embolização das artérias renais para tratamento de angiomiolipoma renal (SCHWARTZ et al., 2007; LENTON et al., 2008) e tratamento de meningiomas (BENDSZUS et al., 2000). A embolização também pode ser aplicada no tratamento de hemorragias: molas metálicas, espumas de gelatina e partículas de PVA foram utilizadas na embolização de sangramentos gastrointestinais (hemorragia do trato intestinal) (BANDI et al., 2001), além do tratamento de aneurismas arteriais e malformações arteriovenosas (LINFANTE, WAKHLOO, 2007; ROEBUCK, BARNACLE, 2008).

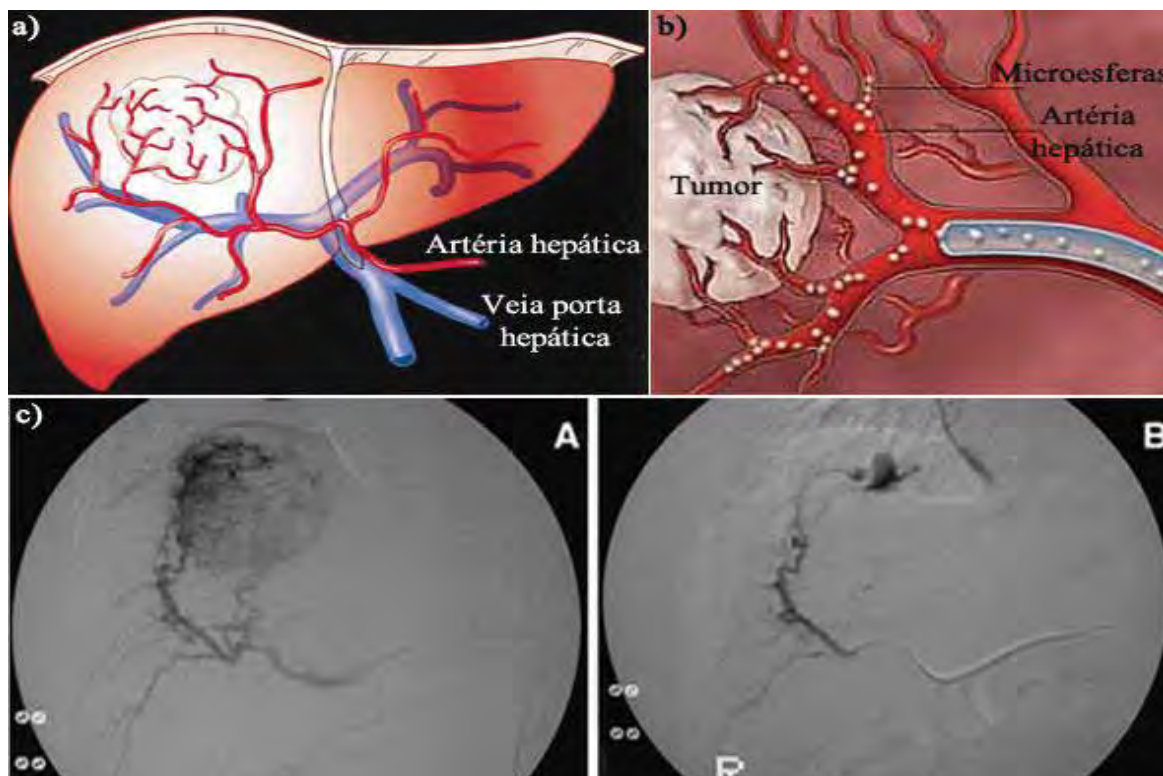


Figura 2: (a) e (b) Para um fígado normal, 25% do suprimento sanguíneo é fornecido pela artéria hepática enquanto 75% provém da veia porta. A região neoplásica é irrigada quase que exclusivamente pela artéria hepática. Assim, a embolização da artéria provoca a hipoxia e necrose do tumor, enquanto o fígado continua sendo irrigado pela veia porta (DODD et al., 2000). (c) Exame angiográfico realizando antes (A) e após (B) embolização de um tumor hepático. Na figura é possível visualizar a desvascularização do tumor após implante dos agentes embólicos (MALAGARI et al., 2008a).

1.2.1. Agentes embólicos

Os agentes embólicos podem ser classificados com relação às suas características físicas, tempo de duração da oclusão que provocam (temporária ou permanente), nível de oclusão (proximal ou distal) e tipo de condutor que requerem (cateter regular ou microcateter). Agentes embólicos utilizados em procedimentos de embolização incluem espumas de gelatina, molas metálicas, balões infláveis, borrachas de silicone e partículas de poli(álcool vinílico) (PVA). A escolha dos agentes embólicos, assim como de seus condutores (cateters e microcateteres) dependerá do procedimento clínico realizado, das características das lesões vasculares passíveis de embolização, dos cuidados e recomendações pós-embolização, dos potenciais riscos e eventuais complicações. A compreensão das características dos materiais utilizados é de extrema importância para o sucesso no tratamento. Dentre tais características estão a compatibilidade entre o tamanho das micropartículas a serem injetadas, o diâmetro dos cateteres e dos vasos sanguíneos, pois a incompatibilidade entre tais dimensões pode

ocasionar problemas durante o procedimento clínico, como a oclusão do cateter antes do local onde é necessária a embolização (WEISSE et al., 2008; VAIDYA et al., 2008).

1.2.1.1. Aplicações de agentes embólicos em medicina veterinária

Dados encontrados na literatura trazem uma descrição detalhada de modelos animais utilizados em embolização na medicina veterinária (MOREIRA, AN, 2003). Em estudos experimentais os animais utilizados incluem ratos, coelhos, suínos, ovinos e cães; com análises sobre efeitos da embolização em tratamentos de hemorragias, malformações arteriovenosas, tumores e neoplasias (principalmente câncer no fígado e rim). Os estudos são realizados baseando-se em exames angiográficos e análises histopatológicas dos tecidos embolizados (MOREIRA, AN, 2003). Exemplos de aplicações dos agentes embólicos em medicina veterinária incluem a utilização de molas metálicas para embolização da persistência do ducto arterioso, que consiste de uma cardiopatia congênita comum em cães com poucos meses de vida (FUJII et al., 2006; MILLER et al., 2009; CAMPBELL et al., 2006). Espirais metálicas também são usadas para embolização arterial hepática no tratamento de desvios porto-sistêmicos intra-hepáticos (SCHNEIDER et al., 2009) e embolização das veias carótidas e maxilares para tratamento de hemorragias em equinos (LÉVEILLÉ et al., 2000).

1.3. Quimioembolização

O domínio da técnica de embolização e o conseqüente avanço no estudo de agentes embólicos possibilitaram o desenvolvimento de uma nova modalidade de terapia minimamente invasiva associada ao tratamento do câncer, chamada quimioembolização. A quimioembolização consiste na injeção dos agentes quimioterápicos utilizados nos tratamentos seguida pela aplicação de partículas embolizantes. Além disso, a modificação superficial das partículas para a funcionalização de fármacos e agentes quimioterápicos permite que a liberação seja realizada ao redor das lesões neoplásicas (HONG et al., 2006; LIAPPI, GESCHWIND, 2007). A vantagem da quimioembolização é a combinação da interrupção do suprimento sanguíneo para a região neoplásica com a inibição da excreção dos agentes quimioterápicos. Isso resulta na hipoxia e maior concentração do medicamento no interior celular, causando a posterior necrose do tecido e redução dos efeitos colaterais devido à restrição da circulação sanguínea na região afetada (WEISSE et al., 2008). Embora os procedimentos de embolização e quimioembolização sejam recomendados, aconselha-se o estudo de fatores como toxicidade dos medicamentos, reações alérgicas, sangramentos locais

e refluxo das partículas³ antes dos tratamentos, além do perfeito conhecimento da anatomia vascular mediante realização de diagnóstico angiográfico.

1.3.1. Partículas utilizadas em quimioembolização

A escolha das partículas utilizadas em quimioembolização depende das características das neoplasias passíveis de tratamento. Neoplasias no fígado, rins e tumores gastrointestinais estão entre os casos onde há maior incidência de tratamentos por quimioembolização. Exemplos incluem o tratamento de tumores gastrointestinais mediante a administração do agente quimioterápico cisplatina e posterior embolização usando esponjas de gelatina ou partículas floculares de PVA como agentes embólicos (KOBAYASHI et al., 2006). Quimioembolização também foi utilizada no tratamento de carcinoma hepático usando esponjas de gelatina como agente embólico e a administração dos agentes quimioterápicos cisplatina, doxorrubicina ou epirrubicina (BRONOWICKI et al., 1996; NITTA et al., 2009). O carcinoma hepático também foi tratado com agentes embólicos compostos por PVA carregados com doxorrubicina (KETTENBACH et al., 2008; MALAGARI et al., 2008a; MALAGARI et al., 2008b; DHANASEKARAN, 2010; MALAGARI et al., 2010; MOSCHOURIS, 2010).

1.3.2. Drug delivery em medicina veterinária

Além do desenvolvimento de pesquisas visando aplicação em medicina humana, o tratamento de doenças em medicina veterinária configura-se como um cenário atrativo para investimentos. Pesquisas em *drug delivery* tiveram seu potencial voltado ao campo de medicina veterinária em meados de 1970. Estatísticas do Instituto de Saúde Animal (*Animal Health Institute*) apontam números expressivos para a população mundial de animais. Entre animais de companhia (cães, gatos e equinos) e direcionados à produção alimentícia (bovinos, ovinos, suínos e aves) são 24 bilhões de aves; 1 bilhão de bovinos e ovinos; 750 milhões de suínos; 500 milhões de cães e 400 milhões de gatos. Investimentos em medicina veterinária garantem fluxo constante de novos produtos, técnicas e tratamentos direcionados à melhoria da saúde e bem-estar animal (ANIMAL HEALTH INSTITUTE, 2011).

³ O refluxo das partículas embolizantes caracteriza-se pela mudança na dinâmica de introdução das partículas, geralmente atribuído ao aumento da velocidade com que tais partículas são introduzidas no cateter, pois a oclusão resulta em aumento da pressão e resistência dos vasos sanguíneos, exigindo cuidado adicional do radiologista intervencionista responsável pelo procedimento (LÓPES-BENÍTEZ et al., 2009).

A figura 3 representa os números correspondentes ao investimento em produtos e pesquisas direcionados à aplicação em medicina veterinária, apenas no mercado norte americano, entre os anos de 2001 e 2009:



Figura 3: Investimentos de empresas americanas em pesquisa e desenvolvimento de produtos e tratamentos direcionados à aplicação em medicina veterinária.⁴

Dados encontrados na literatura descrevem que aplicações de *drug delivery* em medicina veterinária estão associadas à melhora de diversos fatores: cinética de entrega de drogas e medicamentos, controle na qualidade da administração, economia de recursos, redução no manuseio e desconforto dos animais. Produtos veterinários destinados a liberação sustentada incluem antibióticos, antiparasitários, hormônios, agentes antimicrobianos, promotores de crescimento e esteróides controladores de fertilidade (ROTHEN-WEINHOLD et al., 2000; RATHBONE, MARTINEZ, 2002).

1.3.3. Embolização e quimioembolização com PVA em medicina veterinária

Exemplos de estudos experimentais e procedimentos clínicos com agentes embólicos compostos por PVA em medicina veterinária incluem a análise de viabilidade da embolização transarterial para redução do volume de hiperplasia prostática benigna em cães, utilizando partículas floculares de PVA como agente embólico. A embolização apresentou resultados satisfatórios (redução do volume da hiperplasia) sem graves complicações (JEON et al., 2009). Partículas não esféricas de PVA também foram utilizadas no tratamento de epistaxe

⁴ ANIMAL HEALTH INSTITUTE. **Industry Statistics**. Disponível em: <http://www.ahi.org/about-animal-medicines/industry-statistics/>. Acesso em 21/08/2011.

canina. A obstrução do suprimento sanguíneo nasal provocou trombose e diminuição da pressão no leito capilar que causa hemorragia, sem necessidade de intervenção cirúrgica (WEISSE et al., 2004).

Consequências na fertilidade, recanalização dos vasos sanguíneos e exclusão das partículas após embolização uterina em ovelhas foram estudadas utilizando-se diferentes agentes embólicos: partículas floculares de PVA e microesferas de gelatina (*Trisacryl Gelatin Microspheres, TGMS*). Observou-se que partículas não esféricas resultaram em maiores reduções na fertilidade, enquanto que microesferas de gelatina apresentaram melhor tolerância e exerceram menor influência sobre a fertilidade e crescimento dos fetos. Com relação à recanalização dos vasos sanguíneos, partículas floculares de PVA formaram agregados e obstruíram o cateter antes do local desejado, diferentemente do resultado observado para partículas de gelatina com morfologia esférica controlada (LAURENT et al., 2008; LAURENT et al., 2009).

Estudos sobre a distribuição arterial de agentes embólicos após embolização em ovelhas foram realizados usando microesferas de duas composições: PVA e gelatina (*TGMS*), ambas com diâmetro entre 500 μ m e 700 μ m. As características apresentadas foram avaliadas após embolização da artéria renal (LAURENT et al., 2006) e artéria uterina (LAURENT et al., 2010). Em ambos os estudos, as partículas compostas por PVA bloquearam os vasos sanguíneos em pontos mais distantes (embolização distal) e apresentaram maior deformação morfológica, quando comparadas com as partículas à base de gelatina (LAURENT et al., 2010).

Agentes embólicos compostos por PVA e carregados com o quimioterápico doxorrubicina foram utilizados em estudos para tratamento de câncer hepático (embolização da artéria hepática) em suínos (LEWIS et al., 2006) e coelhos (LEE et al., 2010). Em ambos os casos, as partículas produziram embolização das artérias hepáticas sem maiores complicações. Os animais apresentaram tolerância ao fármaco sem comprometimento dos tecidos adjacentes ao fígado. Porém os modelos apresentam algumas limitações: a ausência de tumor hepático (LEWIS et al., 2006) impossibilita o conhecimento das características hipervasculares apresentadas pelo tumor após embolização e determinação precisa das reações inflamatórias após interação das partículas com as células neoplásicas. Porém, o estudo demonstrou que a doxorrubicina pode ser liberada pelos agentes embólicos e provocar destruição do tecido (LEWIS et al., 2006). Em coelhos (LEE et al., 2010) foram implantadas células neoplásicas para induzir à formação do câncer hepático. A concentração de

doxorubicina liberada apresentou variações com o tempo de permanência nos animais, sendo que a morte das células neoplásicas foi observada após 7 dias de realização do procedimento, atingindo 90% de necrose do tumor (LEE et al., 2010).

1.4. Partículas de poli(álcool vinílico) (PVA)

Poli(álcool vinílico) (PVA) é um polímero extremamente versátil utilizado em fabricação de fibras, na indústria têxtil e processamento de papel como adesivo, emulsificante e dispersante (YU et al., 2003). Em procedimentos minimamente invasivos, são os materiais biopoliméricos mais usados devido a importantes propriedades que apresentam: elevada compressibilidade, elasticidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (PEIXOTO et al., 2006). Com relação à morfologia, os agentes embólicos compostos por PVA são divididos em duas classes: partículas não esféricas (espumas floculares ou esponjas) e partículas esféricas. Características indesejáveis associadas a partículas floculares incluem imprecisão no tamanho e morfologia, podendo levá-las à aglutinação, oclusão incompleta e obstrução de cateteres em locais que antecedem o alvo desejado (LAURENT, 2007). Esses problemas podem ser minimizados com a utilização de partículas esféricas de tamanhos específicos. A figura 4 ilustra um procedimento de embolização renal. Partículas com tamanho controlado e morfologia específica melhoram as condições de embolização, pois o radiologista intervencionista pode adaptar o diâmetro dos cateteres ao tamanho das partículas a serem introduzidas (PELAGE et al., 2002; RASULI et al., 2008).

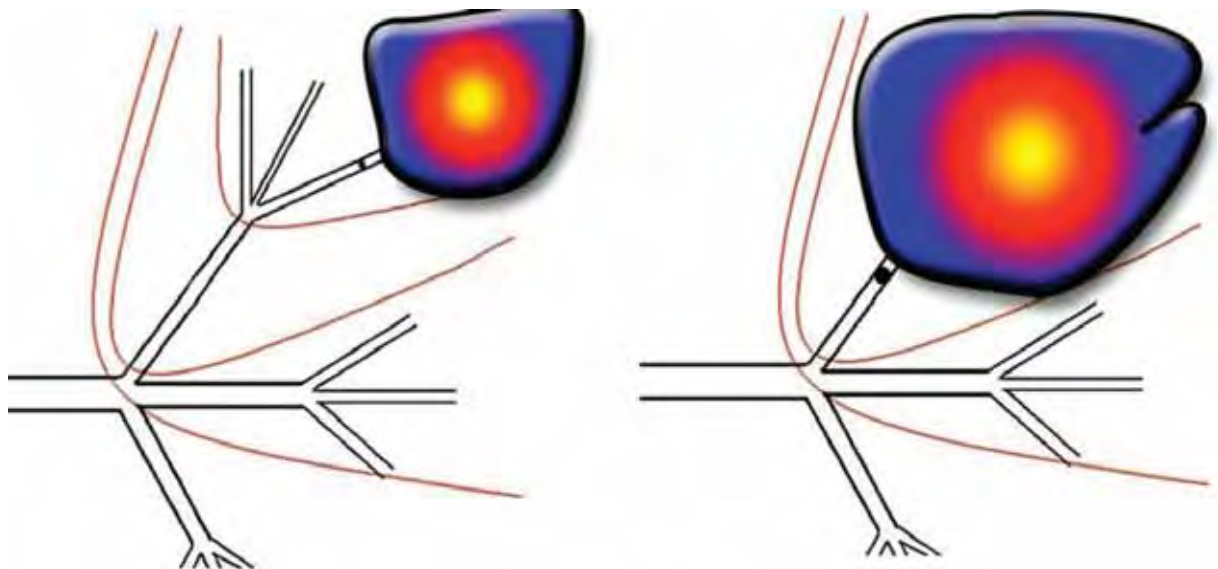


Figura 4: O diagrama representa um procedimento de embolização de artérias renais. (a) Partículas com pequeno diâmetro provocam oclusão de um vaso sanguíneo próximo ao órgão onde é necessária a embolização, enquanto que (b) partículas com maior diâmetro ocluem artérias distantes do local desejado, induzindo à isquemia de uma grande região (LÓPES-BENÍTEZ et al., 2009).

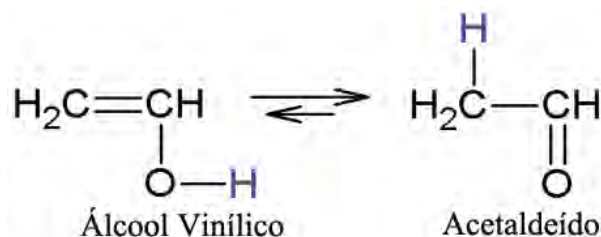
1.4.1. Polimerização em suspensão de PVA/PVAc

Os métodos comuns empregados para obtenção do PVA são a polimerização em solução, emulsão e suspensão. A polimerização em solução caracteriza-se pela utilização de um solvente, além do monômero e do iniciador, com a função de solubilizá-los para a formação de um sistema homogêneo. Sua grande vantagem é a homogeneização da temperatura reacional devido à fácil agitação do sistema, evitando o superaquecimento. A polimerização em emulsão tem como característica a solubilidade do iniciador em água, enquanto que o monômero tem solubilidade parcial, além de necessidade de vários aditivos: emulsificantes (formação de micelas), colóides protetores, reguladores de tensão superficial, reguladores de polimerização (modificadores) e ativadores (agentes de redução). Os polímeros obtidos por esta técnica possuem altos pesos moleculares, dificilmente purificados devido às características dos aditivos utilizados (MACHADO et al., 2007).

Para a produção de polímeros com morfologia específica e tamanhos controlados, a polimerização em suspensão é o método mais empregado. Assim como a polimerização em emulsão, trata-se de uma polimerização heterogênea. Há necessidade de um meio dispersante, geralmente água, sendo que iniciador e monômero são insolúveis nesse meio (iniciador é solúvel em uma fase orgânica). A dispersão desses reagentes ocorre mediante combinação de forte agitação, controle de temperatura e uso de estabilizantes (agentes de suspensão). Dentre as características desse processo de polimerização está a formação de partículas com morfologia esférica, sendo que a agitação do sistema interfere diretamente no tamanho das partículas formadas (MACHADO et al., 2007). As vantagens desse processo incluem fácil controle de temperatura e separação do produto, elevada taxa de polimerização, baixos níveis de impureza do produto final e formação de partículas com diâmetros entre 30µm e 1200µm (LEE et al. 2005; MACHADO et al., 2007). Autores têm demonstrado que partículas de PVA com morfologia esférica e distribuição regular de tamanhos podem ser obtidas usando esse método (PINTO et al., 2006; LEE, LYOO, 2008).

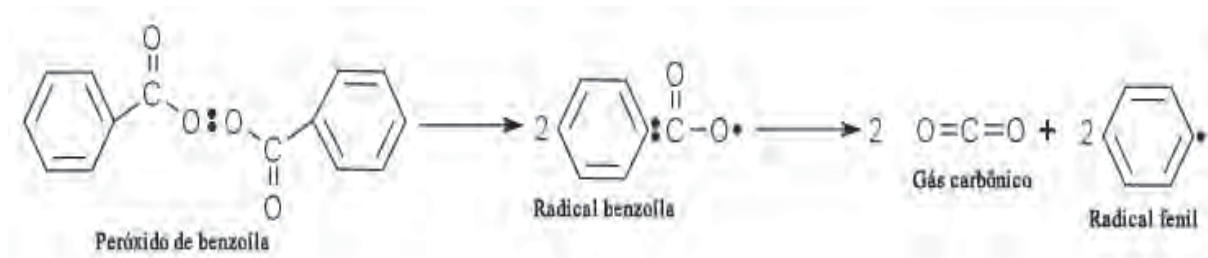
O poli(álcool vinílico) não pode ser polimerizado diretamente devido à instabilidade de seu monômero e ao tautomerismo ceto-enólico. Um composto com uma ligação C=C e um grupo OH ligado ao átomo de carbono denomina-se enol (o álcool vinílico é um exemplo). Na tentativa do preparo de uma estrutura enólica, há maior probabilidade de obtenção de um composto com grupo carbonila (C=O), denominado ceto-composto (o acetaldeído é um exemplo) (MORRISON, BOYD, 1996). Embora ocorra equilíbrio entre essas duas estruturas, geralmente há maior favorecimento para formação da ceto-estrutura. Assim, as tentativas de

preparo do PVA a partir do álcool vinílico resultam rapidamente na formação de uma mistura constituída principalmente por acetaldeído, como exemplifica o esquema 2:

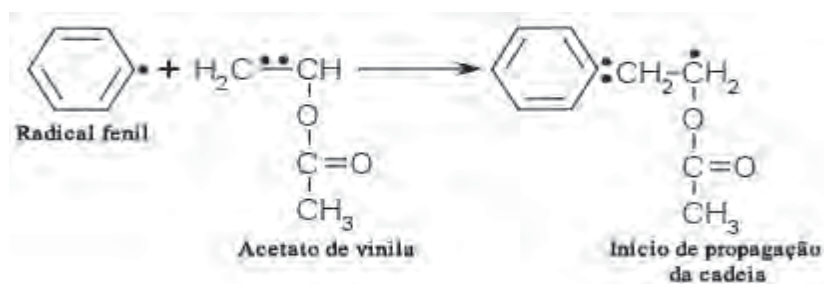


Esquema 2: Representação do tautomerismo ceto-enólico: equilíbrio da reação desloca-se no sentido de formação de um ceto-composto, cuja estrutura apresenta um hidrogênio ligado ao átomo de carbono, diferentemente de uma estrutura enólica (MORRISON, BOYD, 1996).

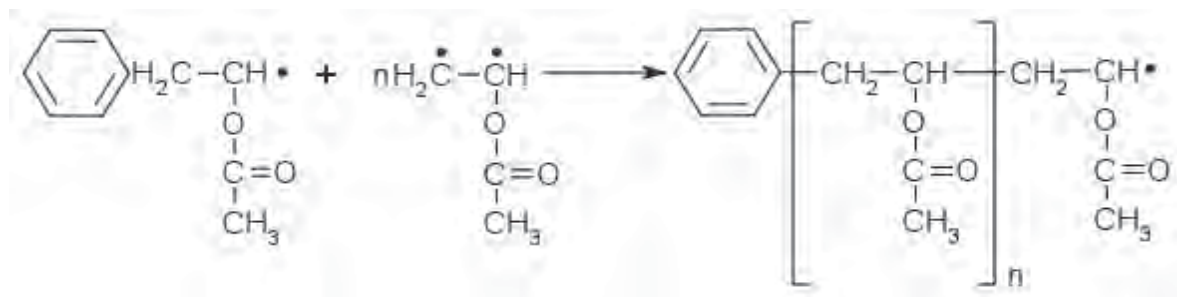
Dessa forma, a síntese de PVA ocorre pela saponificação de poli(ésteres de vinila) tais como poli(acetato de vinila) (PVAc) e poli(pivalato de vinila) (PVPI), sendo PVAc o precursor mais comum do PVA (LEE et al., 2005). A reação de conversão do PVAc em PVA é uma importante reação de hidrólise polimérica, podendo ser completa ou parcial. A formação do PVA pelo método de polimerização em suspensão ocorre em duas etapas: polimerização e saponificação. No primeiro processo há formação do PVAc ($[\text{CH}_2\text{CH}]_n\text{CH}_3\text{COO}$) a partir do seu monômero, acetato de vinila, $\text{CH}_3\text{COOCH}=\text{CH}_2$. Para geração de radicais livres e iniciação da reação polimérica usa-se o peróxido de benzoíla ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_4$). O álcool polivinílico ($[\text{CH}_2\text{CH}]_n\text{OH}$) é usado como agente de suspensão (composto insolúvel em meio aquoso usado para prevenir a aglutinação de gotas de água formadas na agitação com o monômero). A escolha do solvente para o monômero é feita considerando-se a necessidade de que seja insolúvel em água (meio reacional). Vários compostos orgânicos podem ser usados, porém o terc-butanol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$) é insolúvel em água e miscível no acetato de vinila (monômero) e no peróxido de benzoíla (iniciador), sendo perfeitamente indicado. Os esquemas 3 a 6 descrevem os mecanismos de reação para as subdivisões típicas de formação do PVAc:



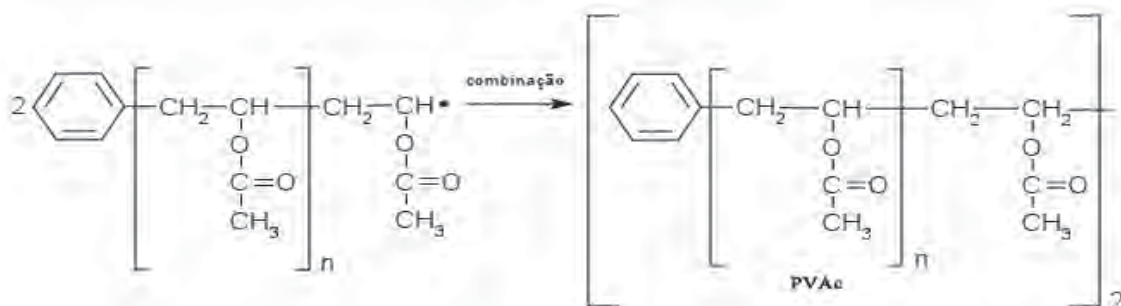
Esquema 3: A reação se inicia com a formação de radicais livres a partir do peróxido de benzoíla. Esse processo ocorre quando a ligação entre os oxigênios é rompida, motivada pelo ganho de energia cinética das moléculas devido ao aumento na temperatura reacional do sistema.



Esquema 4: Na segunda etapa da polimerização, cada radical livre interage com o monômero (acetato de vinila) iniciando a propagação em cadeia para formação do PVAc.

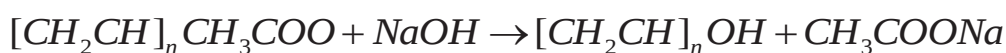


Esquema 5: Após os radicais livres se ligarem aos monômeros, a polimerização entra no estágio de propagação com a ligação sequencial das unidades monoméricas.

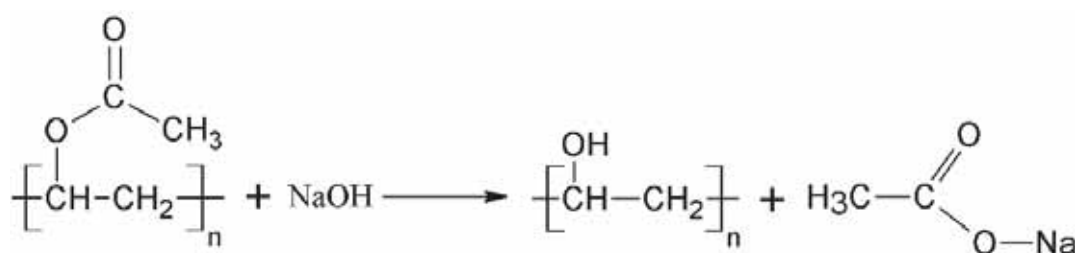


Esquema 6: A polimerização é finalizada com a combinação e formação do PVAc.

Na segunda etapa, PVA ([CH₂CH]_nOH) é obtido após a saponificação do PVAc, condicionada pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) à solução. Nessa etapa há troca do grupo acetato (CH₃COO⁻) presente no PVAc pelo grupo hidroxila (OH⁻) existente na solução alcalina. O processo final é descrito pelos esquemas 7 e 8:



Esquema 7: Reação de formação do PVA mediante adição de solução alcalina ao PVAc. O segundo produto da reação é o acetato de sódio (CH₃COONa).



Esquema 8: Fórmulas estruturais dos reagentes e produtos envolvidos na formação do PVA.

1.5. Caracterização físico-química

Nas próximas seções são apresentados os fundamentos teóricos das técnicas usadas para caracterização das partículas de PVA. Priorizamos neste trabalho a análise das propriedades estruturais mediante utilização da técnica de difração de raios-X e características morfológicas obtidas a partir da técnica de microscopia eletrônica de varredura.

1.5.1. Difração de raios-X

O conhecimento da estrutura molecular dos materiais possui extrema importância para suas aplicações. A difração de raios-X é uma importante ferramenta para investigação estrutural de materiais, assim como permite a realização de análises químicas, medidas de tamanhos de partículas, análise quantitativa de fases e microdeformação, entre outras aplicações (CULLITY, 1978).

Raios-X são ondas eletromagnéticas com comprimentos de onda da ordem de 10^{-10} m, descobertos em 1895 pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923). A figura 5 mostra os componentes de um sistema de produção de raios-X (tubo de raios catódicos). O aquecimento do filamento resulta na emissão de elétrons que são acelerados pela diferença de potencial (fonte de alta tensão) entre o cátodo e o anodo. Ao serem acelerados, os elétrons ganham energia e são direcionados contra um alvo. O resultado das colisões e da frenagem resultante da brusca desaceleração é a energia transferida dos elétrons para os átomos do elemento alvo, gerando a emissão de um espectro contínuo de radiação eletromagnética (feixes de raios-X). Os feixes de raios-X são direcionados para a fenda colimadora antes de incidirem na amostra (OKUNO et. al., 1982).

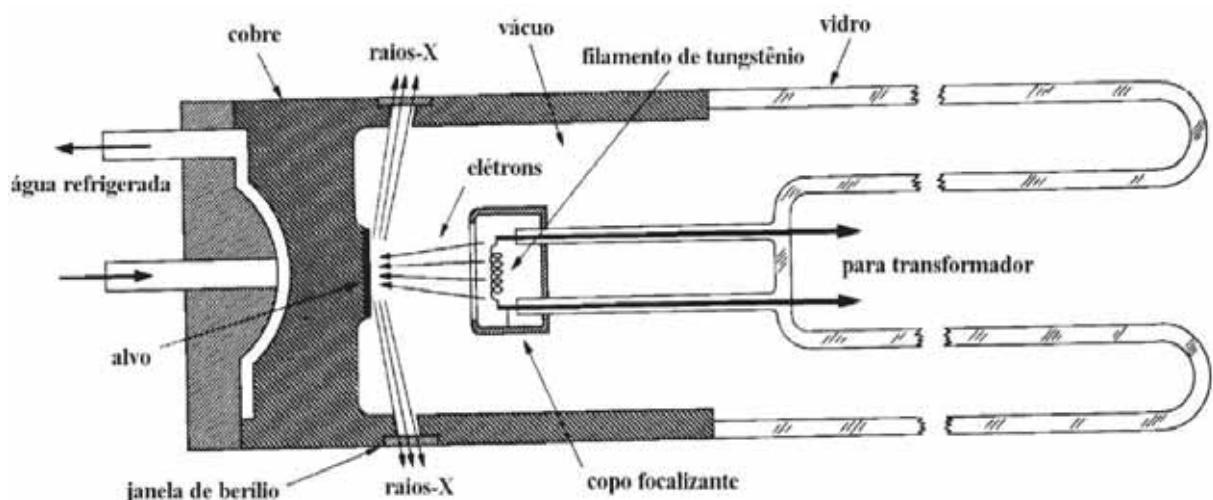


Figura 5: Esquema do tubo de raios catódicos e ilustração da produção de radiação (CULLITY, 1978).

A técnica de difração de raios-X teve início com o físico alemão Max Theodor Felix von Laue (1879-1960) e seus trabalhos com cristais, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de Física em 1914. Von Laue havia sugerido que os raios-X tivessem as mesmas propriedades de ondas como a luz, mas com comprimentos de onda muito curtos. Outra hipótese era que os átomos formassem um arranjo regular e simétrico nos cristais, posteriormente definido como a cela unitária de um material, ilustrada para o cloreto de sódio (NaCl) na figura 6. Se ambas essas idéias fossem verdadeiras, o cristal poderia difratar feixes de raios-X (CULLITY, 1978).

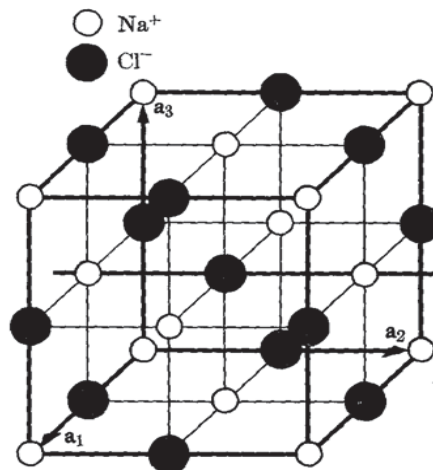


Figura 6: Exemplo de cela unitária para o cloreto de sódio (CULLITY, 1978).

Os raios-X são difratados pelo material porque os elétrons de seus átomos absorvem a radiação e servem como fontes secundárias, reemitindo-a em todas as direções. As ondas eletromagnéticas reemitidas reforçam-se mutuamente em algumas direções e se cancelam em outras, dependendo da forma como os átomos estão arranjados no material (figura 7a).

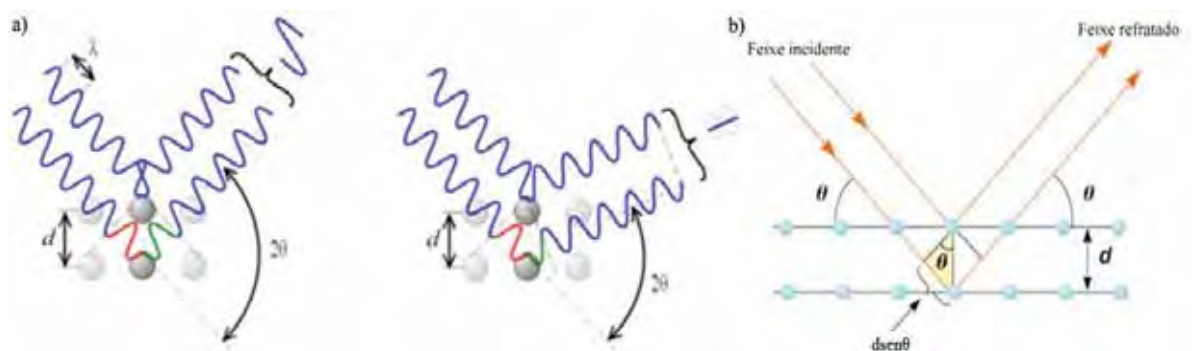


Figura 7: (a) Ilustração do fenômeno de difração. Os raios-X são difratados após interação com os elétrons do material, resultando na emissão de ondas eletromagnéticas em fase e defasadas, (b) Esquema para dedução da Lei de Bragg.

O fenômeno descoberto por von Laue interessou dois físicos ingleses: William Henry Bragg (1862-1942) e seu filho, William Lawrence Bragg (1890-1971). Em 1913, mostraram que a difração de raios-X ocorre como se feixes de radiação fossem refletidos pelas camadas atômicas de um cristal, assim como a luz é refletida por um espelho plano, trabalho que lhes

rendeu o prêmio Nobel de Física em 1915. Demonstraram que existe uma relação simples entre as distâncias interplanares, o comprimento de onda da radiação e o ângulo de difração, conhecida como equação ou lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (1)$$

onde n é um número inteiro positivo (geralmente 1), λ é o comprimento de onda dos raios-X, d é a distância entre camadas adjacentes de átomos e θ é o ângulo entre o raio incidente e os planos refletidos (figura 7b). A equação de Bragg diz que, para qualquer distância d , a difração pode ocorrer em diversos ângulos correspondendo a diferentes valores de n . Para realização das medidas, movimenta-se a amostra em ângulo θ , enquanto o detector gira de um ângulo 2θ , como descreve a figura 8b:

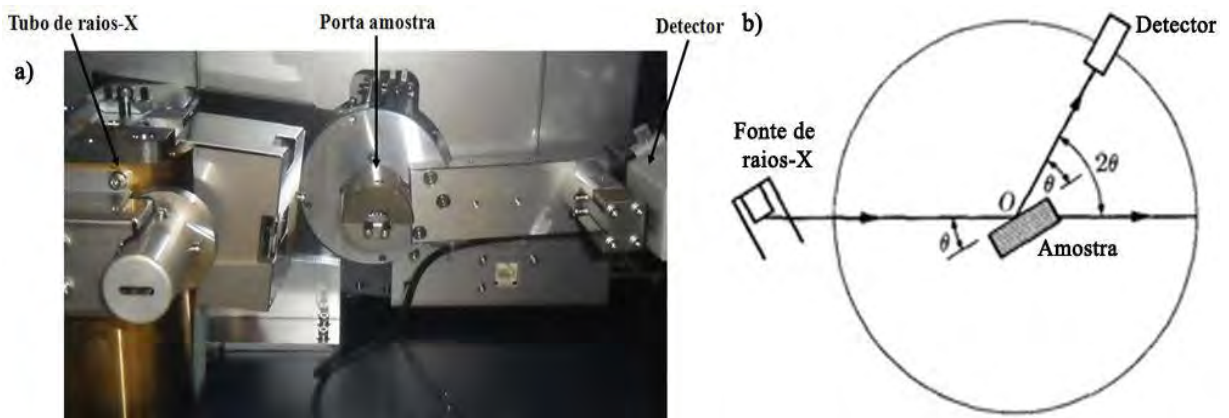


Figura 8: (a) Detalhe do sistema de obtenção de dados: tubo de raios catódicos (fonte de raios-X), porta amostra e detector de radiação, (b) Condições experimentais: a amostra gira de um ângulo θ enquanto o detector é girado em ângulo 2θ (CULLITY, 1978).

Quando a condição de Bragg é satisfeita (ondas difratadas em fase) há o registro de um sinal no detector. O difratograma de raios-X (expressa a intensidade de radiação detectada em função do ângulo 2θ) é reflexo da forma como os átomos estão organizados (figura 9). Quanto mais estreitos forem os picos de difração (chamados “picos de difração de Bragg”), mais organizado estará o material (estrutura cristalina). Da mesma forma, quanto mais largos forem os picos de difração, menos organizados estarão os átomos do material, caracterizando uma estrutura amorfa. As intensidades de radiação detectadas estão relacionadas com a posição dos átomos na cela unitária, enquanto que os valores para os ângulos 2θ são característicos de cada material, pois possuem diferentes arranjos atômicos.

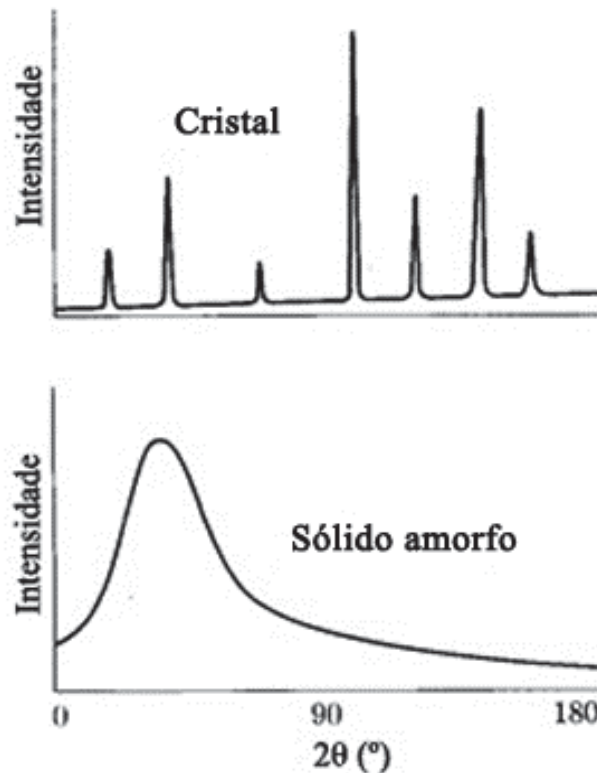


Figura 9: Diferentes padrões de difração de raios-X. Para um material cristalino, seus átomos estão ordenados e há periodicidade de sua cela unitária. Assim, seu padrão de difração apresentará picos estreitos e intensos. Diferentemente, nos sólidos amorfos suas estruturas moleculares estão menos organizadas, resultando em picos de difração alargados (CULLITY, 1978).

1.7.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Diversas propriedades dos materiais estão associadas com suas características morfológicas, superficiais e suas dimensões. Em procedimentos de embolização, a morfologia dos agentes embólicos possui grande importância para suas aplicações. Partículas esféricas de PVA com tamanhos controlados permitem a adaptação do diâmetro dos cateteres e vasos sanguíneos ao tamanho das partículas introduzidas. Isso possibilita a redução do risco de agregação das partículas e oclusão dos cateteres antes do local desejado. Uma das técnicas utilizadas para análise morfológica é a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A técnica permite obter imagens superficiais de alta ampliação (até 300 000 vezes), identificar elementos presentes no material e determinar localizações precisas de suas estruturas.

A figura 10 mostra os elementos que constituem um microscópio eletrônico de varredura. A obtenção das imagens é realizada mediante a emissão de feixes de elétrons por um filamento de tungstênio devido à aplicação de alta tensão elétrica, sendo que a fonte emissora necessita de alto vácuo (etapa 1). A correção do percurso dos feixes de elétrons é realizada por lentes condensadoras que os alinham em direção à abertura da lente objetiva

(etapa 2). Ainda neste trecho, existem dois conjuntos de bobinas eletromagnéticas responsáveis pela varredura do feixe sobre a amostra (etapa 3). A lente objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons, chamados de elétrons primários, antes de atingirem a amostra analisada. Quando os elétrons primários incidem na amostra, há interação com os átomos do material, resultando na emissão de elétrons secundários (sinal de interesse, pois são responsáveis pela resolução da imagem e idéia de profundidade da amostra), elétrons retroespalhados e radiação (raios-X), entre outras partículas (etapa 4). Dependendo da natureza da amostra, a profundidade da região de incidência dos elétrons pode chegar a 6µm, conhecida por volume de interação.

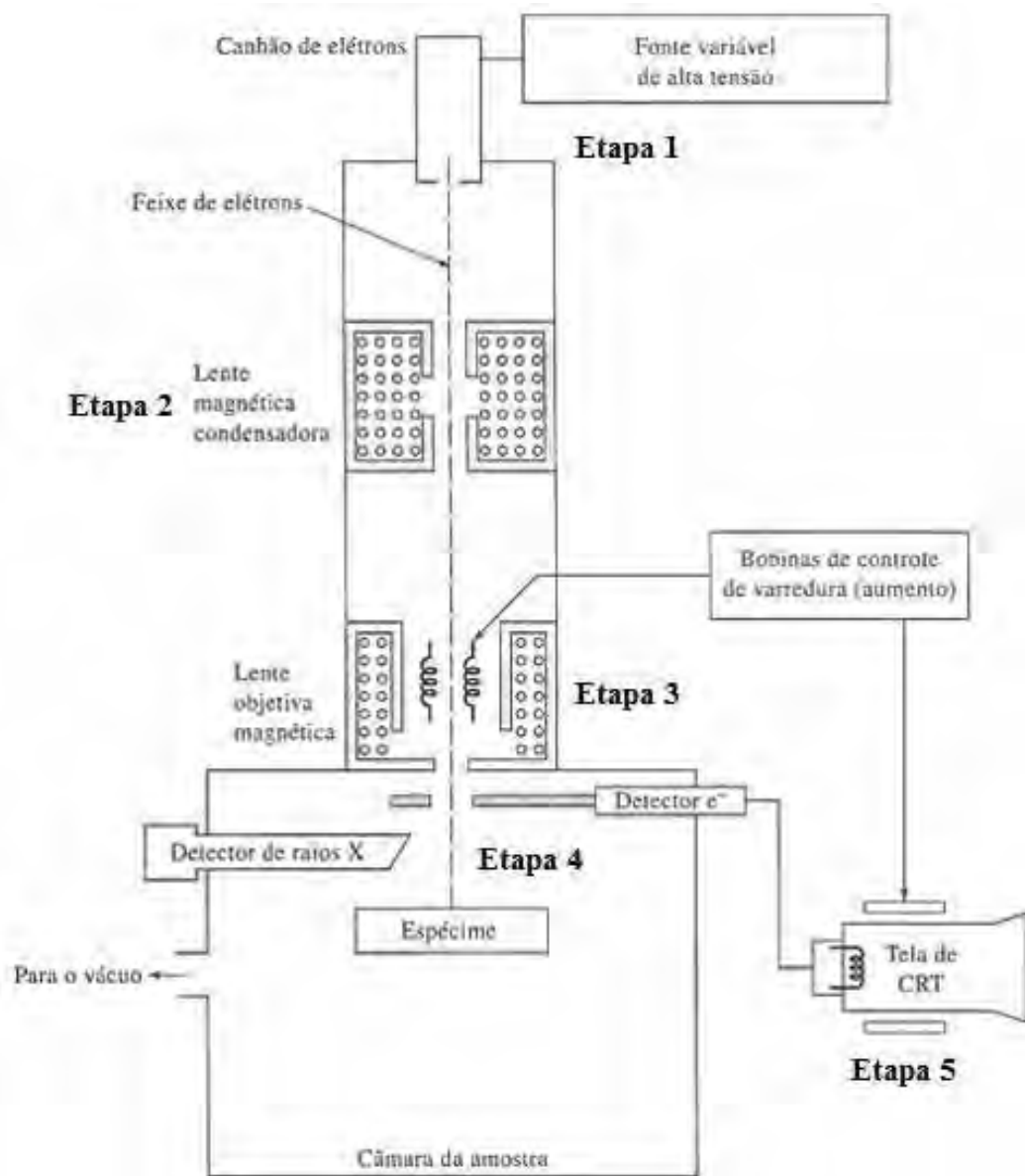


Figura 10: Detalhe dos elementos que constituem o microscópio eletrônico de varredura. Basicamente, é composto de uma coluna óptico-eletrônica (canhão de elétrons e sistema de redução do diâmetro do feixe eletrônico), unidade de varredura, câmara da amostra, sistemas de detectores e visualização da imagem (SKOOG et al., 2002).

Para obtenção da imagem, a informação (sinal elétrico) consiste na correspondência entre os pontos de varredura no plano da amostra e as intensidades de elétrons secundários ou retroespalhados, perceptíveis aos detectores localizados na câmara de vácuo. Quando todo o plano da amostra é analisado, a tela do *display* (sincronizada com as bobinas de varredura e feixes de elétrons) é analisada simultaneamente utilizando as intensidades dos detectores para cada ponto (etapa 5). As imagens obtidas possuem caráter virtual, resultado da transcodificação de energia dos elétrons secundários ou retroespalhados detectados (SKOOG et al., 2002). Além disso, a análise da radiação emitida pelos átomos após excitação de seus elétrons permite a identificação dos elementos que compõem o material. Para isso, utiliza-se um detector que capta o espectro de radiação emitida, característica de cada elemento químico (técnica é chamada de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X).

1.8. Análise fractal e entropia de Shannon

Nas próximas seções são apresentados os fundamentos da análise fractal e entropia de Shannon, que são métodos para análise de imagens com aplicações em diversas áreas do conhecimento. São exemplificados trabalhos realizados em medicina e aplicações dos conceitos no estudo de sistemas biológicos.

1.8.1. Análise fractal

A análise fractal fundamenta-se nos conceitos de geometria fractal, teoria desenvolvida na década de 1970 pelo matemático polonês Benoit Mandelbrot (1924-2010) com base nos trabalhos de Poincaré, Cantor e Sierpinski, entre outros (CROSS, 1997).⁵ Os esforços de Mandelbrot resultaram no livro intitulado “A geometria fractal da Natureza”.⁶ Sua teoria surgiu como alternativa para solução de impossibilidades apresentadas pela geometria euclidiana clássica na descrição de formas complexas, irregulares e descontínuas observadas na natureza. A aparência não uniforme de uma nuvem, a irregularidade no formato de uma couve-flor ou a complexidade dos contornos de uma estrela do mar são alguns exemplos. As idéias propostas por Mendelbrot permitiram a abordagem quantitativa e precisa desses contornos, considerados imensuráveis segundo os conceitos formulados pela geometria euclidiana (HEYMANS et al., 2000).

⁵ Jules Henri Poincaré (1854-1912); George Ferdinand Ludwig Philipp Cantor (1845-1918) e Waclaw Sierpinski (1882-1969).

⁶ MANDELBROT, B. B. **The Fractal Geometry of Nature**. New York: W. H. Freeman, 1982.

A geometria fractal fundamenta-se em dois pilares: auto-similaridade e dimensionalidade. O conceito de auto-similaridade é baseado na propriedade que objetos fractais possuem de repetirem detalhes estruturais mesmo após mudanças na escala de observação. Assim, a fractalidade pode ser exemplificada pela semelhança apresentada por objetos e contornos geométricos quando estes são ampliados em diferentes escalas de magnitude: uma estrutura observada sob diferentes aumentos apresenta o mesmo padrão geométrico (BAISH, JAIN, 2000). A curva de Koch, idealizada pelo matemático sueco Niels Helge von Koch (1870-1924) consiste de uma imagem fractal ideal e ilustra o conceito de auto-similaridade. A imagem é obtida dividindo-se um segmento de reta em três partes iguais, sendo que um desses segmentos é substituído por outros dois segmentos idênticos que formam um ângulo de 60° entre si. Esse processo se repete até a formação da imagem (figura 11a). Em seu trabalho, Mandelbrot destacou que objetos auto-similares são muito comuns na natureza (diferentemente dos fractais ideais obtidos teoricamente, objetos/contornos observados na natureza são chamados de “fractais naturais”) sendo que a caracterização morfológica precisa desses objetos possui grande importância em áreas como a microscopia e histopatologia (LANDINI, 2011).

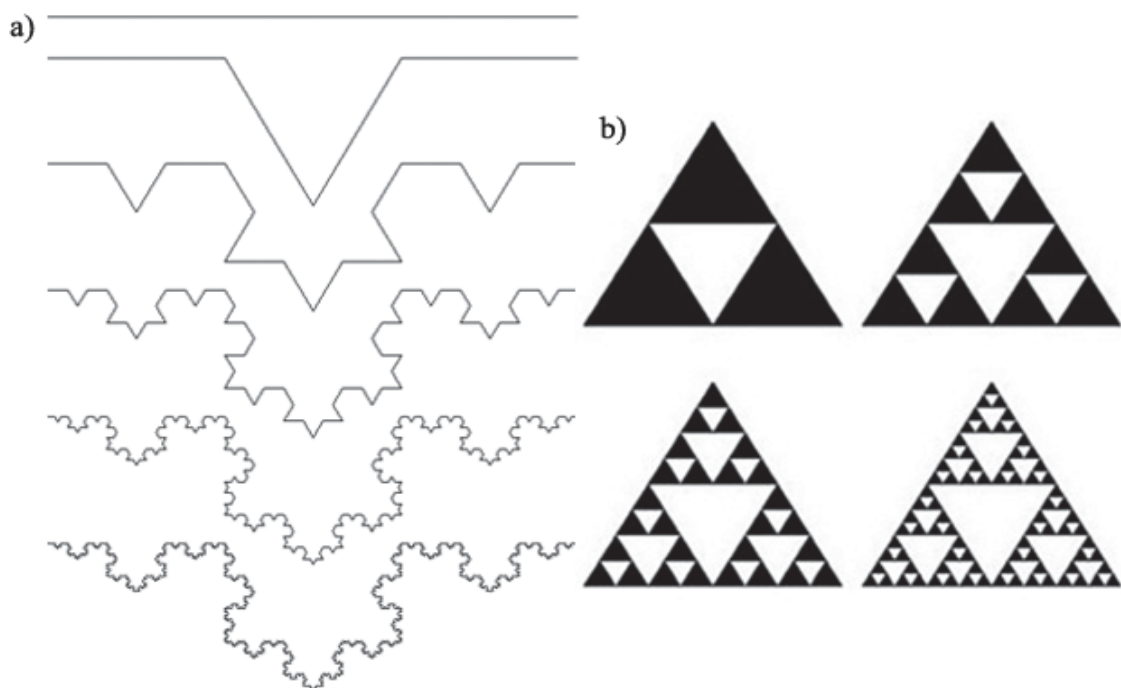


Figura 11: Ilustração do conceito de auto-similaridade. As imagens fractais descritas são obtidas pela repetição de elementos que apresentam a mesma estrutura. **(a)** Curva de Koch (HEYMANS et al., 2000); **(b)** Triângulo de Sierpinski. Descrito pelo matemático polonês Waclaw Sierpinski (1882-1969) consiste na formação de uma figura composta pela repetição de vários triângulos equiláteros.

Com relação à dimensionalidade, a geometria fractal descreve uma abordagem complementar aos conceitos estabelecidos pela geometria euclidiana, que apresenta definições

precisas: dimensão 0 refere-se à um ponto geométrico, segmento de reta (linha) apresenta dimensão 1, um plano (superfície) ou espaço (volume) possuem dimensões 2 e 3, respectivamente. Diferentemente, a geometria fractal permite que sejam definidas dimensões fractais que variam conforme a irregularidade da imagem/objeto analisado. Enquanto uma curva ou segmento de reta tortuoso apresentam dimensão 1, tais formas possuem dimensões fractais entre 1 e 2. Isso é explicado devido à tais contornos geométricos apresentarem maior tendência de cobrir uma superfície (dimensão 2) quando comparado à um segmento de reta (dimensão 1). A dimensão fractal possibilita que sejam quantificadas características abstratas como irregularidade e complexidade, podendo ser considerada uma propriedade do sistema analisado (HEYMANS et al., 2000; DINICOLA et al., 2011). A figura 12 exemplifica a dimensionalidade de segmentos de reta mediante análise pela geometria euclidiana (dimensão topológica) e fractal (dimensão fractal).

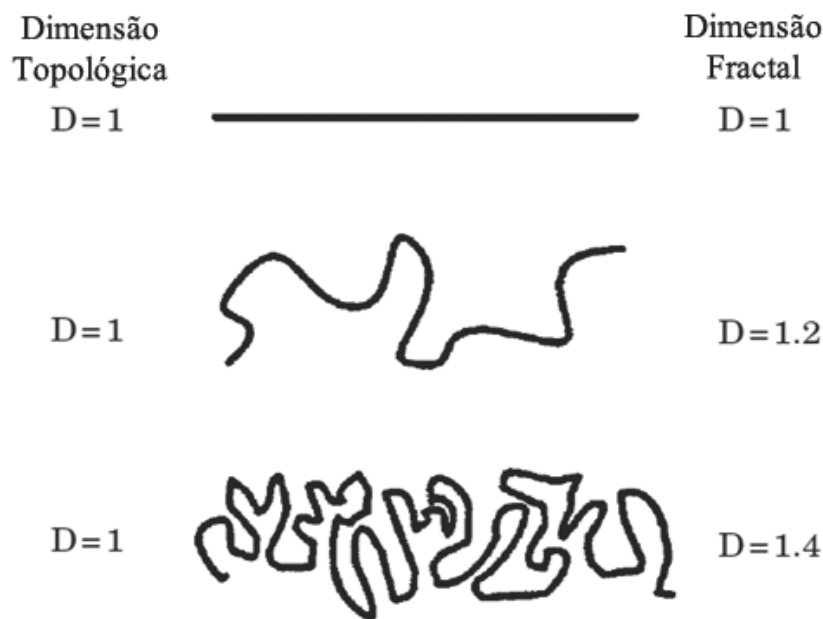


Figura 12: Dimensão fractal para diferentes tipos de curvas, indicando a diferença entre os valores obtidos para a análise topológica (geometria euclidiana) e fractal (HEYMANS et al., 2000).

1.8.1.1. Cálculo de dimensão fractal pelo método de box-counting

O método box-counting consiste de um procedimento para cálculo da dimensão fractal de estruturas geométricas e destaca-se devido à sua simplicidade. Seu princípio baseia-se nas relações de dimensionalidade descritas pela geometria fractal. Consiste no contorno de objetos (figura 13) ou imagens (figura 14) com cubos/quadrados de comprimentos L :

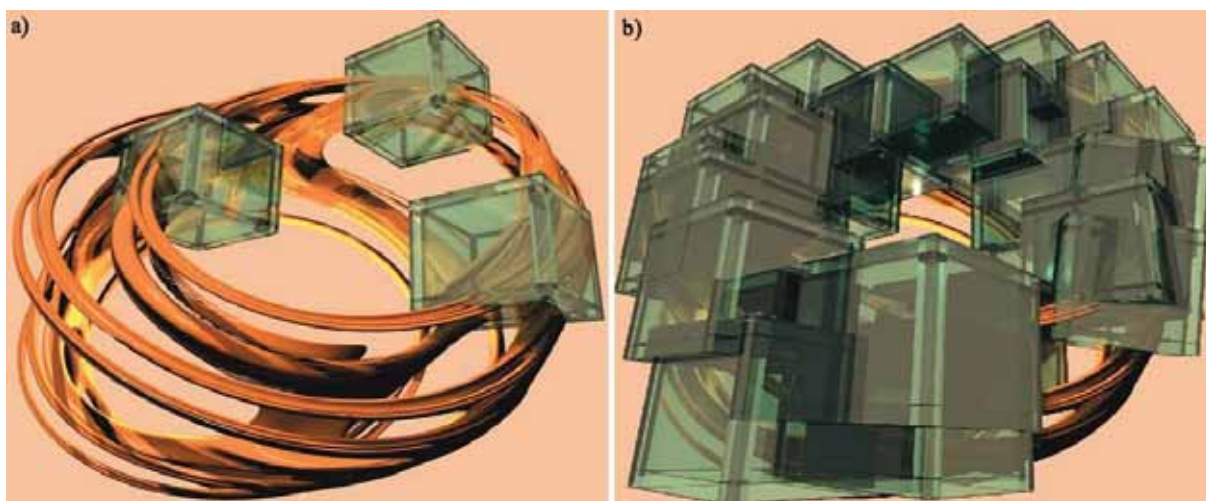


Figura 13: Exemplo do procedimento realizado pelo método box-counting. **(a)** Trata-se de um objeto preenchido com cubos de lado L . **(b)** A dimensão fractal é obtida mediante relação entre a dimensão L e o número de cubos $N(L)$ necessários para cobrir o objeto (KEDZIA et al., 2002).

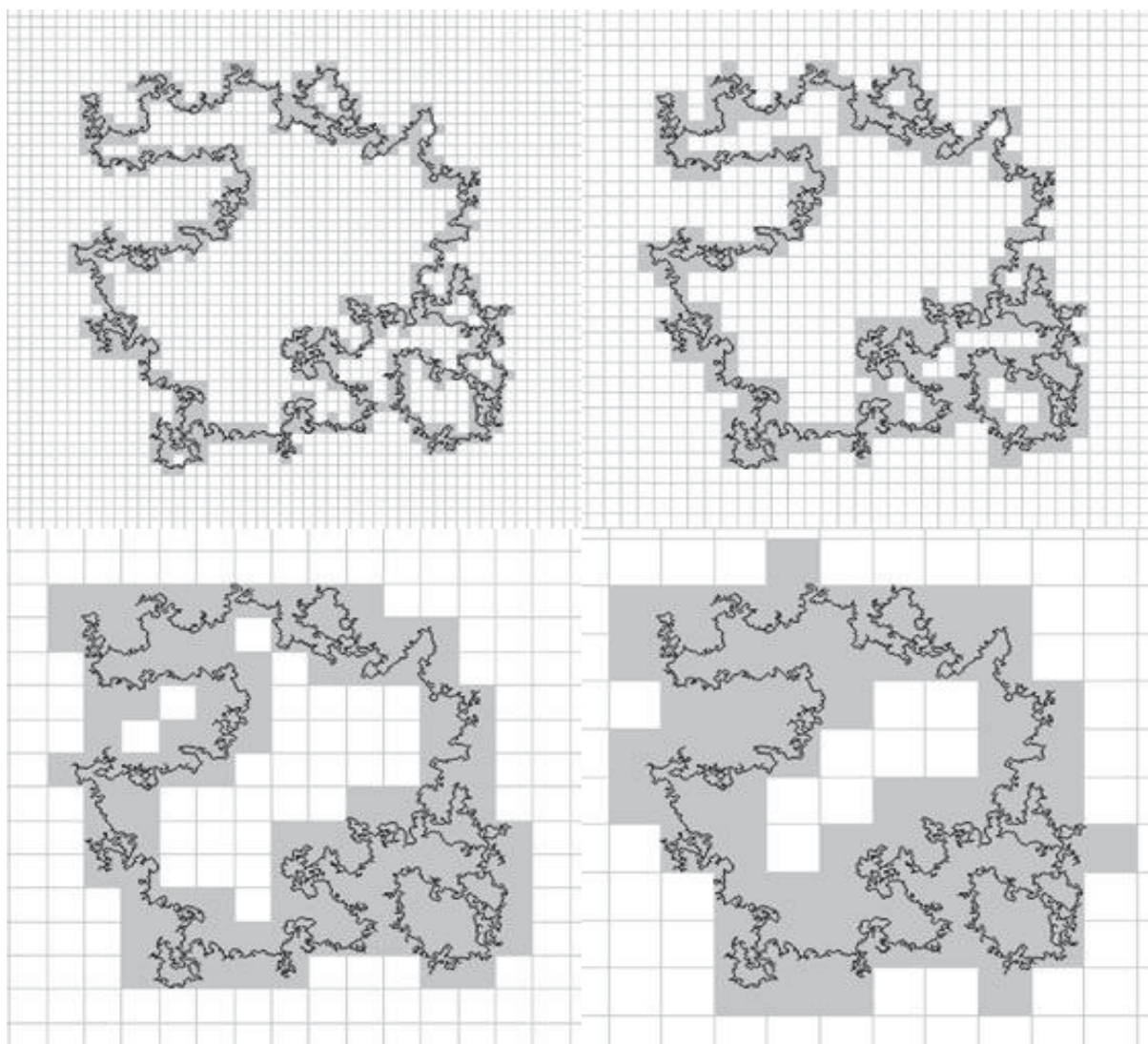


Figura 14: Na figura são mostradas quatro imagens preenchidas com quadrados de diferentes tamanhos. Observe que o número $N(L)$ de caixas necessárias para cobrir a imagem é inversamente proporcional à dimensão (L) do quadrado (LANDINI, 2011).

Sendo $N(L)$ o número de quadrados necessários para cobrir determinada forma geométrica, a quantidade de quadrados necessários para cobrir toda sua extensão aumentará quanto menores forem as dimensões dos quadrados. Para um segmento de reta, tem-se uma relação de proporcionalidade $N(L) \propto 1/L$. Para uma superfície (plano) a relação correspondente será $N(L) \propto 1/L^2$ enquanto que uma forma espacial (volume) apresentará relação descrita por $N(L) \propto 1/L^3$, sendo que $N(L)$ é a quantidade de cubos possuindo lados L necessários para cobrir a forma geométrica. Nas relações citadas, o expoente considera a dimensão topológica das formas geométricas. Para formas irregulares (figura 15a) tais dimensões devem ser substituídas pelas dimensões fractais (D_F), sendo k uma constante de proporcionalidade:

$$N(L) = \frac{k}{L^{D_F}} \quad (2)$$

Aplicando logaritmo na expressão (2) e considerando as propriedades algébricas:

$$\log N(L) = \log\left(\frac{k}{L^{D_F}}\right) = \log(k) - D_F \log(L) \quad (3)$$

Desconsiderando o primeiro termo à direita da igualdade na expressão (3):

$$\log N(L) = -D_F \log(L) \quad (4)$$

A equação (4) consiste de uma equação de reta com coeficiente angular D_F . Assim, a dimensão fractal é obtida mediante construção de um gráfico log-log: $\log N(L)$ versus $\log(L)$. O coeficiente angular da reta obtida será numericamente igual à dimensão fractal do objeto ou imagem analisada (figura 15b).

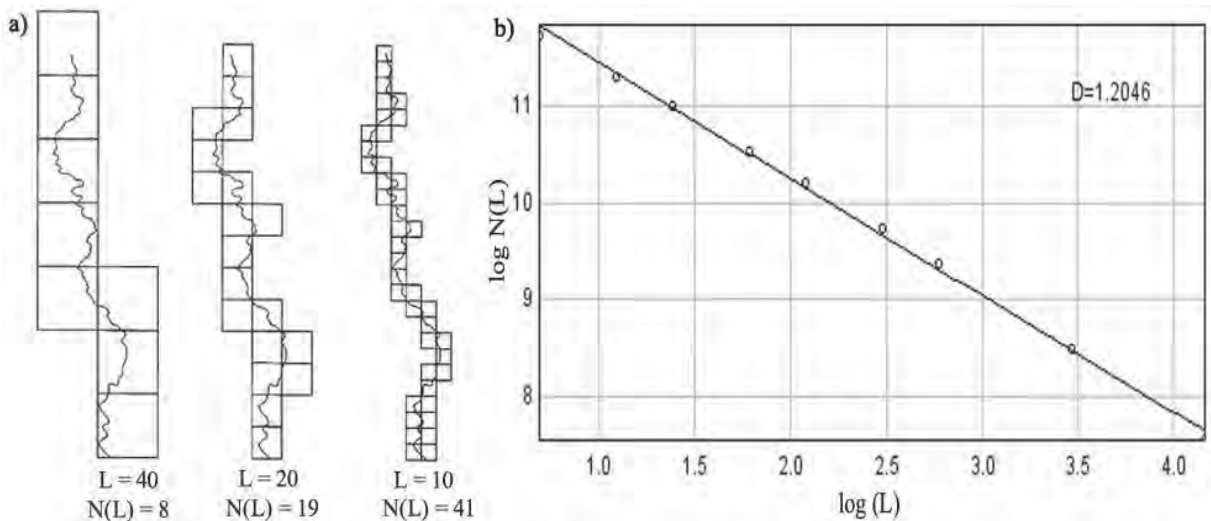


Figura 15: (a) Exemplo de contorno irregular ajustado pelo método de *box-counting*. Quanto menor for o tamanho dos quadrados, maior será o número $N(L)$ de quadrados necessários para cobrir a imagem (BAISH, JAIN, 2000). (b) Gráfico log-log para obtenção da dimensão fractal.

1.8.2. Aplicações em medicina e sistemas biológicos

A geometria euclidiana apresenta deficiências na descrição de estruturas complexas e irregulares, sendo inviável sua aplicação no estudo de sistemas biológicos (CROSS, 1997). Assim, a geometria fractal pode ser considerada uma ferramenta atrativa na tentativa de resolução de problemas que envolvem a complexidade estrutural e irregularidade desses sistemas (DINICOLA et al., 2011). A capacidade de quantificar informações que anteriormente poderiam ser descritas apenas qualitativamente e/ou subjetivamente permite que possíveis aplicações sejam realizadas, como acompanhamento de envelhecimento celular, monitoramento dos efeitos toxicológicos celulares, irregularidades globais e locais de tecidos neoplásicos. Além disso, a compreensão quantitativa e utilização da análise estatística pode auxiliar na padronização de diagnósticos e melhorias no direcionamento do tratamento de doenças (LANDINI, 2011).

Dentre as características presentes em sistemas biológicos está a relação entre morfologia e as funções desempenhadas pelas células. Além disso, tamanho e arquitetura celular são fatores importantes no diagnóstico e tratamento de doenças (LANDINI, 2011). A morfologia celular consiste da configuração espacial adquirida pela célula e representa uma manifestação visual de equilíbrio entre forças mecânicas que transmitem informações regulatórias para o microambiente celular (DINICOLA et al., 2011). Baseado no conceito de dimensionalidade, a ocupação espacial devido à morfologia irregular apresentada por objetos fractais (tendo como exemplo as células e tecidos presentes em sistemas biológicos) pode maximizar sua área superficial por unidade de volume. Para uma célula ou tecido, isso pode facilitar a difusão, secreção e/ou absorção de nutrientes (LANDINI, 2011).

As aplicações da análise fractal incluem estudos em oftalmologia, biologia molecular, análise de tecidos neoplásicos, neuropatologia, modelagem biológica e acompanhamento de regeneração óssea (CROSS, 1997; HEYMANS et al., 2000; ROCHA et al., 2008). Considerado um sistema caótico⁷ e complexo,⁸ com baixo nível de organização celular, crescimento tecidual desordenado e mal regulado, o estudo do câncer configura-se entre essas aplicações (DINICOLA et al., 2011). Tumores são estruturas compostas por células com

⁷ Sistemas caóticos são caracterizados por apresentarem dinâmicas não-lineares, causados por eventos que não são totalmente randômicos: apresentam uma “ordem oculta em uma aparente desordem”. Os comportamentos apresentados por esses sistemas são governados por simples regras de interação, extremamente sensíveis às condições iniciais. Essa sensibilidade pode produzir resultados inesperados e imprevisíveis (COFFEY, 1998).

⁸ A complexidade atribuída à organismos e sistemas biológicos está associada com formas, funções, seqüências de códigos e interações que possibilitam caracterizar a dinâmica de processos que envolvem esses organismos (ADAMI, 2002; BIZZARRI et al., 2011).

grande variedade de fenótipos. Diferentemente, tecidos normais são formados por células que apresentam estruturas genéticas altamente ordenadas (figura 16). As mudanças observadas em tecidos neoplásicos estão relacionadas com alterações e redução nas interações entre as células. Essa dinâmica não-linear e a heterogeneidade celular são as principais fontes de resistência aos agentes quimioterápicos, medicamentos e tratamentos (COFFEY, 1998).

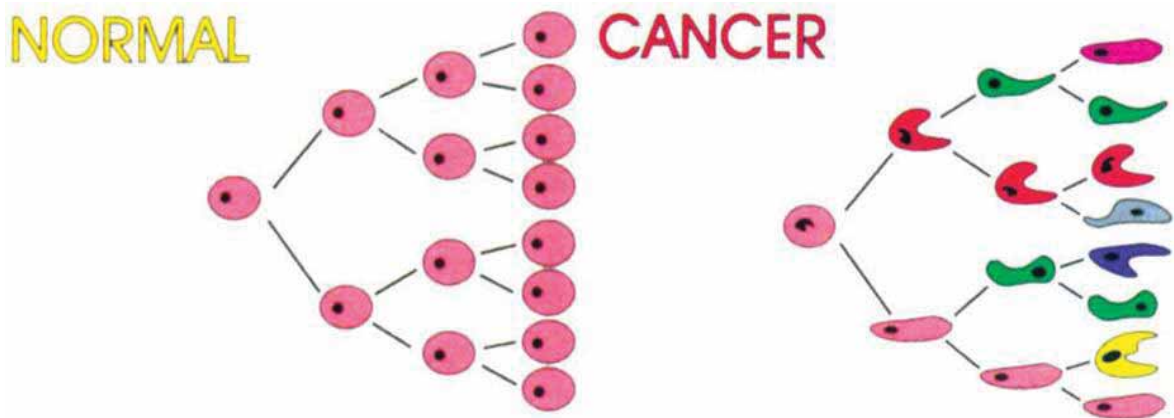


Figura 16: A diferença entre o alto ordenamento dos fenótipos para tecidos normais e a heterogeneidade apresentada nas células neoplásicas deve-se à instabilidade genética. Essa diversidade e baixo nível de organização celular observada no câncer é uma característica de sistemas caóticos (COFFEY, 1998).

Baseando-se na irregularidade de crescimento dos tumores, a dimensão fractal permite que sejam quantificadas características morfológicas usadas pelos patologistas na descrição de tecidos neoplásicos, como irregulares típicas de crescimento tumoral e seus padrões aparentemente aleatórios de ordenamento vascular. A associação da análise fractal com outras formas de diagnóstico assume grande importância, pois tratamentos não cirúrgicos (minimamente invasivos) envolvem diretamente a configuração vascular para transporte de agentes quimioterápicos e medicamentos até a região afetada. Altas irregularidades resultam em aumento na resistência ao fluxo sanguíneo quando comparados com sistemas vasculares mais ordenados (BAISH, JAIN, 2000).

Exemplos de aplicação da análise fractal no diagnóstico de câncer são estudos que relacionam os aspectos observados em análises histopatológicas com a dimensão fractal de tecidos neoplásicos para diversos tipos de neoplasias: carcinoma de bexiga (LUZI et al., 1999), carcinoma gástrico (VASILESCU et al., 2004), carcinoma de mama (LOSA, CASTELLI, 2005; TAMBASCO et al., 2010; LI et al., 2007), carcinoma de boca (MARGARITescu et al., 2010; GOUTZANIS et al., 2008), neoplasia de próstata (TAVERNA et al., 2009; TAMBASCO et al., 2009), neoplasia de fígado (UPPAL et al., 2010) e tumores cerebrais (LEVA et al., 2008; LEVA et al., 2010).

1.8.3. Entropia de Shannon

O conceito formulado na década de 1940 pelo matemático americano Claude Elwood Shannon (1916-2001) parte da definição de entropia (grau e/ou tendência de desorganização da matéria), estabelecida na Termodinâmica e Mecânica Estatística, para desenvolvimento de um modelo aplicado à Teoria da Informação: entropia como medida da “quantidade de informação e aleatoriedade de um sistema”. Baseado na probabilidade estatística para ocorrência de diferentes estados discretos do sistema, a entropia de Shannon (também chamada de entropia da informação) permite a quantificação da “incerteza e aleatoriedade” para ocorrência desses estados. A figura 17 exemplifica esse conceito ilustrando padrões hipotéticos de expressão gênica: os valores para entropia de Shannon foram proporcionais à variação apresentada nos níveis de expressão gênica (FUHRMAN et al., 2000).

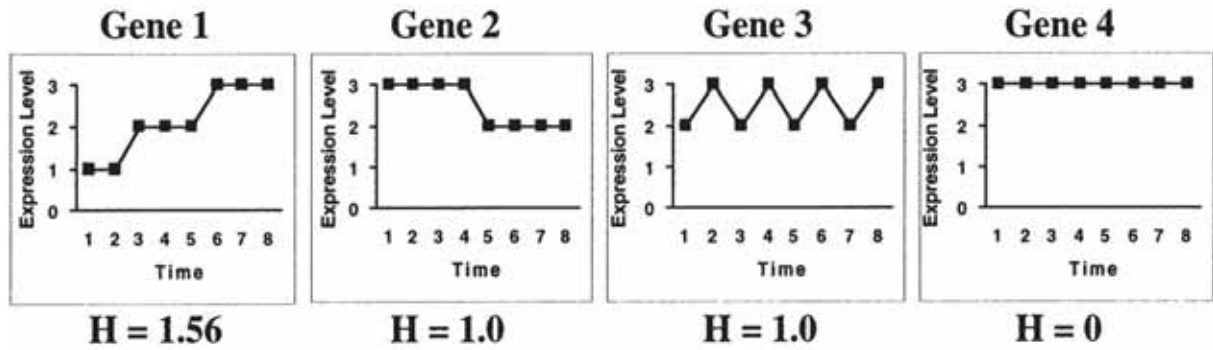


Figura 17: Para cada um dos genes hipotéticos, os valores para entropia de Shannon do sistema estão relacionados com a variação temporal para expressão gênica (FUHRMAN et al., 2000).

A informação presente em um sistema consiste de uma forma estatística de correlação. Para que uma informação tenha sentido, faz-se necessário a compreensão do sistema que está sendo analisado (ADAMI, 2002). Na análise de imagens, a obtenção de um histograma para intensidade de luminosidade dos pixels (após conversão da imagem em formato binário) pode ser interpretado como um conjunto de probabilidades de ocorrência de pixels com tonalidades escuras (que são os diferentes estados discretos do sistema). Assumindo que p_i corresponde à probabilidade de pixels da imagem assumirem intensidades i ($i=1,...,n$) esses valores estão relacionados com a quantidade de informação presente na imagem, obtida pelo cálculo da entropia de Shannon:

$$H = - \sum_{i=1, p_i > 0}^n p_i \log_b(p_i) \quad (5)$$

sendo que

$$p_i = \frac{n_i}{N} \quad (6)$$

Nas expressões (5) e (6), H representa a entropia de Shannon da imagem; p_i representa a probabilidade de ocorrência de pixels com tonalidade escura na imagem; n_i é o número total de pixels com tonalidade escura; N é a quantidade total de pixels da imagem e b representa a base logarítmica usada nos cálculos. A escolha da base logarítmica corresponde à unidade de medida de informação: base 2 implica que a informação obtida será dada em dígitos binários (bits) enquanto que os resultados obtidos usando-se a base 10 resultam em dígitos decimais (SHANNON, 1948). A relação entre essas bases logarítmicas é dada por:

$$\log_2(p_i) = \frac{\log_{10}(p_i)}{\log_{10}(2)} = \log_2(10) \log_{10}(p_i) = 3,32 \log_{10}(p_i) \quad (7)$$

Como pode ser observado na expressão (5), a entropia de Shannon consiste de uma função de densidade que representa a distribuição dos valores assumidos pelas intensidades dos pixels presentes na imagem: menores quantidades de pixels resultam em maiores valores para entropia de Shannon, indicando o nível de “desorganização” do sistema analisado.

OBJETIVOS

Os objetivos gerais e específicos do trabalho são:

Objetivo geral

Estabelecer uma metodologia para síntese de microesferas de PVA/PVAc mediante reação de polimerização em suspensão seguida por uma etapa de saponificação, com tamanhos de partículas entre 30µm e 1200µm.

Objetivos específicos

- 1) Estudar a influência da concentração de solução alcalina utilizada no processo de saponificação na morfologia e cristalinidade das partículas obtidas;
- 2) Realizar a caracterização morfológica e estrutural pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura e difração de raios-X, respectivamente;
- 3) Estudar os aspectos histopatológicos referentes à reação tecidual ao implante das partículas no tecido celular subcutâneo de ratos;
- 4) Analisar dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos celulares subcutâneos submetidos ao implante, assim como para as partículas sintetizadas antes de serem implantadas nos ratos. Ainda, relacionar tais informações com os resultados obtidos no estudo histopatológico.

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

O capítulo é dividido em duas partes: primeiramente são apresentados os materiais utilizados e a descrição dos procedimentos experimentais para síntese das microesferas de PVA/PVAc. Na segunda parte são descritos os procedimentos para a caracterização físico-química, estudo histopatológico, análise de dimensão fractal e entropia de Shannon das partículas e tecidos celulares subcutâneos.

2.1. Materiais

Foram utilizados os seguintes reagentes químicos para a síntese das microesferas: *agente de suspensão* (álcool polivinílico, PVA, peso molecular 78000 Da, grau de hidrólise 85%) e *iniciador da reação de polimerização* (peróxido de benzoíla, dosagem mínima de 65%, pureza superior a 99%) fornecidos por Vetec Química Fina (Duque de Caxias, Brasil). *Monômero polimérico* (acetato de vinila, VAc, pureza superior a 99%) e o *solvente do monômero* (terc-butanol, pureza superior a 99%) adquiridos da MERCK (Darmstadt, Alemanha). *Agente de troca do grupo funcional* (hidróxido de sódio, NaOH, 50% em água) e o *agente de dispersão das partículas* (sulfato de potássio, K₂SO₄, pureza superior a 99%) fornecidos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Água com qualidade Mili-Q (purificação com resistividade elétrica de 18.2 MΩcm, Maxima USF ELGA, High Wycombe, Reino Unido) utilizado como *meio racional*. Todos os reagentes citados foram utilizados sem purificação prévia.

2.1.1. Síntese das microesferas de PVA

As microesferas de PVA/PVAc foram sintetizadas mediante modificação de procedimentos experimentais descritos na literatura (LYOO, LEE, 2002; PINTO et al., 2006; PEIXOTO et al., 2006). A síntese ocorre em duas etapas: polimerização em suspensão do monômero acetato de vinila (VAc) formando o polímero precursor poli(acetato de vinila) (PVAc). Posteriormente, saponificação do PVAc e formação do PVA. O processo de síntese é descrito pelo esquema 9. O aparato experimental consiste de um reator conectado a um condensador, sob fluxo de gás nitrogênio com temperatura e agitação controladas, como ilustra a figura 18.

A polimerização em suspensão do PVAc inicia-se com a dissolução de 0,07g de PVA em 100 mL de água destilada, sob agitação controlada (700 rpm) e temperatura ambiente. Após a dissolução parcial do PVA, são adicionados 25 mL de VAc, 25 mL de terc-butanol e 1 g de peróxido de benzoíla, estando o sistema sob agitação constante e temperatura de 60°C. O sistema permanece nessas condições durante quatro horas, tempo necessário para que ocorra a polimerização em cadeia do PVAc.

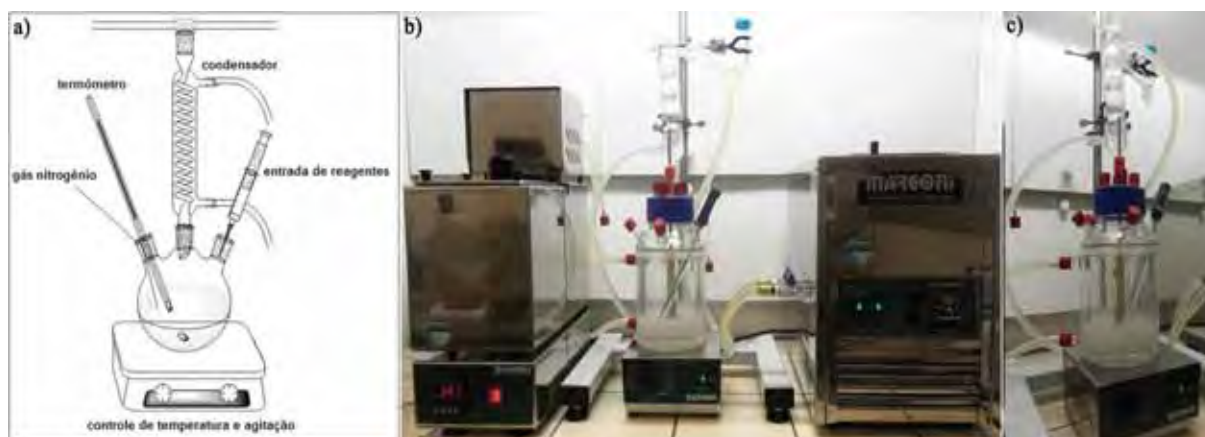


Figura 18: (a) Esquema básico do reator utilizado nas sínteses das microesferas de PVA; (b) e (c) Aparato experimental e detalhe do reator utilizado nas sínteses.⁹

Após a etapa de polimerização, inicia-se a saponificação (hidrólise completa ou parcial do PVAc em PVA) com a temperatura do sistema entre 30°C e 35°C. Adiciona-se 10 mL de solução K_2SO_4 ao sistema (1g de K_2SO_4 em 10 mL de H_2O). A saponificação ocorre mediante adição lenta (gotejamento) de 100 mL de solução de NaOH, com diferentes concentrações. A tabela 1 resume os parâmetros para as sínteses que resultaram em microesferas com morfologia e tamanho desejado:

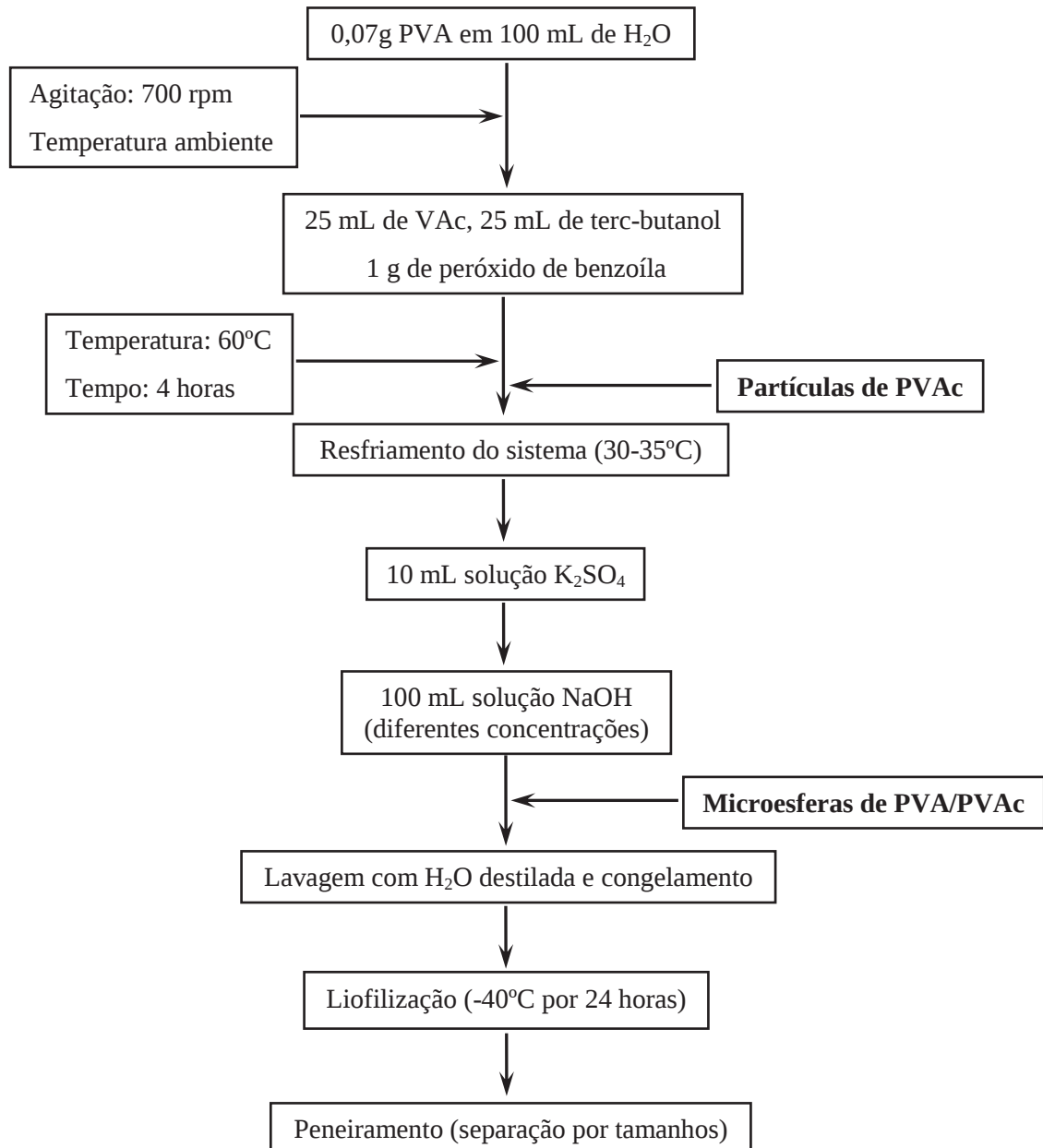
Tabela 1: Parâmetros utilizados nas etapas de polimerização e saponificação das microesferas de PVA/PVAc.

Amostra	Velocidade de agitação (rpm)	Concentração da solução de NaOH (mol/L)
1	700	4
2	700	8
3	700	12
4	700	16
5	700	20
6	700	25

As partículas de PVA/PVAc foram lavadas várias vezes com água destilada para retirar o excesso de solução alcalina (pH da solução aproximadamente neutro) e congeladas

⁹ Imagens do aparato experimental utilizado para síntese das microesferas de PVA/PVAc: LACET (*Laboratory for Clean Energy Technology*). UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto, 2011.

para posteriormente serem submetidas à liofilização (temperatura de -40°C por 24 horas). A síntese é concluída com a separação das partículas em vários tamanhos, mediante passagem em diversas peneiras.



Esquema 9: Descrição dos procedimentos para síntese das microesferas de PVA/PVAc.

2.2. Caracterização físico-química

A caracterização físico-química das partículas foi realizada usando as técnicas de difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura. Também foram analisadas duas partículas disponíveis comercialmente: *Contour PVA Embolization Particles* (Boston Scientific, Natick, USA) e *PVA Foam Embolization Particles* (Cook Medical, Bloomington, USA).

2.2.1. Caracterização estrutural por difração de raios-X

As análises de difração de raios-X foram realizadas em um aparelho Rigaku Rotaflex RU200B (Tokyo, Japão) equipado com uma placa plana de geometria Bragg-Brentano, monocromador de grafite e operando com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), voltagem de 50 kV e corrente elétrica 100 mA. A radiação refletida foi coletada em intervalo $2\theta = 5-80^\circ$, com um passo de $0,02^\circ$ (taxa de 10s/passo).

2.2.2. Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram feitas em um microscópio Philips XL30 FEG (Amsterdã, Holanda) operando com feixe regulável de elétrons para voltagens entre 5 kV e 25 kV.

2.3. Análise histopatológica

Os experimentos foram realizados por um médico veterinário na faculdade de medicina veterinária de Araçatuba (UNESP – Câmpus de Araçatuba) após aprovação pelo comitê de ética local (anexo B). Oito ratos ($n = 8$) adultos da linhagem Wistar, com massa corporal entre 300g e 350g, foram incluídos no estudo e submetidos ao implante subcutâneo de três tipos de partículas: *grupo 1* e *grupo 2*, partículas sintetizadas usando solução 4 mol/L e 25 mol/L de NaOH durante a saponificação, respectivamente. Ambas as partículas, em ausência de solução, possuem diâmetro entre $350\mu\text{m}$ e $500\mu\text{m}$. O *grupo 3* é composto por partículas disponíveis comercialmente (*PVA Foam Embolization Particles*, Cook Medical, Bloomington, USA) com diâmetro entre $300\mu\text{m}$ e $500\mu\text{m}$. Os animais foram anestesiados mediante injeção intramuscular, sendo que todas as partículas foram implantadas com os ratos posicionados em decúbito ventral. Cada animal recebeu os 3 grupos de partículas no tecido celular subcutâneo, como ilustra a figura 19. Aos 7 dias após implante, 2 animais sofreram eutanásia humanitária mediante aplicação excessiva de anestésico e 3 animais foram submetidos ao mesmo procedimento após 15 e 30 dias do implante das partículas.

O processamento dos tecidos foi realizado por um patologista da mesma instituição. Os retalhos cutâneos foram fixados em formaldeído, 10% tamponado, por 48 horas, seguindo-se pela desidratação em alcoóis, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes de tecido com tamanho entre $4\mu\text{m}$ e $5\mu\text{m}$ foram submetidos à coloração de hematoxilina-eosina (HE) e examinados por microscopia ótica para avaliação da reação inflamatória e

características morfológicas. Os critérios para análise microscópica foram escolhidos conforme grupos de partículas e tempo de permanência nos animais.



Figura 19: (a) Detalhe do tecido celular subcutâneo submetido ao implante das partículas e (b) Localização dos grupos de partículas implantadas (procedimento foi padronizado para todos os animais).

2.4. Dimensão fractal e entropia de Shannon

As análises de dimensão fractal e entropia de Shannon foram realizadas na tentativa de relacionar três fatores: reação inflamatória induzida pelo implante das partículas, dimensão fractal/entropia de Shannon das partículas antes do implante e dimensão fractal/entropia de Shannon dos tecidos celulares subcutâneos após diferentes períodos de permanência das partículas nos ratos. Assim, foram analisadas imagens provenientes de dois conjuntos de dados: microscopia eletrônica de varredura para as partículas sintetizadas (saponificação com 4 mol/L e 25 mol/L de solução alcalina) e resultados de microscopia ótica para os tecidos celulares subcutâneos. Também foram obtidas imagens do tecido celular subcutâneo para um animal controle (mesma idade e massa corporal dos animais que receberam as partículas).

As análises de dimensão fractal foram realizadas pelo método *box-counting* no software ImageJ, versão 1.45k (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Para obtenção do histograma de luminosidade, as imagens foram binarizadas com tons de cinza variando entre 0 (preto) e 255 (branco). O contorno das imagens (*outline*) foi feito para as regiões escuras, cobertas com caixas quadradas de dimensões entre 2 e 64 pixels (2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 32 e 64 pixels). O cálculo da entropia de Shannon foi realizado conforme definição descrita na seção 1.8.3., usando a base logarítmica 2, sendo que os resultados obtidos consistem da probabilidade de ocorrência de pontos pretos na imagem analisada, associados

às partículas de PVA (resultados de MEV) e tecidos celulares subcutâneos (microscopia ótica das lâminas histológicas).

Todos os resultados foram analisados estatisticamente no software *StatsDirect Statistical Software*, versão 2.7.2 (StatsDirect Ltd, Altrincham, UK). Os dados foram analisados mediante análise estatística descritiva para obtenção dos valores mínimos e máximos, medianas, quartil inferior e superior (resultados descritos nos gráficos *box-plot*). Além disso, a comparação estatística foi realizada por dois testes: *Tukey-Kramer* e *Dunnett*. A análise estatística pelo teste de *Tukey-Kramer* aplica-se no estudo de grupos/tratamentos que apresentam diferentes quantidades de dados. A estratégia baseia-se na obtenção da diferença mínima significativa entre dois grupos de resultados, quantificando a magnitude para menor diferença estatística entre eles. Quanto ao teste de *Dunnett*, os valores obtidos para os diferentes grupos de dados são comparados com os resultados para um grupo controle. Nesse caso, esse grupo consiste dos valores obtidos para dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos do animal controle (não foi submetido ao implante das partículas). Na análise comparativa, os resultados foram considerados estatisticamente diferentes somente para valores de $P \leq 0,05$ (ZAR, 1999).

2.4.1. Análise para as partículas antes do implante subcutâneo

Todas as imagens foram digitalizadas com resolução de 72 dpi (712x423 *pixels*) no formato JPEG. No total foram analisadas 30 imagens de MEV obtidas com aumentos de 50X e 100X. A figura 20 mostra as imagens utilizadas, as informações para cálculo de entropia de Shannon (conversão no formato binário e obtenção da quantidade de pontos pretos e brancos da imagem) e cálculo de dimensão fractal pelo método *box-counting* (contorno das imagens binarizadas para posterior preenchimento com caixas quadradas de diferentes dimensões):

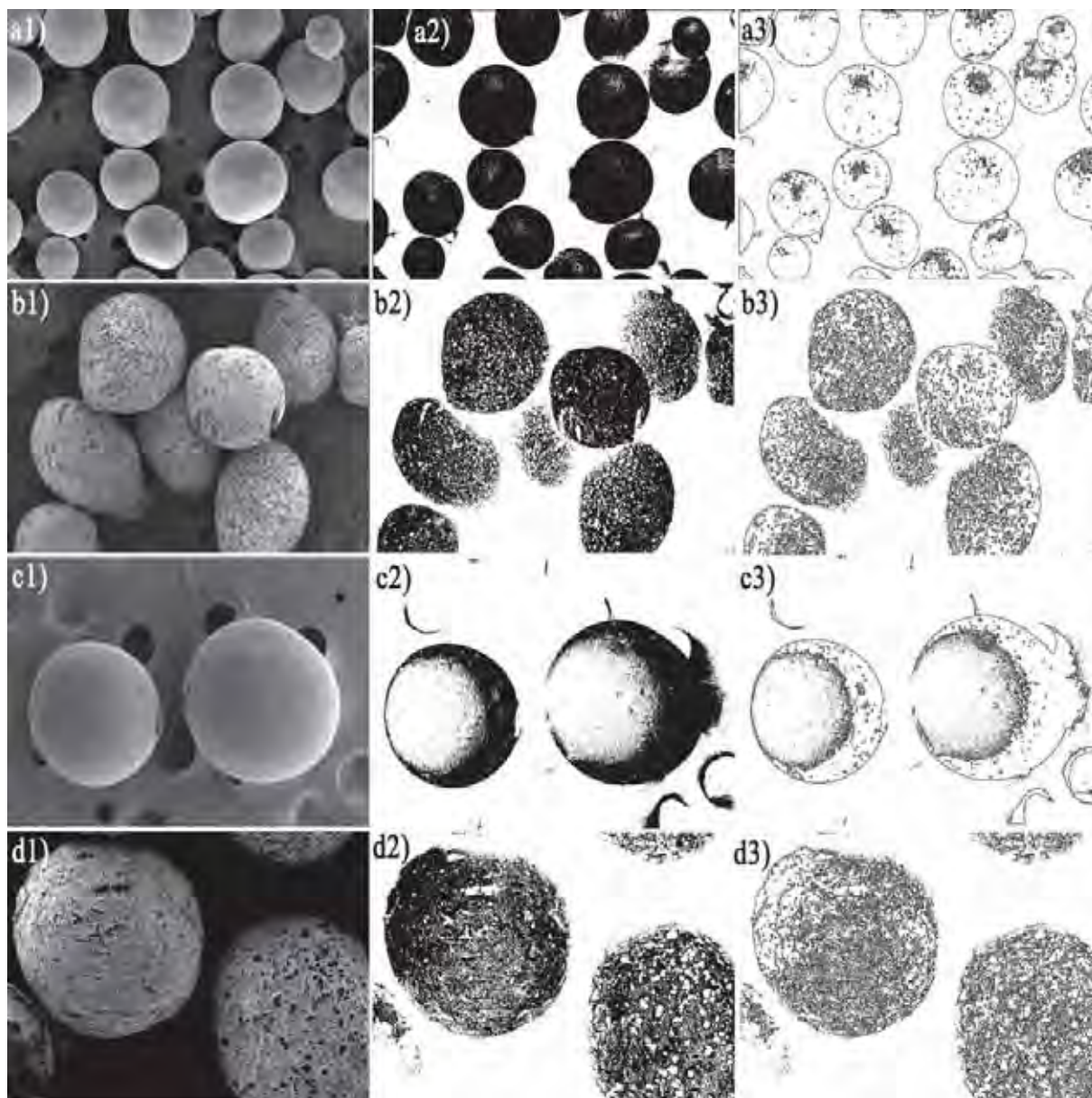


Figura 20: Exemplos de imagens de MEV utilizadas para cálculo de dimensão fractal e entropia de Shannon (a1, a2, a3: 4 mol/L com aumento 50X; b1, b2, b3: 25 mol/L com aumento 50X; c1, c2, c3: 4 mol/L com aumento 100X; d1, d2, d3: 25 mol/L com aumento 100X).

2.4.2. Análise para os tecidos celulares subcutâneos

Seguindo o mesmo procedimento para resultados de MEV, as imagens de microscopia ótica foram digitalizadas com resolução de 72 dpi (4140x3093 *pixels*) no formato JPEG. Os resultados foram obtidos utilizando microscópio Olympus BX 60 (Olympus America Inc., Melville, NY, USA) equipado com software Image-Pro Plus, versão 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MA, USA). Ao total, foram analisadas 980 imagens para os tecidos subcutâneos do animal controle e dos animais submetidos ao implante, obtidas com diferentes aumentos: 4X, 10X, 20X e 40X. As figuras 21 a 24 exemplificam as imagens analisadas:

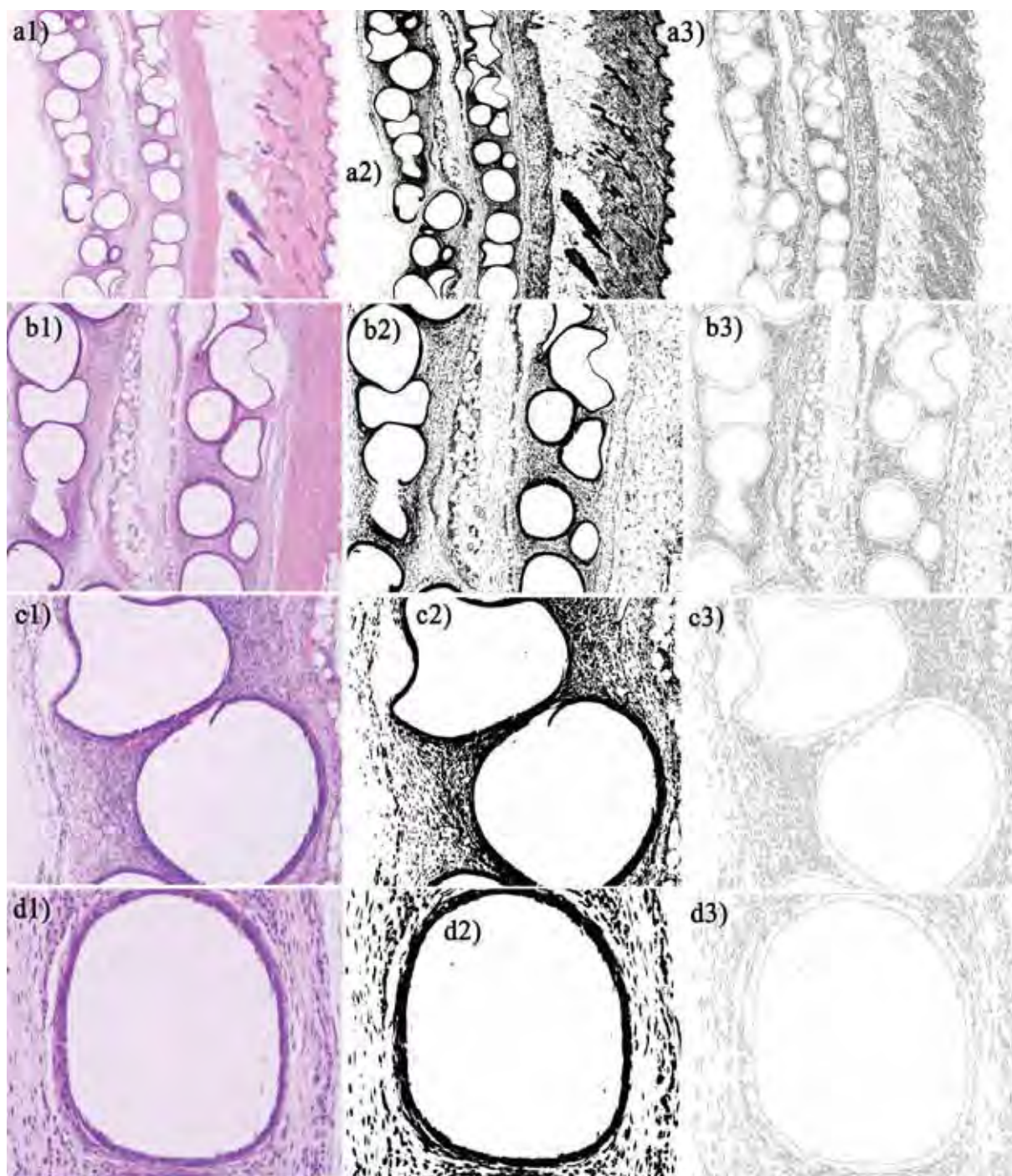


Figura 21: Exemplos de imagens de microscopia ótica utilizadas no cálculo de dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos celulares subcutâneos submetidos ao implante das partículas 4 mol/L (**a1, a2, a3:** aumento 4X; **b1, b2, b3:** aumento 10X; **c1, c2, c3:** aumento 20X; **d1, d2, d3:** aumento 40X).

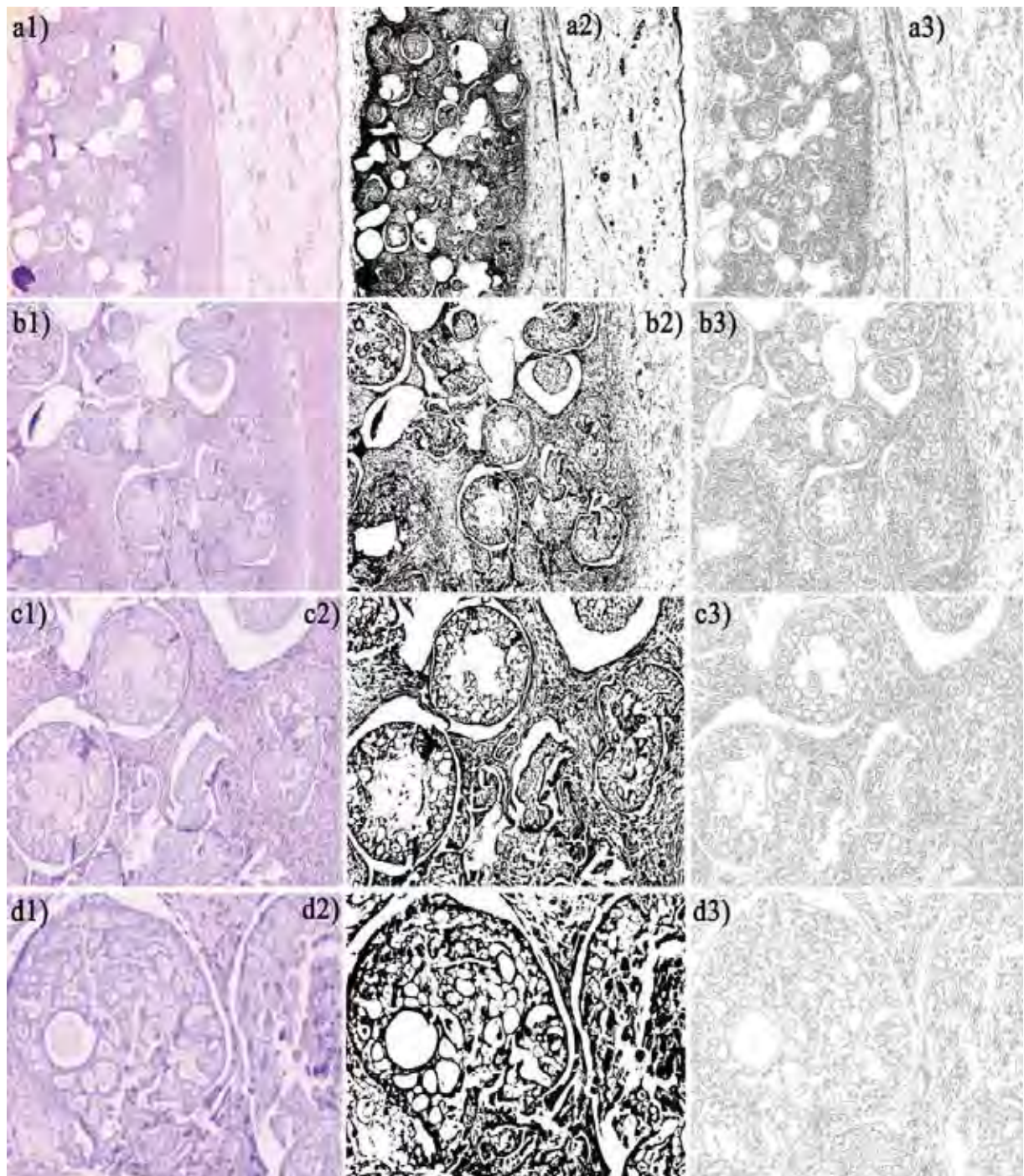


Figura 22: Exemplos de imagens de microscopia ótica utilizadas no cálculo de dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos celulares subcutâneos submetidos ao implante das partículas 25 mol/L (**a1, a2, a3:** aumento 4X; **b1, b2, b3:** aumento 10X; **c1, c2, c3:** aumento 20X; **d1, d2, d3:** aumento 40X).

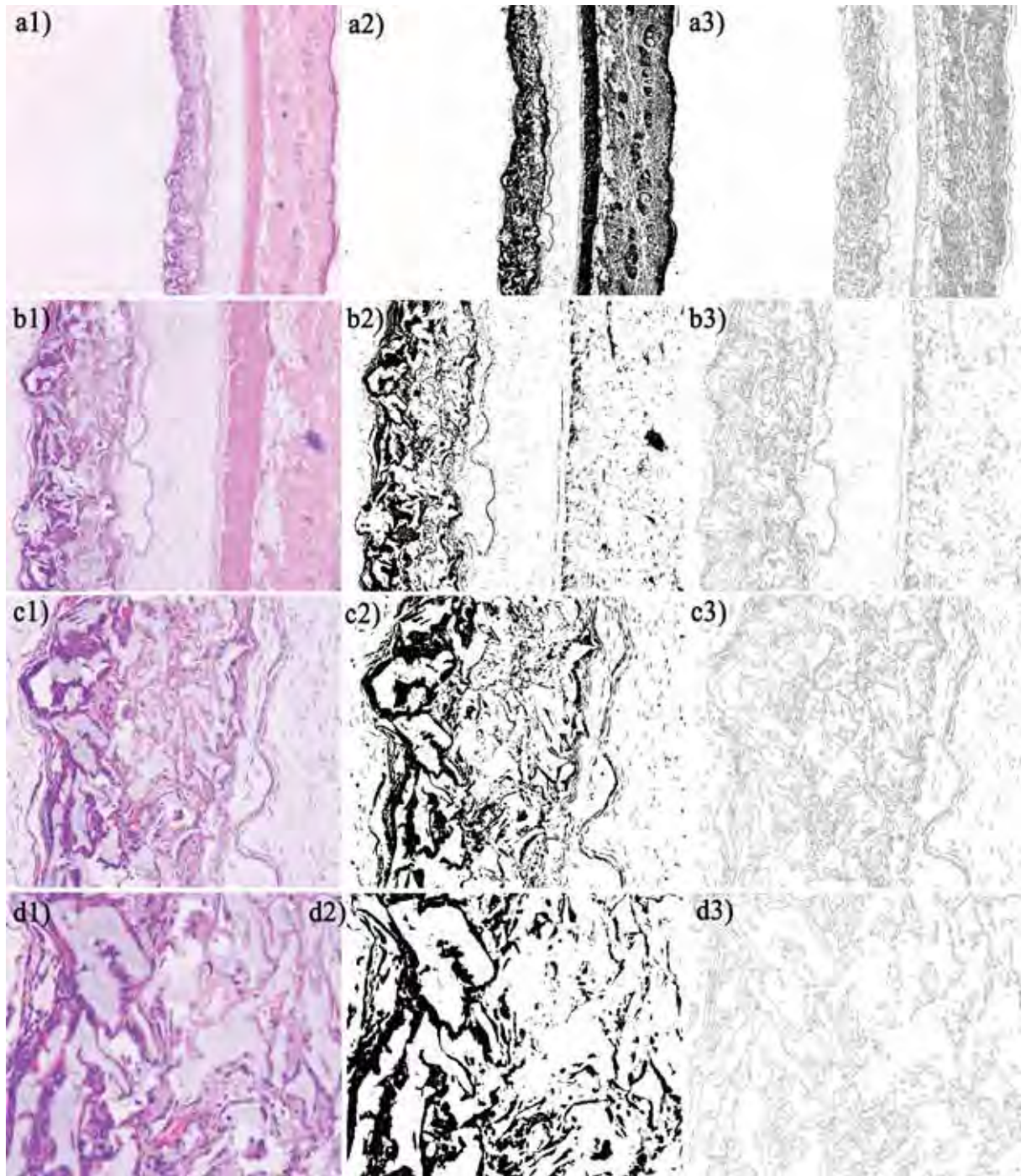


Figura 23: Exemplos de imagens de microscopia ótica utilizadas no cálculo de dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos celulares subcutâneos submetidos ao implante das partículas comerciais (**a1, a2, a3:** aumento 4X; **b1, b2, b3:** aumento 10X; **c1, c2, c3:** aumento 20X; **d1, d2, d3:** aumento 40X).

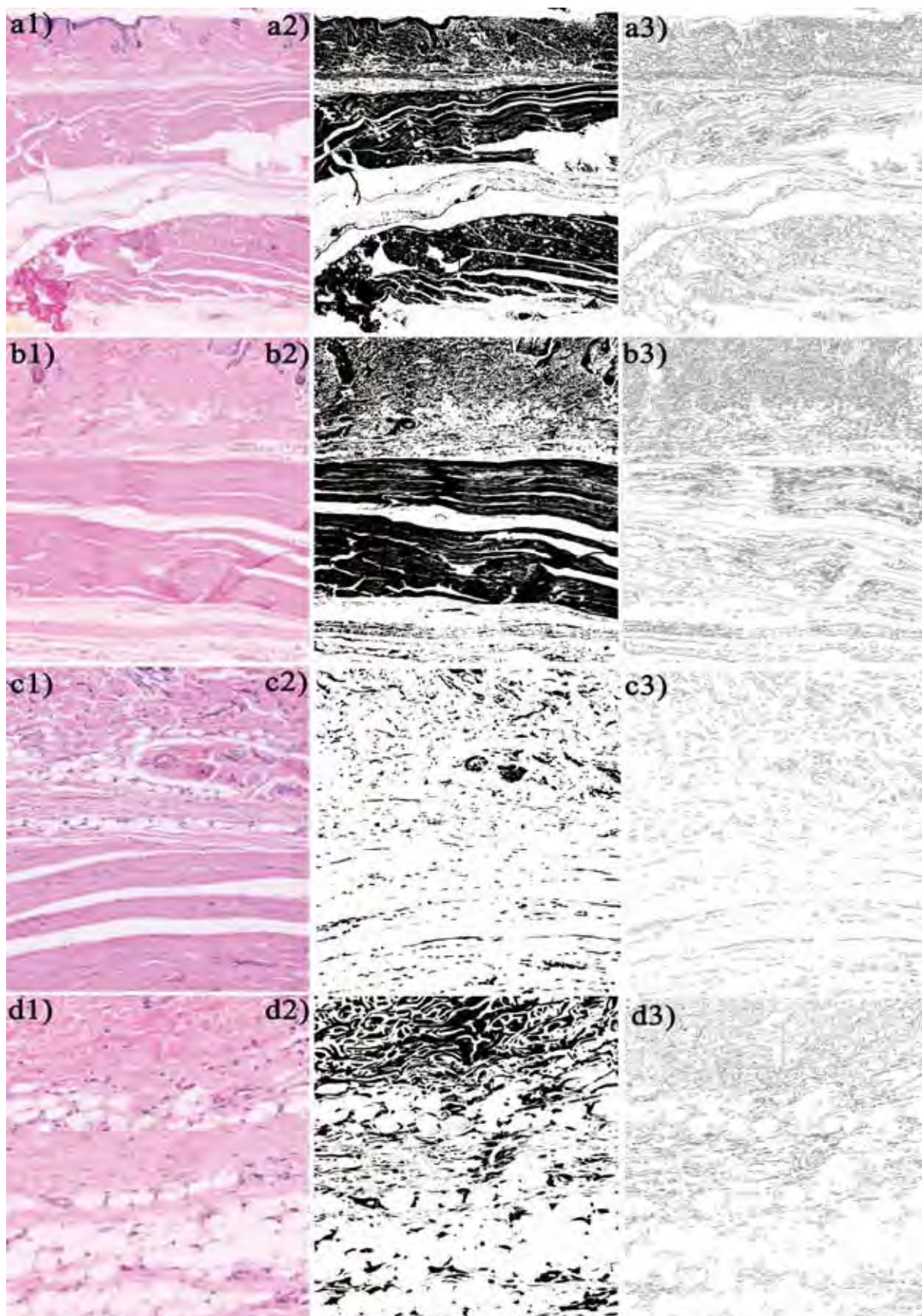


Figura 24: Exemplos de imagens de microscopia ótica utilizadas no cálculo de dimensão fractal e entropia de Shannon do tecido celular subcutâneo para o animal controle (**a1, a2, a3:** aumento 4X; **b1, b2, b3:** aumento 10X; **c1, c2, c3:** aumento 20X; **d1, d2, d3:** aumento 40X).

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas próximas seções são apresentados e discutidos os resultados para a caracterização estrutural e morfológica, seguidos pelo estudo histopatológico, análise de dimensão fractal e entropia de Shannon das partículas e tecidos celulares subcutâneos.

3.1. Caracterização estrutural e morfológica

Na figura 25 são apresentados os padrões de difração de raios-X para as partículas sintetizadas de acordo com os parâmetros descritos na tabela 1 (seção 2.1.1.):

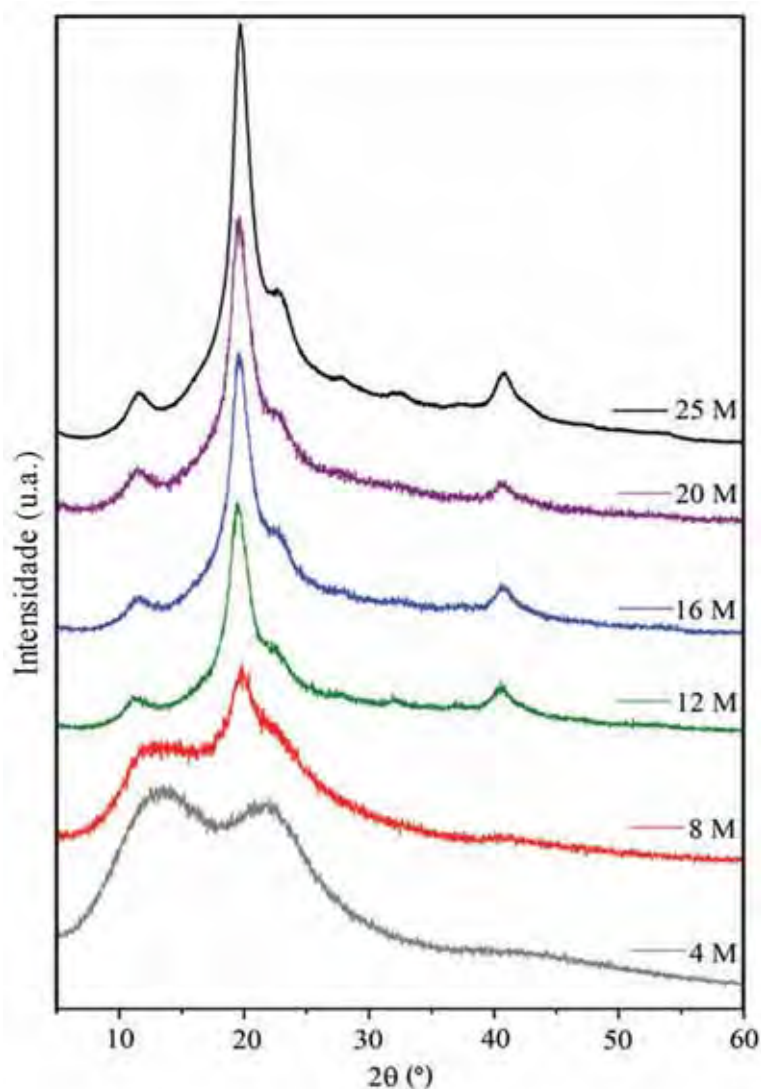


Figura 25: Padrões de difração de raios-X para as partículas sintetizadas usando diferentes concentrações de NaOH na saponificação (M = mol/L; u.a. = unidades arbitrárias).

A análise dos difratogramas indica que a concentração de NaOH usada na saponificação influencia diretamente na estrutura cristalina do PVA. As partículas sintetizadas

com 4 mol/L e 8 mol/L de NaOH resultaram em polímeros que apresentaram largos picos de difração na região $2\theta = 7-30^\circ$, revelando sua natureza amorfa. Quando a concentração de solução alcalina é aumentada de 12 mol/L para 25 mol/L, os resultados mostram aspectos distintos. Os picos de difração nas posições $2\theta = 11.5^\circ$ e 40.5° , perceptíveis a partir do difratograma da amostra saponificada com solução 12M de NaOH, indicam que novos arranjos atômicos estão sendo formados (os raios-X que incidiram na amostra encontraram átomos em posições diferentes, resultando em diferentes valores para 2θ). O resultado mais eloqüente ocorre para a amostra preparada com solução 25 mol/L de NaOH, apresentando distintos picos de difração nas posições $2\theta = 11.5^\circ$, 19.5° , 23.0° e 40.5° . A amplitude e a forma dos picos indicam claramente que possui uma estrutura cristalina mais organizada que as demais amostras preparadas neste estudo, assim como outras partículas poliméricas de PVA/PVAc descritas na literatura (LEE et al., 2005; PINTO et al., 2006; PEIXOTO et al., 2006).

A figura 26 apresenta os dados obtidos para as partículas sintetizadas com 4 mol/L, 25 mol/L de NaOH e uma partícula disponível comercialmente:

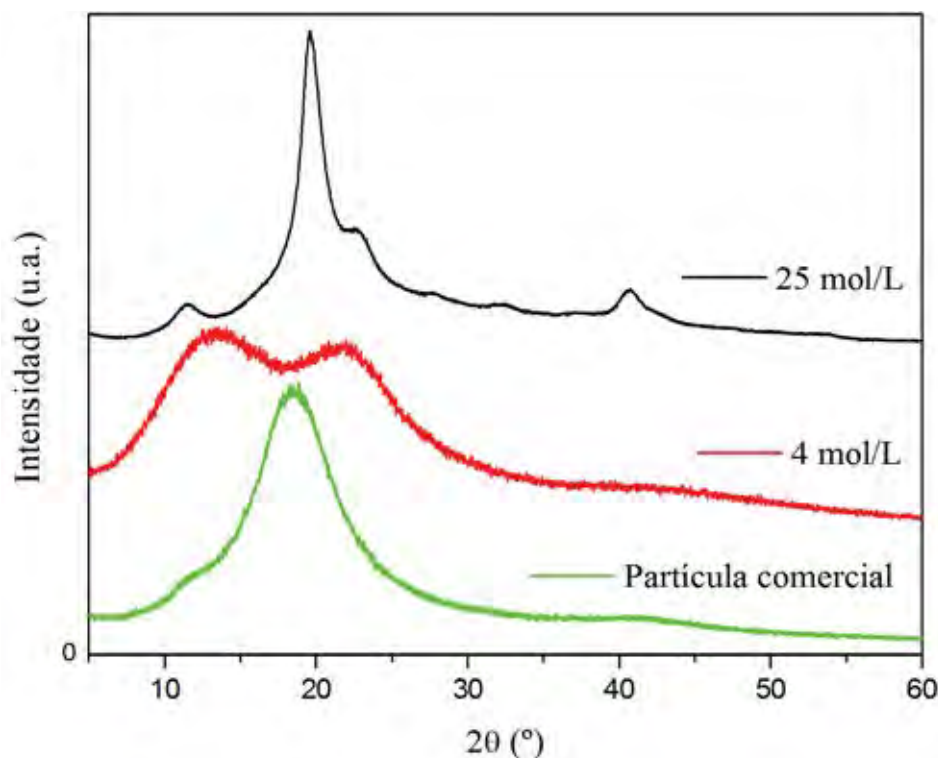


Figura 26: Padrões de difração de raios-X para as partículas sintetizadas usando 4 mol/L, 25 mol/L de NaOH na saponificação e partícula comercial (*Contour PVA Embolization Particles*, Boston Scientific, Natick, USA).

A comparação dos padrões de difração de raios-X destacados na figura acima corrobora os fatos de que a amostra sintetizada com alta concentração de solução alcalina possui estrutura molecular mais organizada. Os dados obtidos para a partícula comercial

assemelham-se aos resultados encontrados na literatura (LEE et al., 2005; PINTO et al., 2006; PEIXOTO et al., 2006) sendo que o padrão de difração de raios-X da amostra saponificada com 25 mol/L de NaOH configura-se como o melhor padrão de cristalinidade observado em agentes embólicos compostos por PVA, relatados na literatura (SEMENZIM et al., 2011).

Na figura 27 são apresentados os resultados de MEV para as amostras sintetizadas e duas partículas disponíveis comercialmente:

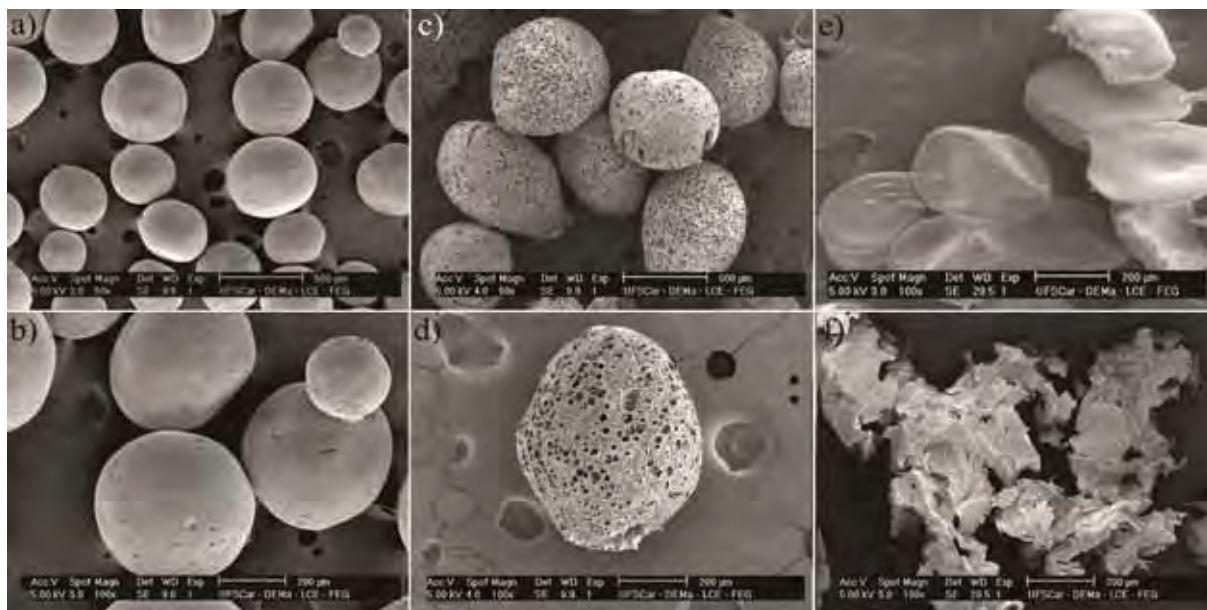


Figura 27: MEV das amostras sintetizadas e partículas comerciais. **(a), (b)** Partículas sintetizadas usando solução 4 mol/L de NaOH na saponificação (aumentos de 50X e 100X); **(c), (d)** 25 mol/L de NaOH na saponificação (aumentos de 50X e 100X); **(e)** *Contour PVA Embolization Particles*, Boston Scientific, Natick, USA (aumento de 100X); **(f)** *PVA Foam Embolization Particles*, Cook Medical, Bloomington, USA (aumento de 100X).

Os dados mostram que não há diferença significativa na morfologia das partículas sintetizadas com diferentes concentrações de NaOH na saponificação. Portanto, a morfologia se define na polimerização, pois todas as amostras preparadas neste estudo (de acordo com as condições experimentais descritas na tabela 1) apresentaram morfologia esférica (embora aqui são apresentados apenas resultados para duas condições de síntese). Diferentemente, as partículas comerciais possuem morfologia não-esférica (figura 27e) e aspecto flocular (figura 27f). A morfologia esférica obtida está de acordo com resultados descritos na literatura (LEE et al., 2005; PINTO et al., 2006; PEIXOTO et al., 2006; LEE, LYO, 2008; PEIXOTO et al., 2009; PEIXOTO et al., 2011).

A figura 28 permite uma comparação superficial detalhada das amostras sintetizadas. Diferentemente da morfologia, a superfície das amostras é alterada pela concentração de NaOH utilizada na saponificação. Observa-se claramente que o aumento na concentração de

solução alcalina resulta em partículas com alta porosidade. Além disso, a coloração e superfície de contato apresentada também foi diferente: partículas sintetizadas com 4 mol/L de NaOH possuem coloração branca e aspecto mais aglutinante quando comparado com as partículas sintetizadas usando-se 25 mol/L de NaOH, que possuem coloração avermelhada.

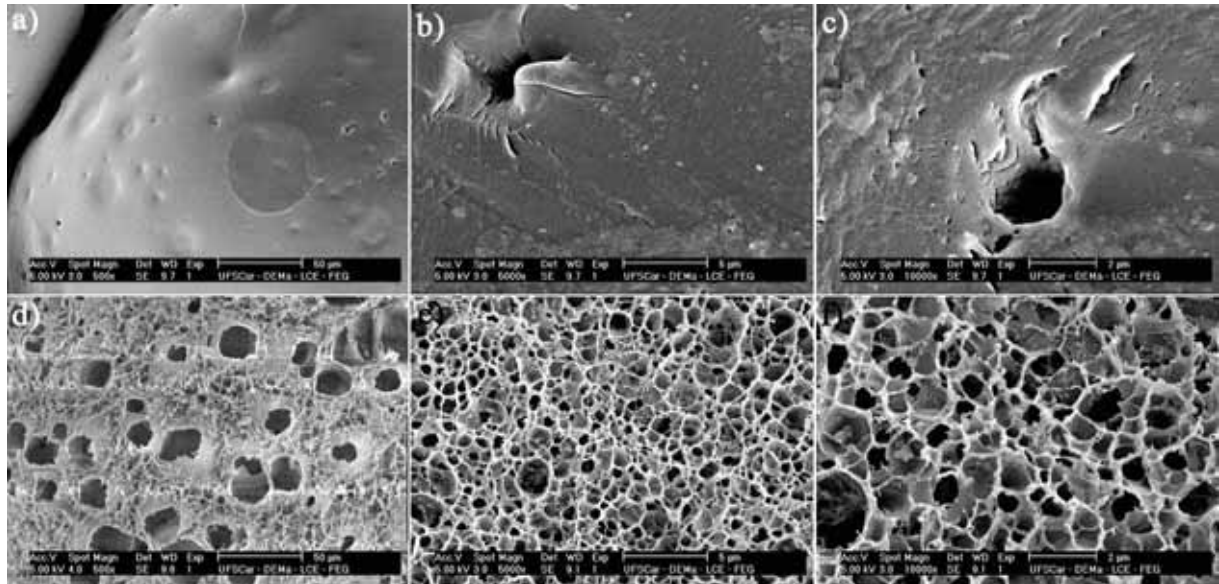


Figura 28: Comparação entre as superfícies das partículas sintetizadas. (a), (b) e (c) 4 mol/L de NaOH na saponificação; (d), (e) e (f) 25 mol/L de NaOH na saponificação (aumentos de 500X, 5000X e 10000X).

3.2. Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada categorizando-se os resultados por tempo de permanência nos ratos e grupos de partículas implantadas. Os parâmetros analisados foram: características morfológicas (aparência e deformação das partículas) e intensidade da reação inflamatória quanto aos principais eventos encontrados. Na tabela 2 são apresentados os resultados para os 3 grupos de partículas em todos os períodos analisados:

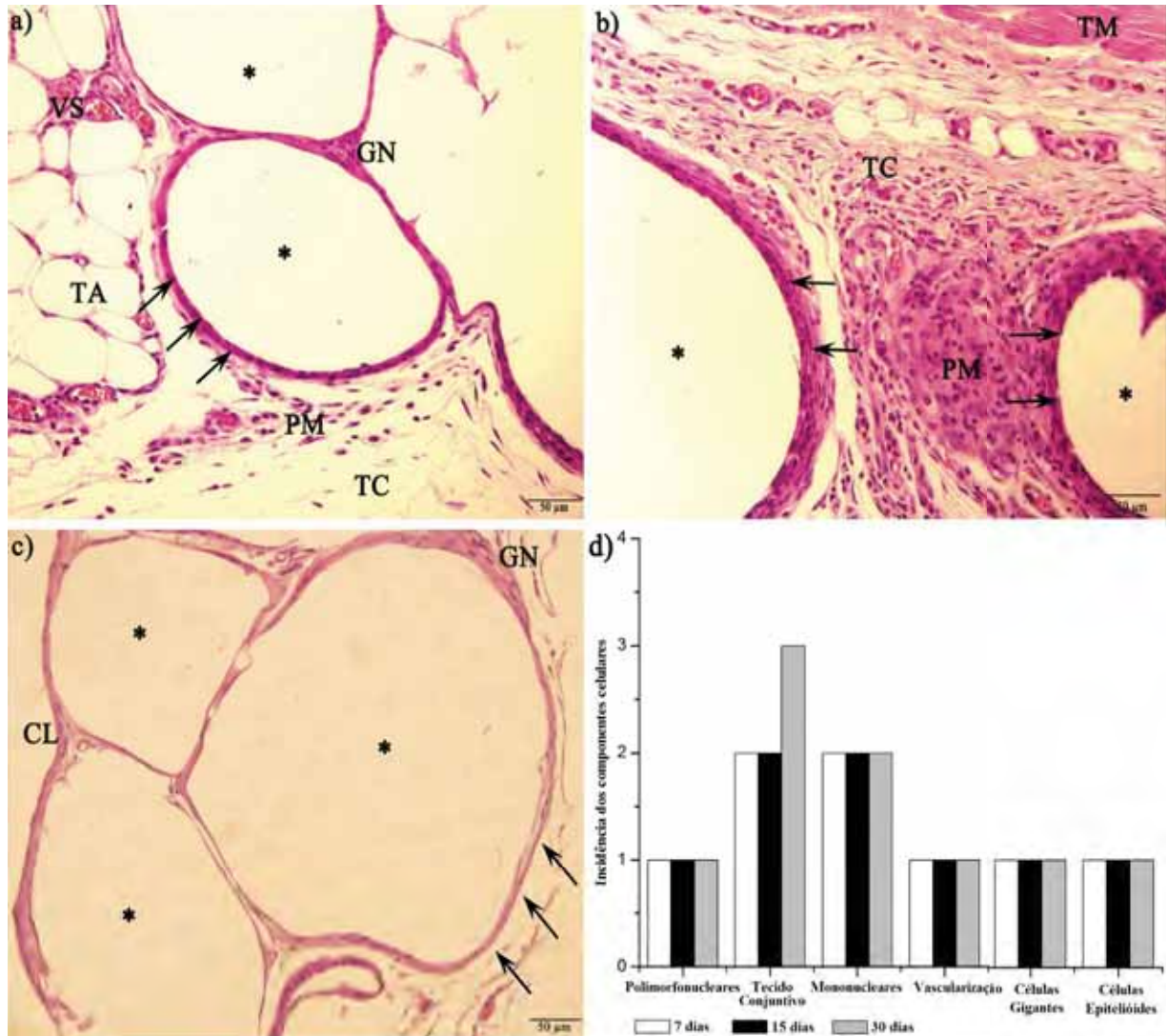
Tabela 2: Avaliação patológica dos tecidos subcutâneos após diferentes períodos de permanência das partículas.

Avaliação	7 dias			15 dias			30 dias		
	4 mol/L	25 mol/L	Comercial	4 mol/L	25 mol/L	Comercial	4 mol/L	25 mol/L	Comercial
Polimorfonucleares	+	+	++	+	+	+	+	+	+
Mononucleares	++	++++	+++	++	++++	+++	++	++++ (L/M)	+++ (P/M)
Vascularização	+	++	++	+	++	++	+	++	++
Tecido conjuntivo	++	++	++	++	+++	+++	+++	++++	+++
Células gigantes	+	++	++	+	++	++	+	++	++
Células epitelióides	+	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++
Musculatura	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Encapsulamento	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

--: ausente, +: raro, ++: discreto, +++: moderado, ++++: acentuado

L: linfócitos, M: macrófagos, P: plasmócitos

Os animais analisados apresentaram reação inflamatória, sem invasão e comprometimento da musculatura devido ao encapsulamento das partículas para todos os grupos implantados. As partículas do grupo 1 (saponificação com 4 mol/L de NaOH) analisadas nos três períodos de permanência nos ratos aparecem como imagem negativa, como mostra a figura 29:



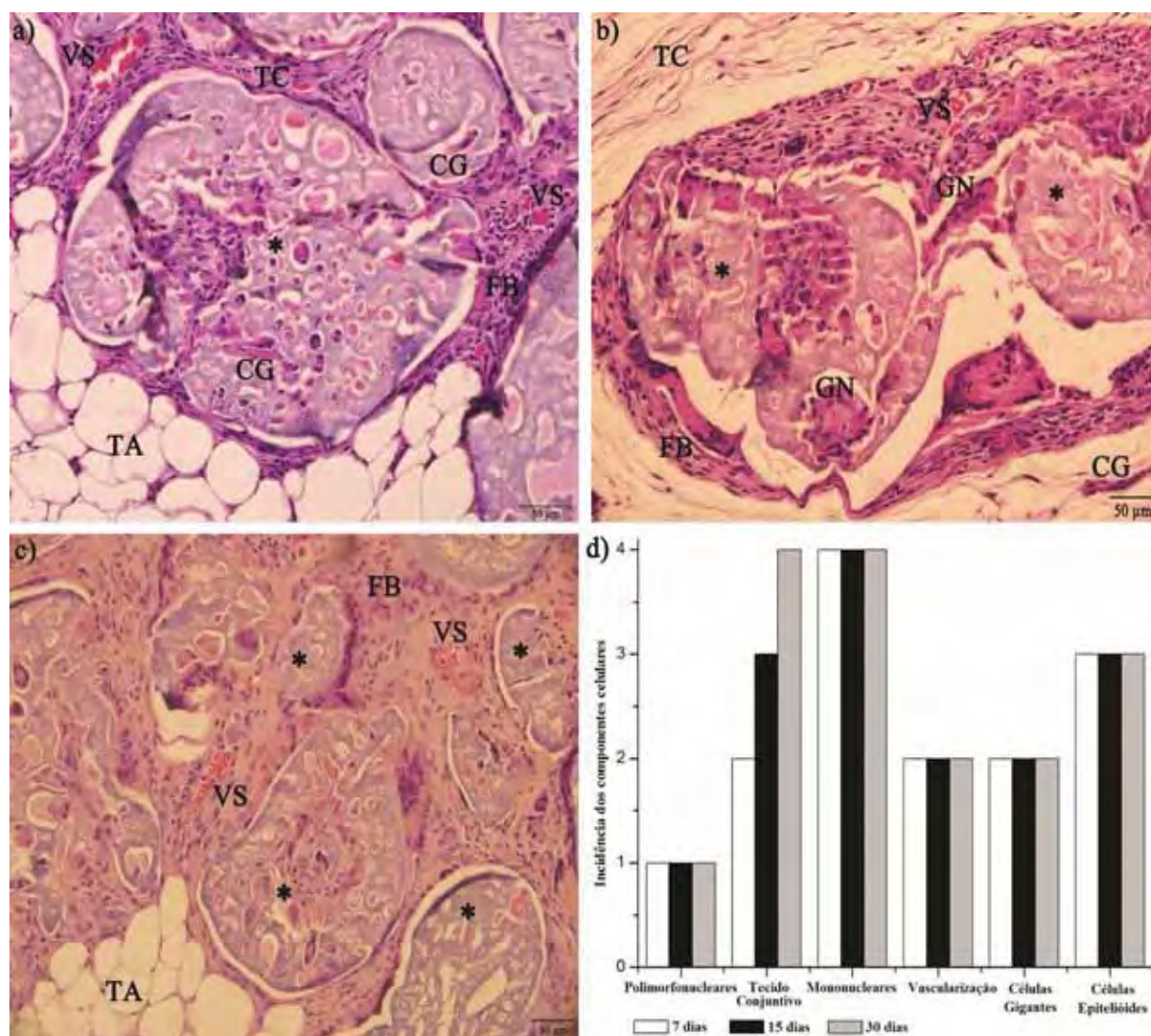
* Partículas de PVA; VS: vasos sanguíneos (vascularização); PM: polimorfonucleares; GN: granuloma; TC: tecido conjuntivo; TA: tecido adiposo; CL: colágeno; TM: tecido muscular. Coloração hematoxilina-eosina (HE), aumento de 40X.

Figura 29: Comparação entre reação inflamatória para as partículas do grupo 1 (4 mol/L) após diferentes períodos de permanência nos animais. (a) 7 dias; (b) 15 dias; (c) 30 dias; (d) Intensidades para cada período. Em todos os períodos houve encapsulamento das partículas, indicado pelas setas. A reação inflamatória evoluiu de um granuloma, aos 7 e 15 dias, para colágeno após 30 dias de permanência nos ratos.

Espaços vazios foram cercados por reação inflamatória que evoluiu para um granuloma, delimitado por tecido conjuntivo e inicialmente composto por fibroblastos e fibrócitos, substituído por colágeno após 30 dias de permanência das partículas. Os animais exibiram baixa reação inflamatória, caracterizada por leve infiltrado polimorfonuclear. Foi

observada discreta presença de células gigantes e moderada ocorrência de células epitelióides, típicas de reações de hipersensibilidade granulomatosa. Estas células podem sugerir a presença de macrófagos ativados como resultado da estimulação antigênica prolongada.

As partículas do grupo 2 (saponificação com 25 mol/L de NaOH) permaneceram agregadas ao tecido após o processamento histológico em todos os períodos analisados. O tecido conjuntivo proliferado infiltrou-se nas partículas, como ilustra a figura 30:



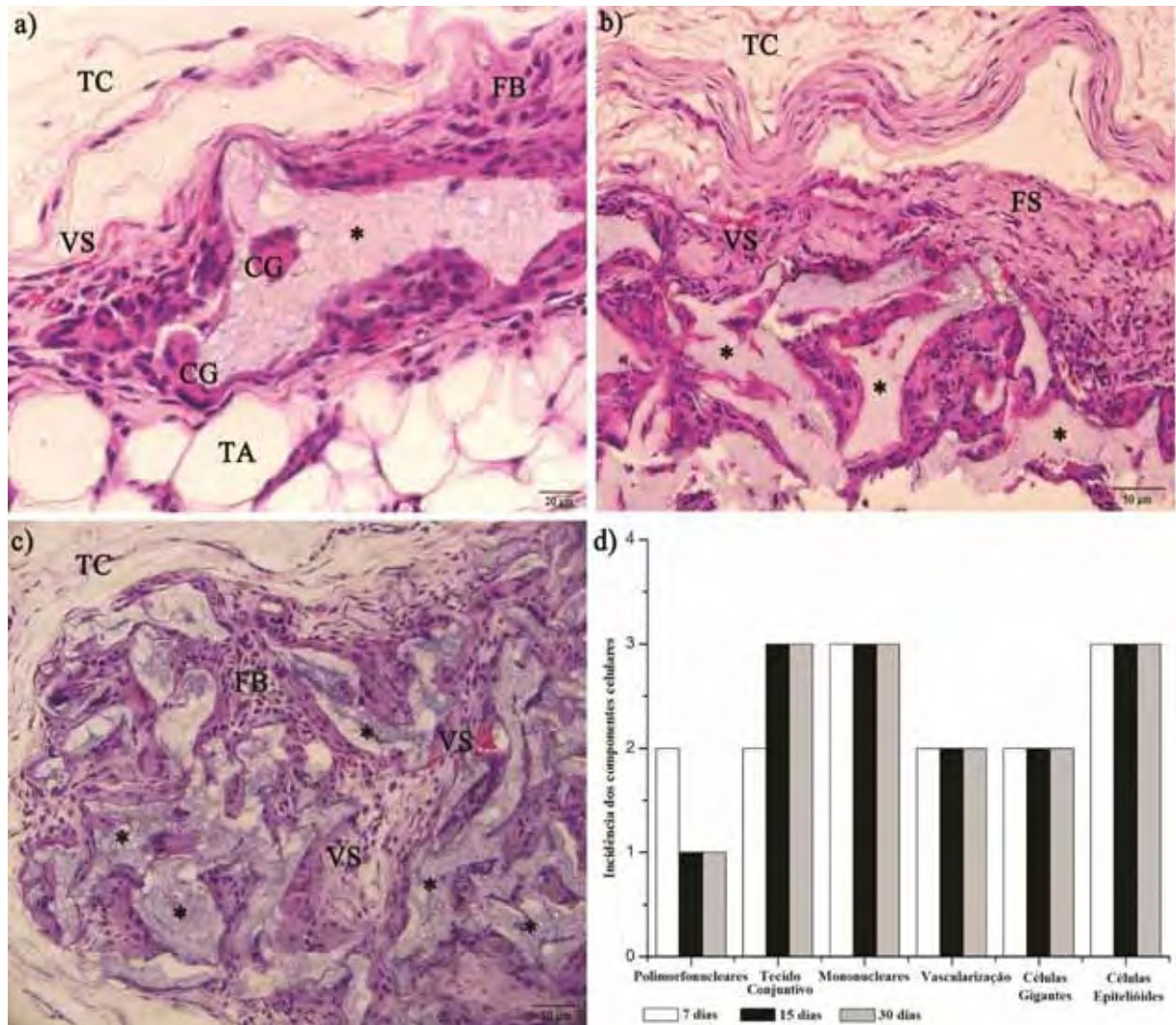
* Partículas de PVA; VS: vasos sanguíneos (vascularização); FB: fibroblastos; CG: células gigantes; GN: granuloma; TA: tecido adiposo; TC: tecido conjuntivo. Coloração hematoxilina-eosina (HE), aumento de 40X.

Figura 30: Comparação entre reação inflamatória para as partículas do grupo 2 (25 mol/L) após diferentes períodos de permanência nos animais. (a) 7 dias; (b) 15 dias; (c) 30 dias; (d) Intensidades para cada período. Observa-se infiltração do tecido conjuntivo nas partículas em todos os períodos analisados, além da presença de células mononucleares e células gigantes multinucleadas.

As partículas deste grupo apresentaram coloração basofílica e entremeadas a estruturas esféricas acidofílicas. A reação inflamatória ao redor das partículas mostrou-se constituída por infiltrado mononuclear, observada em todos os períodos de avaliação, caracterizada pela

acentuada presença de linfócitos e macrófagos após 30 dias do implante. Além disso foi observada presença discreta de células gigantes multinucleadas associadas à proliferação conjuntivo-vascular em todos os períodos analisados.

As partículas do grupo 3 apresentaram reação inflamatória circunjacente, constituída por células gigantes multinucleadas associadas com infiltrado histoplasmocitário e tecido conjuntivo, como mostra a figura 31.



* Partículas de PVA; VS: vasos sanguíneos (vascularização); CG: células gigantes; TA: tecido adiposo; TC: tecido conjuntivo; FB: fibroblastos; FS: fibrose. Coloração hematoxilina-eosina (HE), aumento de 40X.

Figura 31: Comparação entre reação inflamatória para as partículas do grupo 3 (comerciais) após diferentes períodos de permanência nos animais. (a) 7 dias; (b) 15 dias; (c) 30 dias; (d) Intensidades para cada período. As partículas apresentaram reação inflamatória constituída por células gigantes multinucleadas associadas com infiltrado histoplasmocitário e tecido conjuntivo.

Os tecidos subcutâneos analisados após 30 dias de implante apresentaram necrose de coagulação em associação à mineralização focal, traduzido por conteúdo basofílico granular. A amplitude da reação inflamatória foi similar à apresentada pelas partículas do grupo 2, porém mais intensa quando comparadas com as partículas do grupo 1.

3.3. Dimensão fractal e entropia de Shannon

Inicialmente são apresentados e discutidos os resultados para dimensão fractal e entropia de Shannon das partículas de PVA antes do implante subcutâneo. A abordagem dos resultados para os tecidos celulares subcutâneos foi dividida em duas partes: primeiramente dar-se-á a discussão do *comportamento dos tecidos celulares subcutâneos nos diferentes períodos de permanência das partículas nos ratos*. Posteriormente, são discutidas as *diferenças entre os tecidos que receberam as partículas e a comparação com o tecido subcutâneo do animal controle (não foi submetido ao implante das partículas de PVA)*.

3.3.1. Dimensão fractal e entropia de Shannon antes do implante subcutâneo

A tabela 3 descreve os resultados obtidos para dimensão fractal e entropia de Shannon das partículas de PVA antes de serem implantadas nos ratos (resultados de MEV), assim como a comparação estatística entre os valores obtidos calculada pelo teste de *Tukey-Kramer*. Os resultados descritos na tabela 3, para os diferentes aumentos utilizados, também são apresentados nos gráficos *box-plot* das figuras 32 e 33.

Tabela 3: Resultados para dimensão fractal, entropia de Shannon e comparação estatística entre os valores obtidos para as partículas de PVA antes do implante subcutâneo.

Dimensão fractal									
Aumento 50X	Nº imagens	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil inferior	Mediana	Quartil superior	Máximo	4 mol/L X 25 mol/L
4 mol/L	12	1,420	0,073	1,224	1,398	1,437	1,458	1,504	0,0006
25 mol/L	06	1,593	0,097	1,462	1,556	1,566	1,667	1,739	
Aumento 100X									
4 mol/L	06	1,357	0,101	1,207	1,235	1,402	1,432	1,449	< 0,0001
25 mol/L	06	1,726	0,043	1,688	1,696	1,705	1,773	1,788	
Entropia de Shannon									
Aumento 50X									
4 mol/L	12	0,403	0,075	0,280	0,349	0,395	0,468	0,500	0,7815
25 mol/L	06	0,393	0,057	0,333	0,336	0,391	0,440	0,470	
Aumento 100X									
4 mol/L	06	0,370	0,088	0,269	0,276	0,370	0,458	0,477	0,8196
25 mol/L	06	0,358	0,086	0,245	0,306	0,345	0,422	0,487	

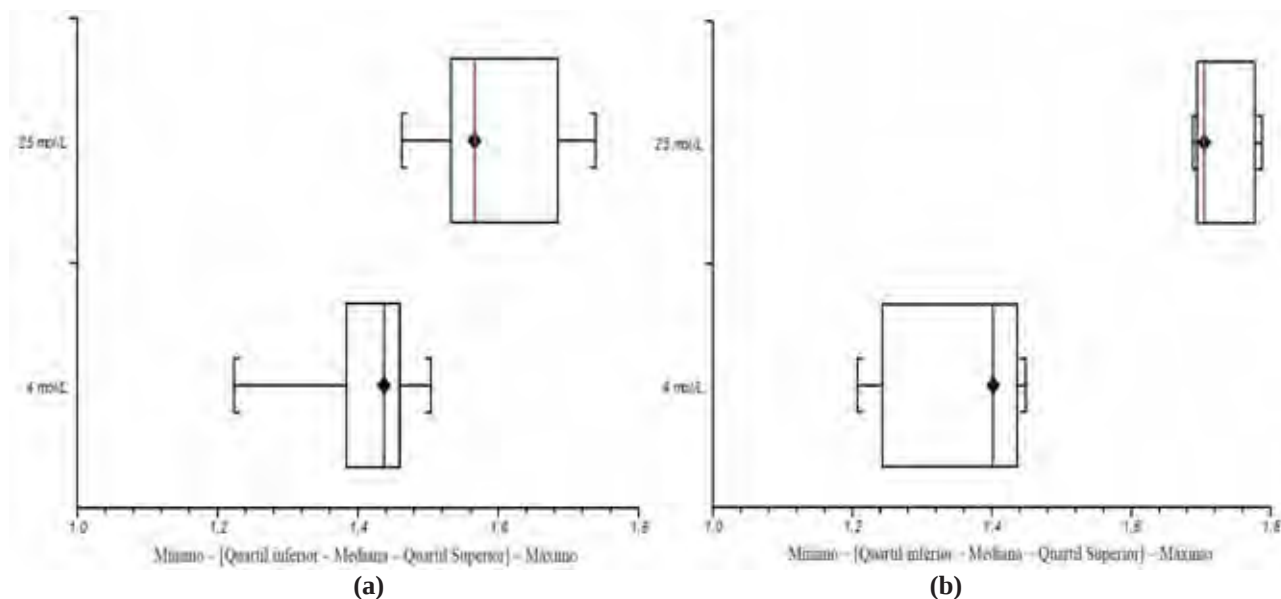


Figura 32: Gráfico *box-plot* para dimensão fractal das partículas de PVA antes do implante subcutâneo (resultados de MEV): **(a)** aumento 50X e **(b)** aumento 100X.

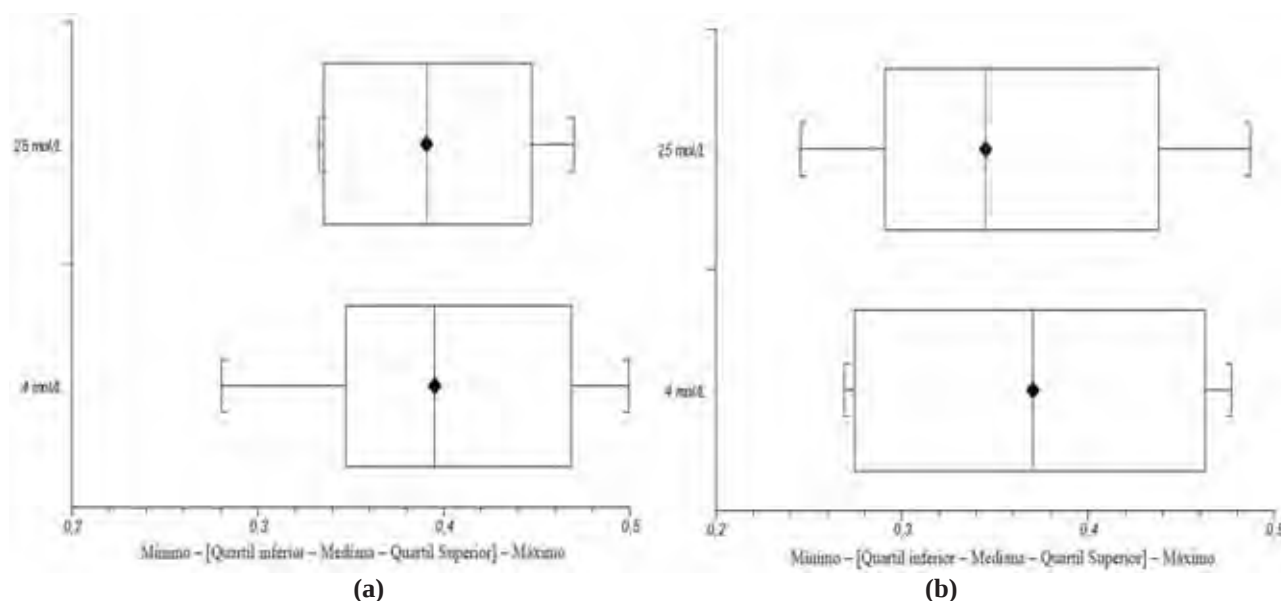


Figura 33: Gráfico *box-plot* para entropia de Shannon das partículas de PVA antes do implante subcutâneo (resultados de MEV): **(a)** aumento 50X e **(b)** aumento 100X.

Os resultados apresentaram diferença estatística significativa para os dois aumentos utilizados. As microesferas com maior cristalinidade (saponificação com 25 mol/L de solução alcalina) obtiveram valores superiores para dimensão fractal. Esse comportamento é justificado pela irregularidade superficial apresentada por essa partícula, superior quando comparada com a partícula amorfa (figura 28), pois a dimensão fractal pode ser compreendida como uma “quantificação de irregularidades presentes em contornos/objetos complexos”. Observados em diferentes ampliações, objetos mais complexos/irregulares revelam maior quantidade de detalhes mensuráveis quando comparados com objetos menos

complexos/irregulares. A geometria fractal também descreve que a dimensionalidade está relacionada com a capacidade de preenchimento espacial apresentado por um objeto/imagem: objetos mais complexos (e assim, mais fractais) preenchem determinada região espacial mais acentuadamente quando comparados com objetos menos complexos (LANDINI, 2011). Dessa forma, isso ainda indica que as partículas cristalinas possuem maior capacidade de ocupação espacial quando comparadas com as partículas amorfas.

Quanto aos resultados para entropia de Shannon, os valores não apresentaram diferença estatística significativa nos dois aumentos analisados. Diferentemente do comportamento observado para dimensão fractal, as partículas possuem entropias completamente similares, com pequena superioridade dos resultados obtidos para as partículas amorfas. A entropia está associada com a regularidade e homogeneidade de um sistema: baixos valores para entropia indicam maior previsibilidade de ocorrência dos eventos associados à esse sistema (LARSEN, GALLETLY, 2001). Assim, a superfície irregular apresentada pela partícula cristalina justifica os valores inferiores obtidos para entropia de Shannon: quando comparada com as características da partícula amorfa, a irregularidade superficial dessa partícula implica em maiores quantidades de pixels com tonalidade escura (resultados de MEV da figura 20). Como a entropia de Shannon consiste de uma função de densidade que representa a distribuição dos valores assumidos pelas intensidades desses pixels, a maior probabilidade de ocorrência de pixels nos resultados de MEV resulta em valores levemente inferiores para entropia das partículas cristalinas. Assim, embora apresentem maior irregularidade superficial, a entropia de Shannon indica que essas partículas formam um sistema menos desordenado quando comparado com as partículas amorfas.

3.3.2. Dimensão fractal e entropia de Shannon para os tecidos celulares subcutâneos

Todos os resultados para os cálculos de dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos encontram-se no apêndice A. Nas tabelas 4 e 5 são apresentados os valores obtidos para os tecidos subcutâneos nos diferentes períodos de permanência das partículas nos ratos. As tabelas 6 e 7 descrevem os resultados da análise estatística comparativa para cada partícula conforme os períodos: os valores em vermelho indicam que os resultados não apresentaram diferença estatística significativa (ANOVA: *Analysis of Variance* $P \geq 0,05$) enquanto que os dados descritos em verde apontam diferença estatística significativa entre os resultados analisados. As figuras 34 e 35 mostram os gráficos *box-plot* para os resultados descritos no apêndice A.

Tabela 4: Dimensão fractal para os tecidos celulares subcutâneos nos diferentes períodos de permanência das partículas nos ratos.

Aumentos	Tecidos subcutâneos	7 dias	15 dias	30 dias
Aumento 4X	Controle	1,537 ± 0,052	1,537 ± 0,052	1,537 ± 0,052
	4 mol/L	1,530 ± 0,022	1,604 ± 0,026	1,373 ± 0,083
	25 mol/L	1,652 ± 0,016	1,613 ± 0,054	1,614 ± 0,031
	Comercial	1,638 ± 0,010	1,601 ± 0,006	1,556 ± 0,056
Aumento 10X	Controle	1,488 ± 0,117	1,488 ± 0,117	1,488 ± 0,117
	4 mol/L	1,387 ± 0,064	1,476 ± 0,043	1,324 ± 0,062
	25 mol/L	1,500 ± 0,045	1,561 ± 0,049	1,564 ± 0,116
	Comercial	1,426 ± 0,038	1,548 ± 0,027	1,519 ± 0,026
Aumento 20X	Controle	1,367 ± 0,094	1,367 ± 0,094	1,367 ± 0,094
	4 mol/L	1,337 ± 0,070	1,356 ± 0,050	1,322 ± 0,065
	25 mol/L	1,420 ± 0,041	1,468 ± 0,044	1,491 ± 0,070
	Comercial	1,335 ± 0,034	1,410 ± 0,030	1,488 ± 0,030
Aumento 40X	Controle	1,268 ± 0,107	1,268 ± 0,107	1,268 ± 0,107
	4 mol/L	1,274 ± 0,060	1,291 ± 0,041	1,311 ± 0,050
	25 mol/L	1,318 ± 0,038	1,348 ± 0,033	1,391 ± 0,038
	Comercial	1,308 ± 0,023	1,314 ± 0,042	1,403 ± 0,027

Tabela 5: Entropia de Shannon para os tecidos celulares subcutâneos nos diferentes períodos de permanência das partículas nos ratos.

Aumentos	Tecidos subcutâneos	7 dias	15 dias	30 dias
Aumento 4X	Controle	0,376 ± 0,071	0,376 ± 0,071	0,376 ± 0,071
	4 mol/L	0,239 ± 0,040	0,330 ± 0,039	0,183 ± 0,056
	25 mol/L	0,368 ± 0,049	0,364 ± 0,051	0,360 ± 0,038
	Comercial	0,278 ± 0,005	0,278 ± 0,005	0,337 ± 0,016
Aumento 10X	Controle	0,367 ± 0,066	0,367 ± 0,066	0,367 ± 0,066
	4 mol/L	0,231 ± 0,050	0,255 ± 0,055	0,191 ± 0,095
	25 mol/L	0,314 ± 0,047	0,400 ± 0,053	0,348 ± 0,083
	Comercial	0,259 ± 0,044	0,349 ± 0,018	0,381 ± 0,045
Aumento 20X	Controle	0,386 ± 0,108	0,386 ± 0,108	0,386 ± 0,108
	4 mol/L	0,206 ± 0,053	0,204 ± 0,049	0,152 ± 0,041
	25 mol/L	0,312 ± 0,050	0,374 ± 0,060	0,366 ± 0,055
	Comercial	0,257 ± 0,022	0,395 ± 0,046	0,392 ± 0,050
Aumento 40X	Controle	0,380 ± 0,104	0,380 ± 0,104	0,380 ± 0,104
	4 mol/L	0,208 ± 0,046	0,242 ± 0,070	0,197 ± 0,048
	25 mol/L	0,350 ± 0,063	0,371 ± 0,064	0,383 ± 0,044
	Comercial	0,361 ± 0,025	0,410 ± 0,023	0,391 ± 0,021

Tabela 6: Análise estatística comparativa para dimensão fractal e entropia de Shannon – resultados para cada partícula nos diferentes períodos de permanência nos ratos.

	Aumento 4X		Aumento 10X		Aumento 20X		Aumento 40X	
	DF	ES	DF	ES	DF	ES	DF	ES
4 mol/L								
7d X 15d	0,0013	0,0002	0,0001	0,5307	0,7191	0,9997	0,7653	0,4224
7d X 30d	< 0,0001	0,0356	0,0094	0,1214	0,8509	0,0149	0,1522	0,9539
15d X 30d	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0028	0,2513	0,0193	0,6597	0,1752
25 mol/L								
7d X 15d	0,0671	0,9988	0,0398	< 0,0001	0,0272	0,0059	0,2396	0,7880
7d X 30d	0,0787	0,9858	0,0283	0,1703	0,0003	0,0201	< 0,0001	0,4557
15d X 30d	0,9999	0,9974	0,9993	0,0088	0,5153	0,9772	0,0384	0,9481
Comercial								
7d X 15d	0,3493	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	0,0047	< 0,0001	0,9940	0,3285
7d X 30d	< 0,0001	0,0032	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,4646
15d X 30d	0,1966	0,0592	0,6759	0,3113	0,0019	0,9991	0,0011	0,9088

* Os valores apresentados em vermelho referem-se à resultados que não apresentam diferença estatística significativa (ANOVA: *Analysis of Variance* $P \geq 0,05$). As análises comparativas foram realizadas pelo teste de *Tukey-Kramer*. *DF* = Dimensão fractal; *ES* = Entropia de Shannon.

Tabela 7: Análise estatística comparativa para dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos celulares subcutâneos – comparação entre as diferentes partículas implantadas nos ratos.

Dimensão fractal									
Aumentos	4 mol/L X Comercial			25 mol/L X Comercial			4 mol/L X 25 mol/L		
	7d	15d	30d	7d	15d	30d	7d	15d	30d
Aumento 4X	< 0,0001	0,9992	< 0,0001	0,6607	0,9547	0,0381	< 0,0001	0,9479	< 0,0001
Aumento 10X	0,1818	0,0437	< 0,0001	0,0007	0,9561	0,2048	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Aumento 20X	0,9996	0,1166	< 0,0001	< 0,0001	0,0558	0,9964	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Aumento 40X	0,1776	0,7832	< 0,0001	0,9385	0,5046	0,8790	0,0479	0,0072	< 0,0001
Entropia de Shannon									
Aumento 4X	0,1722	0,2698	< 0,0001	< 0,0001	0,0184	0,6082	< 0,0001	0,3235	< 0,0001
Aumento 10X	0,1824	< 0,0001	< 0,0001	0,0005	0,0588	0,3187	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Aumento 20X	0,0164	< 0,0001	< 0,0001	0,0099	0,8516	0,4624	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Aumento 40X	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,9586	0,6613	0,9813	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

* Os valores apresentados em vermelho referem-se à resultados que não apresentam diferença estatística significativa (ANOVA: *Analysis of Variance* $P \geq 0,05$). As análises comparativas foram realizadas pelo teste de *Tukey-Kramer*.

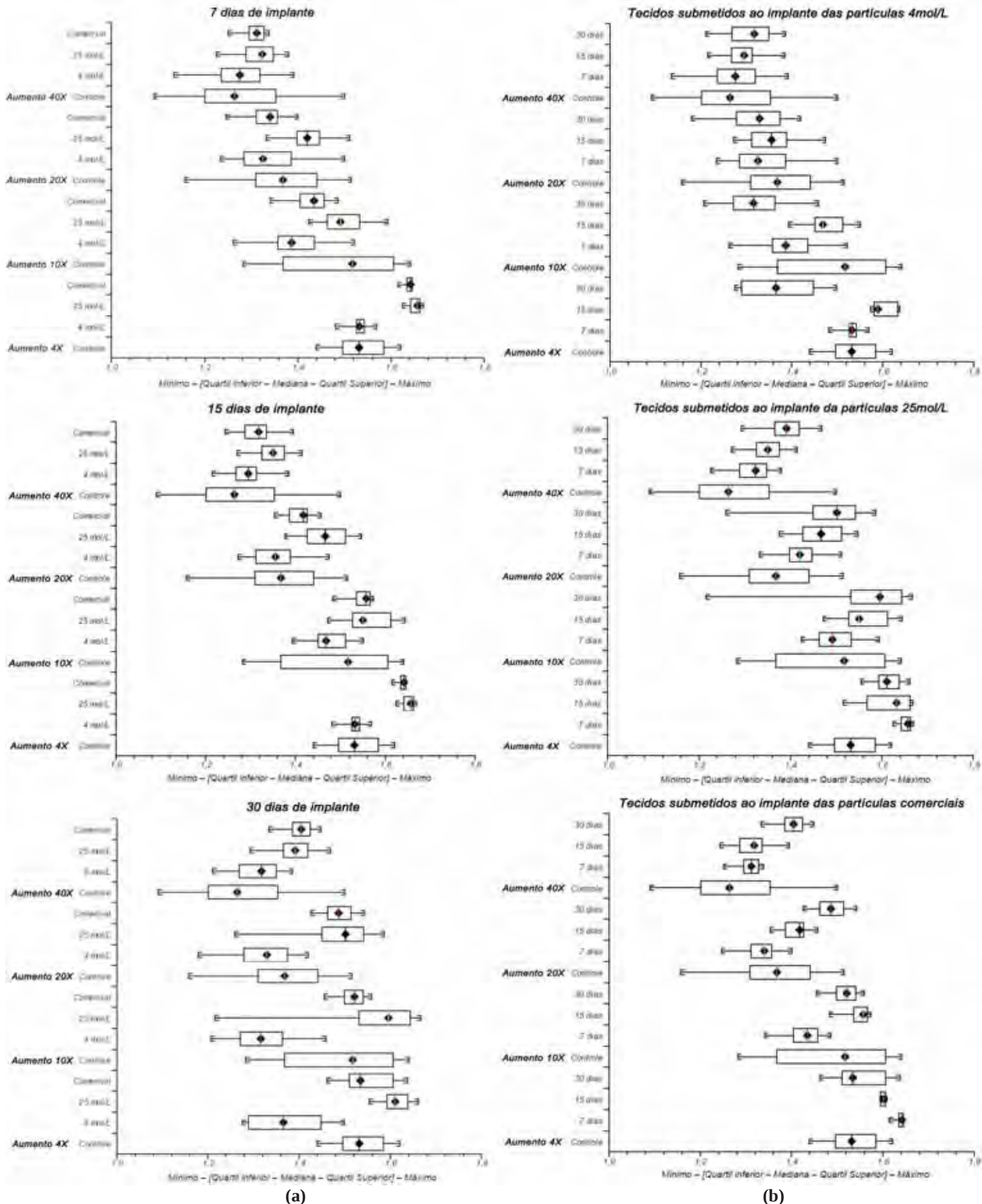


Figura 34: Gráfico *box-plot* para dimensão fractal dos tecidos subcutâneos. **(a)** Resultados agrupados por período de permanência nos ratos e **(b)** Valores para cada partícula nos diferentes períodos de permanência nos ratos.

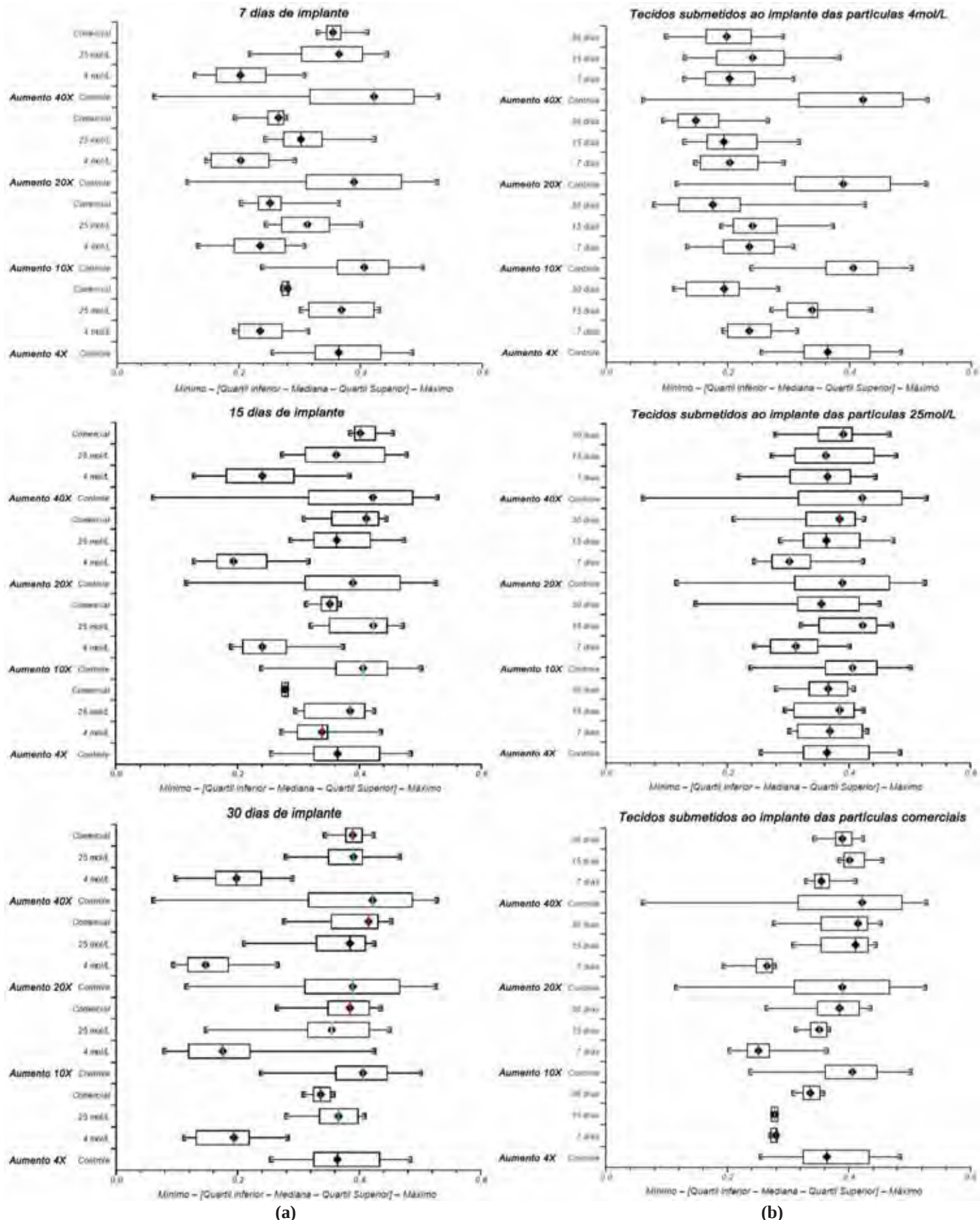


Figura 35: Gráfico *box-plot* para entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos. **(a)** Resultados agrupados por período de permanência nos ratos e **(b)** Valores para cada partícula nos diferentes períodos de permanência nos ratos.

Para a maioria das análises estatísticas comparativas, a discrepância foi menos intensa para os resultados obtidos com ampliações de 20X e 40X, como mostram as figuras 34 e 35. *Isso deve-se ao aumento na uniformidade dos tecidos celulares subcutâneos quando as imagens são obtidas para maiores escalas de ampliação. Esse comportamento está associado aos limites para auto-similaridade apresentado por objetos fractais.* Como exemplo estão os aspectos analisados em sistemas biológicos: os detalhes contidos nos tecidos celulares apresentam diferentes características conforme são observados em ampliações à níveis microscópicos, pois esse microambiente analisado consiste de uma representação espacial geométrica dada por um conjunto integrado de células que direcionam funções biológicas específicas. No estudo do câncer, essas considerações assumem extrema importância pois consiste de uma doença associada à desorganização de crescimento tecidual (DINICOLA et al., 2011). Dessa forma, o estudo de dimensão fractal deve ser antecedido pela escolha das escalas de ampliação devido às interações que ocorrem microscopicamente, as características específicas de cada “microambiente celular” e aos tamanhos dos componentes estruturais presentes em objetos/contornos fractais (LANDINI, 2011). Além disso, a partir de determinadas resoluções de observação (denominada “ampliação crítica”) a complexidade das estruturas desaparecem e os objetos/contornos fractais são considerados euclidianos (PAUMGARTNER et al., 1981).

Dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos sofreram alterações conforme o tempo de permanência das partículas nos ratos, como mostram as tabelas 4 e 5. Para a maioria dos aumentos e períodos, os resultados apresentaram comportamentos similares: há um acréscimo nos valores obtidos aos 15 dias, com posterior diminuição após 30 dias de permanência das partículas, como mostram as figuras 34b e 35b. *Esses resultados são justificados pelas mudanças qualitativas observadas nos tecidos subcutâneos como resposta à perturbação do sistema imunológico.* A rejeição do organismo à permanência das partículas foi caracterizada pela presença de células mononucleares, polimorfonucleares e células epitelióides nos primeiros dias após o implante. As intensidades variaram de acordo com as partículas implantadas (tabela 2) e apresentaram correlação satisfatória com os resultados de dimensão fractal e entropia de Shannon.

A diminuição nos valores para entropia de Shannon indica que houve aceitação do organismo ao implante, caracterizada pelo aumento na incidência de tecido conjuntivo e fibrose nos animais que receberam as três partículas (a intensidade variou conforme as partículas implantadas). Esse comportamento foi observado mais acentuadamente após 30

dias de permanência das partículas nos ratos. Apesar desse parâmetro estar associado somente à intensidade de luminosidade dos pixels das imagens, a entropia de Shannon possui relação direta com a entropia do sistema imunológico: *a diminuição da reação inflamatória, resultado da aceitação do organismo ao implante das partículas de PVA, reflete na homogeneização tecidual observada nos dados de microscopia ótica e quantificada nos resultados obtidos para entropia de Shannon (ROCHA et al., 2008)*. A tabela 6 ainda mostra que os valores apresentaram diferença estatística significativa na maioria dos períodos analisados, principalmente na comparação entre 7 dias e 30 dias de permanência das partículas nos ratos.

Quanto à diferenciação entre os tecidos que receberam as diferentes partículas, os resultados indicam a mesma tendência para análise de dimensão fractal e entropia de Shannon: os tecidos subcutâneos que receberam a partícula amorfa e comercial (tabela 7: 4 mol/L X Comercial) apresentaram valores estatisticamente diferentes somente após 30 dias do implante (a entropia de Shannon também apresentou diferença estatística aos 15 dias). As figuras 34a e 35a mostram que dimensão fractal e entropia de Shannon foram superiores para os tecidos que receberam a partícula comercial. Esse resultado pode ser explicado mediante análise do comportamento observado no estudo histopatológico: em todos os períodos analisados, *a partícula comercial resultou em intensidades ligeiramente superiores para reação inflamatória, principalmente após 30 dias do implante, devido à maior presença de plasmócitos, macrófagos e células epitelióides nos tecidos que receberam essas partículas*.

Os tecidos subcutâneos que receberam a partícula cristalina e a partícula comercial (tabela 7: 25 mol/L X Comercial) apresentaram dimensão fractal e entropia de Shannon similares na maioria dos aumentos considerados, com valores levemente superiores para os tecidos que receberam a partícula cristalina (figuras 34a e 35a). A análise histopatológica corrobora com esses resultados, sendo que as duas partículas induziram à quantidades similares de células inflamatórias na maioria dos períodos analisados. *A superioridade nos valores para os tecidos subcutâneos que receberam a partícula cristalina pode ser justificada pela maior incidência de células mononucleares nos três períodos de permanência das partículas nos ratos, assim como a acentuada presença de tecido conjuntivo após 30 dias do implante*.

A comparação entre os tecidos que receberam a partícula amorfa e cristalina (tabela 7: 4 mol/L X 25 mol/L) deixa evidente que tratam-se de microesferas com dimensão fractal e entropia de Shannon completamente diferentes, com superioridade dos valores para a

partícula cristalina (essa partícula também apresentou valores superiores para dimensão fractal antes do implante, como discutido na seção 3.3.1.). Esse comportamento corrobora com os resultados obtidos na análise histopatológica, sendo que a intensidade de reação inflamatória induzida por essas duas partículas apresentou notáveis diferenças: *as partículas cristalinas resultaram em maiores intensidades de reação inflamatória em todos os períodos analisados, formando um sistema mais “desordenado” e heterogêneo. Isso justifica os valores superiores para entropia de Shannon.*

A tabela 8 mostra a comparação estatística entre os resultados obtidos para os tecidos que receberam as diferentes partículas com relação ao tecido subcutâneo do animal controle:

Tabela 8: Análise estatística comparativa dos tecidos subcutâneos - animal controle e animais submetidos ao implante das partículas.

Dimensão fractal										
Aumentos	Modelo estatístico	Comercial X Controle			4 mol/L X Controle			25 mol/L X Controle		
		7d	15d	30d	7d	15d	30d	7d	15d	30d
Aumento 4X	Tukey-Kramer	< 0,0001	0,0295	0,7703	0,9302	0,0003	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0013
	Dunnet	< 0,0001	0,0171	0,6675	0,8856	0,0002	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0007
Aumento 10X	Tukey-Kramer	0,0061	0,1299	0,5354	< 0,0001	0,9126	< 0,0001	0,9272	0,0013	0,0066
	Dunnet	0,0032	0,0804	0,3960	< 0,0001	0,8607	< 0,0001	0,8722	0,0007	0,0035
Aumento 20X	Tukey-Kramer	0,2412	0,2730	< 0,0001	0,2901	0,9254	0,0670	0,0088	< 0,0001	< 0,0001
	Dunnet	0,1530	0,1843	< 0,0001	0,1889	0,8797	0,0381	0,0047	< 0,0001	< 0,0001
Aumento 40X	Tukey-Kramer	0,0789	0,2337	< 0,0001	0,9819	0,5266	0,0405	0,0173	< 0,0001	< 0,0001
	Dunnet	0,0453	0,1544	< 0,0001	0,9657	0,4044	0,0225	0,0093	< 0,0001	< 0,0001
Entropia de Shannon										
Aumentos	Modelo estatístico	Comercial X Controle			4 mol/L X Controle			25 mol/L X Controle		
		7d	15d	30d	7d	15d	30d	7d	15d	30d
Aumento 4X	Tukey-Kramer	< 0,0001	0,0041	0,1317	< 0,0001	0,0765	< 0,0001	0,9547	0,9210	0,8088
	Dunnet	< 0,0001	0,0022	0,0816	< 0,0001	0,0469	< 0,0001	0,9238	0,8797	0,7160
Aumento 10X	Tukey-Kramer	< 0,0001	0,0861	0,8236	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,9959	0,0532
	Dunnet	< 0,0001	0,0516	0,7204	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,9927	0,0299
Aumento 20X	Tukey-Kramer	< 0,0001	0,9876	0,9892	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	0,9069	0,6592
	Dunnet	< 0,0001	0,9785	0,9792	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,8524	0,5218
Aumento 40X	Tukey-Kramer	0,8011	0,8102	0,9479	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,4967	0,9834	0,9984
	Dunnet	0,6905	0,7202	0,9062	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,3600	0,9714	0,9969

* Os valores apresentados em vermelho referem-se à resultados que não apresentam diferença estatística significativa (ANOVA: *Analysis of Variance* $P \geq 0,05$). As análises comparativas foram realizadas pelo teste de *Tukey-Kramer*.

Os resultados para dimensão fractal e entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos que receberam as partículas com relação ao animal controle apresentaram comportamentos completamente diferentes. Embora os valores foram similares estatisticamente (tabela 8: Comercial X Controle), a figura 34a mostra que os tecidos que receberam a partícula comercial apresentaram dimensão fractal levemente superior aos tecidos subcutâneos do animal controle. Quanto aos resultados obtidos para entropia de Shannon, os tecidos subcutâneos do animal controle apresentaram valores superiores na maioria dos períodos e aumentos (figura 35a).

Para os tecidos que receberam a partícula amorfa, os resultados obtidos para dimensão fractal apresentaram diferença estatística somente após 30 dias do implante (tabela 8: 4 mol/L X Controle) com valores inferiores para os tecidos que receberam essa partícula (figura 34a). A similaridade com relação ao animal controle nos 15 primeiros dias de permanência nos animais pode ser justificada pela baixa presença de reação inflamatória apresentada nesse período (tabela 2 e figura 29). Porém, após 30 dias do implante, essas partículas induziram ao aumento de tecido conjuntivo caracterizado pela presença de colágeno e fibrose, resultando em diferentes valores para dimensão fractal. Assim como observado para os tecidos que receberam a partícula comercial, os resultados obtidos para entropia de Shannon são completamente diferentes: os tecidos que receberam as partículas amorfas apresentaram valores inferiores para todos os aumentos e períodos analisados.

A comparação estatística entre os resultados obtidos para dimensão fractal dos tecidos subcutâneos do animal controle e dos animais que receberam a partícula cristalina (tabela 8: 25 mol/L X Controle) não deixa dúvidas que são estatisticamente diferentes, com dimensão fractal superior dos tecidos que receberam essa partícula em todos os períodos e aumentos analisados (figura 34a). Quanto ao comportamento observado para entropia de Shannon, os valores obtidos foram estatisticamente iguais para maioria dos aumentos e períodos considerados, com superioridade nos valores obtidos para os tecidos subcutâneos do animal controle (figura 35a).

A superioridade nos valores para entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos do animal controle deve-se à problemas no processamento histológico: houve separação entre as camadas de tecido epitelial e muscular. Isso resultou em espaçamentos e interstícios que foram registrados nos resultados de microscopia ótica (figura 24), refletindo em menores quantidades de pixels nas imagens e valores superiores para entropia de Shannon. *Dessa forma, a superioridade nos resultados obtidos não indica que trata-se de um sistema mais*

“desordenado”, pois isso entraria em conflito com os aspectos observados na análise histopatológica. Os resultados observados para os tecidos subcutâneos do animal controle evidenciam a necessidade de cuidados na preparação das amostras analisadas, pois problemas nessa etapa interferem diretamente na obtenção de dados confiáveis e, conseqüentemente, na interpretação segura dos resultados.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida para síntese de microesferas de PVA/PVAc por reação de polimerização em suspensão seguida pela etapa de saponificação mostrou-se eficaz, quando são considerados os dados para partículas disponíveis comercialmente e resultados reportados na literatura. A concentração de solução alcalina exerce forte influência na estrutura, coloração e características superficiais do polímero obtido: a cristalinidade aumenta consideravelmente com a concentração de solução alcalina usada na saponificação. Todas as amostras sintetizadas apresentaram morfologia esférica, sugerindo que essa característica é obtida na polimerização, não sofrendo alteração no processo de saponificação polimérica.

As microesferas com alta cristalinidade induziram à reação inflamatória similar ao comportamento observado para as partículas comerciais, enquanto que as partículas com menor cristalinidade resultaram em baixa intensidade de reação inflamatória no tecido celular subcutâneo dos ratos. Assim, as partículas amorfas são menos reativas ao tecido subcutâneo dos ratos quando comparadas com partículas disponíveis comercialmente.

As partículas cristalinas obtiveram valores superiores para dimensão fractal, justificados pela maior irregularidade superficial quando comparada com as características superficiais da partícula amorfa. Quanto aos resultados para entropia de Shannon, os valores obtidos para a partícula amorfa e cristalina não apresentaram diferença estatística significativa, com pequena superioridade nos valores obtidos para as partículas amorfas. Assim, embora apresente maior irregularidade superficial, a entropia de Shannon indica que as partículas cristalinas formam um sistema menos desordenado quando comparado com as partículas amorfas.

Dimensão fractal e entropia de Shannon sofreram alterações conforme o tempo de permanência das partículas nos ratos. Esse comportamento foi satisfatório do ponto de vista clínico, pois corrobora com as mudanças qualitativas observadas nos tecidos subcutâneos como resposta à perturbação do sistema imunológico devido ao implante das partículas. A intensidade de reação inflamatória induzida por cada partícula também apresentou correlação com os parâmetros observados na análise histopatológica: os tecidos subcutâneos que receberam as partículas cristalinas apresentaram dimensão fractal e entropia de Shannon significativamente maiores que os resultados obtidos para as partículas amorfas. Com relação aos tecidos que receberam a partícula cristalina e comercial, os resultados foram similares estatisticamente, corroborando com o aspecto observado na análise histopatológica.

CAPÍTULO V – PERSPECTIVAS

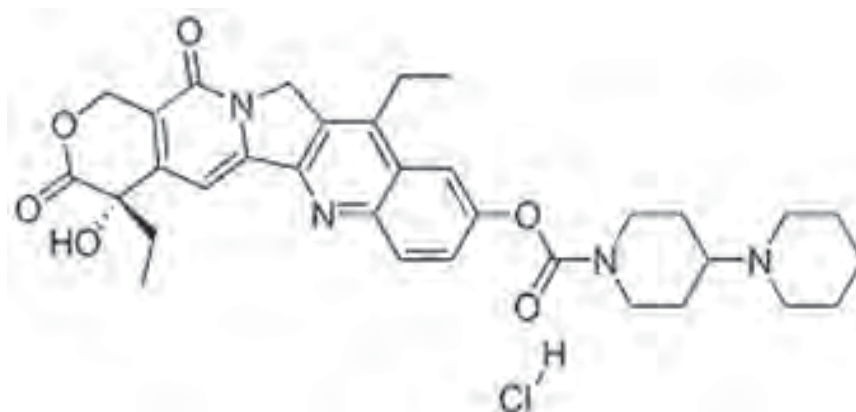
As perspectivas para continuidade do projeto estão condicionadas à execução das seguintes etapas:

5.1. Suspensão e liberação das microesferas de PVA/PVAc

A avaliação da capacidade de suspensão (fluxo das partículas) e liberação via cateter das microesferas de PVA/PVAc é importante para garantir que sua manipulação e injeção não apresentarão dificuldades, como a oclusão do cateter durante o procedimento de embolização e/ou quimioembolização. Para avaliação da característica de suspensão será utilizado 1 mL das microesferas misturadas à 6 mL de meio de contraste radiopaco, diluído em solução salina, em uma seringa de 10 mL. A mistura será feita usando-se uma válvula de três vias, injetada em um cateter ou microcateter adequado, de lúmen pelo menos 15% maior que o diâmetro das microesferas, sendo que o procedimento será considerado satisfatório se permanecerem suspensas pelo tempo mínimo de um minuto.

5.2. Funcionalização química das microesferas com o fármaco *Irinotecano*

A funcionalização química das microesferas de PVA/PVAc com o fármaco *Cloridrato de Irinotecano* (figura 36) será realizada visando à utilização das partículas em procedimentos de quimioembolização. O Cloridrato de Irinotecano é indicado, como agente único ou combinado, em tratamentos de várias neoplasias: carcinoma do reto, sistema gastrointestinal, mama, pulmão, colo de útero e ovário (TAYLOR et al., 2007). A funcionalização das microesferas será feita mediante interação dos grupos químicos funcionais que caracterizam as partículas e o grupo químico funcional das drogas.



5.2.1. Determinação do nível de carregamento

O carregamento das microesferas com a droga quimioterápica será realizado mediante imersão das partículas em solução com concentração pré-estabelecida da droga, sob condições controladas (temperatura, umidade e luminosidade). A concentração de droga na solução, relacionada com o tempo de permanência das partículas no meio, será quantificada mediante análise do espectro de absorção na região do ultravioleta (UV) comparado com a curva inicial da solução de droga. Durante o período de carregamento serão avaliados o tamanho e aparência das microesferas com auxílio de um microscópio ótico equipado com sistema digital para aquisição de imagens, adquiridas em intervalos de tempo pré-determinados e comparados ao longo de todo o período de carregamento.

5.2.2. Liberação da droga *in vitro*

A liberação da droga contida nas microesferas será avaliada sob diferentes condições: partículas imersas em água pura, meio de contraste, solução salina e tampão (*phosphate buffer saline solution* - *PBS*). Para cada 200 mL do meio escolhido (exceto para o meio de contraste), 1 mL de partículas serão depositadas e mantidas sob lenta agitação. A liberação da droga em meio de contraste será realizada utilizando-se 1 mL de partículas, diluídas em 1 mL de solução salina e 2 mL de contraste radiopaco, misturados em uma válvula de três vias. Em períodos pré-determinados, alíquotas serão retiradas e analisadas sob espectroscopia UV.

5.2.3. Avaliação da compressibilidade das microesferas

A compressibilidade das microesferas será avaliada em dois momentos: antes e após o carregamento com a droga quimioterápica. As partículas serão distribuídas sobre uma superfície uniforme com área conhecida, cobertas com uma placa e submetidas à pressão. A compressibilidade das microesferas está relacionada com o deslocamento da placa após a aplicação de pressão. Essa avaliação é necessária para determinar se as partículas carregadas mantêm o grau de compressibilidade e características que facilitam sua liberação através do cateter ou microcateter, sem comprometimento de sua capacidade de embolização.

5.3. Experimentos *in vivo* com as microesferas de PVA/PVAc

Os experimentos *in vivo* (embolização) com as microesferas de PVA/PVAc serão realizados utilizando-se 48 fêmeas de coelhos albinos da raça *New Zealand*, com massa

corporal entre 2,5 kg e 3,0 kg. O projeto foi submetido e aprovado pelo CEEA da FAMERP (parecer da comissão encontra-se no anexo C). Será desenvolvido no Centro de Cirurgia Experimental da empresa *Braile Biomédica*, sendo que os animais receberão cuidados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA.

Os objetivos dos experimentos serão: (a) implantar microesferas de PVA/PVAc com diferentes graus de cristalinidade (diâmetro entre 100 μm e 300 μm) e partículas não-esféricas (comerciais) na artéria renal direita dos coelhos, com o intuito de promover a embolização vascular renal; (b) avaliar e comparar as características dos rins pós-embolização. Os animais serão divididos em quatro grupos de 12 animais (um grupo para cada tipo de agente embólico e outro grupo de simulação para controle da técnica de cateterização) e mantidos em gaiolas individuais por períodos pré-determinados (2, 10 e 30 dias). Posteriormente, serão anestesiados e sacrificados para retirada de ambos os rins (embolizado e contralateral).

REFERÊNCIAS

- ADAMI, C. What is complexity? **BioEssays**, v. 24, p. 1085-1094, 2002.
- ANDERSON, D. M.; KEITH, J.; NOVAK, P. D.; ELLIOTT, M. A. **Dorland's Illustrated Medical Dictionary**. 28 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., p. 78, 1994.
- ANIMAL HEALTH INSTITUTE. **Industry Statistics**. Disponível em: <http://www.ahi.org/about-animal-medicines/industry-statistics/>. Acesso em 21/08/2011.
- BANDI, R.; SHETTY, P. C.; SHARMA, R. P.; BURKE, T. H.; BURKE, M. W.; KASTAN, D. Superselective Arterial Embolization for the Treatment of Lower Gastrointestinal Hemorrhage. **J Vasc Interv Radiol**, v. 12, p. 1399-1405, 2001.
- BAISH, J. W.; JAIN, R. K. Fractals and Cancer. **Cancer Research**, v. 60, p. 3683-3688, 2000.
- BENDSZUS, M.; KLEIN, R.; BURGER, R.; WARMUTH-METZ, M.; HOFMANN, E.; SOLYMOSI, L. Efficacy of Trisacryl Gelatin Microspheres versus Polyvinyl Alcohol Particles in the Preoperative Embolization of Meningiomas. **Am J Neuroradiol**, v. 121, p. 255-261, 2000.
- BILHIM, T.; PISCO, J. M.; DUARTE, M.; OLIVEIRA, A. G. Polyvinyl Alcohol Particle Size for Uterine Artery Embolization: A Prospective Randomized Study of Initial Use of 350-500µm Particles versus Initial Use of 500-700 µm Particles. **J Vasc Interv Radiol**, v. 22, n. 1, p. 21-27, 2011.
- BIOSPHERE MEDICAL. **Investment Considerations**. Disponível em: http://www.faqs.org/sec-filings/100111/BIOSPHERE-MEDICAL-INC-8-K/a101562_1ex99d1.htm. Acesso em 28/06/2011.
- BIZZARRI, M.; GIULIANI, A.; CUCINA, A.; ANSELM, F. D.; SOTO, A. M.; SONNENSCHN, C. Fractal analysis in a systems biology approach to cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 21, p. 175-182, 2011.
- BRONOWICKI, J.; BOUDJEMA, K.; CHONE, L.; NISAND, G.; BAZIN, C.; PFLUMIO, F.; UHL, G.; WENGER, J.; JAECK, D.; BOISSEL, P.; BIGARD, M. A.; GAUCHER, P.; VETTER, D.; DOFFOEL, M. Comparison of resection, liver transplantation and transcatheter Oily chemoembolization in the treatment of hepatocellular Carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 24, p. 293-300, 1996.
- CAMPBELL, F. E.; THOMAS, W. P.; MILLER, S. J.; BERGER, D.; KITTLESN, M. D. Immediate and Late Outcomes of Transarterial Coil Occlusion of Patent Ductus Arteriosus in Dogs. **J Vet Intern Med**, v. 20, p. 83-96, 2006.
- CROSS, S. S. Fractals in Pathology. **Journal of Pathology**, v. 182, p. 1-8, 1997.
- CULLITY, B. D. Diffraction I: directions of diffracted beams. In: _____. **Elements of X-Ray diffraction**. 2. ed. Indiana: Addison-Wesley, 1978, p. 81-107.

COFFEY, D. S. Self-organization, complexity and chaos: The new biology for medicine. **Nature Medicine**, v. 4, n. 8, p. 882-885, 1998.

DHANASEKARAN, R.; KOOBY, D. A.; STALEY, C. A.; KAUH, J. S.; KHANA, V.; KIM, H. S. Comparison of Conventional Transarterial Chemoembolization (TACE) and Chemoembolization With Doxorubicin Drug Eluting Beads (DEB) for Unresectable Hepatocellular Carcinoma (HCC). **Journal of Surgical Oncology**, v. 101, p. 476-480, 2010.

DINICOLA, S.; D'ANSELM, F.; PASQUALATO, A.; PROIETTI, A.; LISI, E.; CUCINA, A.; BIZZARRI, M. A Systems Biology Approach to Cancer: Fractals, Attractors, and Nonlinear Dynamics. **OMICS**, v. 12, n. 3, p. 93-104, 2011.

DODD, G. D.; SOULEN, M. C.; KANE, R. A.; LIVRAGHI, T.; LEES, W. R.; YAMASHITA, Y.; GILLAMS, A. R.; KARAHAN, O. I.; RHIM, H. Minimally Invasive Treatment of Malignant Hepatic Tumors: at the Threshold of a Major Breakthrough. **Imaging & Therapeutic Technology**, v. 20, n. 1, p. 9-27, 2000.

DOSHI, N.; ZAHR, A. S.; BHASKAR, S.; LAHANN, J.; MITRAGOTRI, S. Red blood cell mimicking synthetic biomaterial particles. **Proceed of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 106, n. 51, p. 21495-21499, 2009.

EDLUND, U.; ALBERTSSON, A. C. Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery. **Adv Polym Sci**, v. 157, p. 67-112, 2002.

FUHRMAN, S.; CUNNINGHAM, M. J.; WEN, X.; ZWEIGER, G.; SEILHAMER, J. J.; SOMOGYI, R. The application of Shannon entropy in the identification of putative drug targets. **BioSystems**, v. 55, p. 5-14, 2000.

FUJII, Y.; KEENE, B. W.; MATHEWS, K. G.; ATKINS, C. E.; DEFRANCESCO, T. C.; HARDIE, E. M.; WAKAO, Y. Coil Occlusion of Residual Shunts After Surgical Closure of Patent Ductus Arteriosus. **Vet Surg**, v. 35, p. 781-785, 2006.

GOUTZANIS, L.; PAPADOGEORGAKIS, N.; PAVLOPOULOS, P. M.; KATTI, K.; PETSINIS, V.; PLOCHORAS, I.; PANTELIDAKI, C.; KAVANTZAS, N.; PATSOURIS, E.; ALEXANDRIDIS, C. Nuclear fractal dimension as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 44, p. 345– 353, 2008.

HARNED, R. K.; THOMPSON, H. R.; KUMPE, D. A.; NARKEWICZ, M. R.; SOKOL, R. J. Partial Splenic Embolization in Five Children with Hypersplenism: Effects of Reduced-Volume Embolization on Efficacy and Morbidity. **Radiology**, v. 209, n. 3, p. 803-806, 1998.

HEYMANS, O.; FISSETTE, J.; VICO, P.; BLACHER, S.; MASSET, D.; BROUERS, F. Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? **Medical Hypotheses**, v. 54, n. 3, p. 360-366, 2000.

HONG, K.; KHWAJA, A.; LIAPI, E.; TORBENSON, M. S.; GEORGIADES, C. S.; GESCHWIND, J. F. H. New Intra-Arterial Drug Delivery System for the Treatment of Liver Cancer: Preclinical Assessment in a Rabbit Model of Liver Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 8, p. 2563-2567, 2006.

- JEON, G. S.; WON, J. H.; LEE, B. M.; KIM, J. H.; AHN, H. S.; LEE, E. J.; PARK, S.; PARK, S. W. The Effect of Transarterial Prostate Embolization in Hormone-induced Benign Prostatic Hyperplasia in Dogs: A Pilot Study. **J Vasc Interv Radiol**, v. 20, P. 384-390, 2009.
- KEDZIA, A.; RYBACZUK, M.; ANDRZEJAK, R. Fractal dimensions of human brain cortex vessels during the fetal period. **Med Sci Monit**, v. 8, n. 3, p. 46-51, 2002.
- KETTENBACH, L.; STADLER, A.; KATZLER, I.; SCHERNTHANER, R.; BLUM, M.; LAMMER, J.; RAND, T. Drug-Loaded Microspheres for the Treatment of Liver Cancer: Review of Current Results. **Cardiovasc Intervent Radiol**, v. 31, p. 468-476, 2008.
- KISILEVZKY, N. H.; MARTINS, M. S. Embolização Uterina para Tratamento de Mioma Sintomático. Experiência Inicial e Revisão da Literatura. **Radiol Bras**, v. 36, n. 3, p. 129-140, 2003.
- KOBAYASHI, K.; GUPTA, S.; TRENT, J. C.; VAUTHEY, J.; KRISHNAMURTHY, S.; ENSOR, J.; AHRAR, K.; WALLACE, M. J.; MODOFF, D. C.; MURTHY, R.; McRAE, S. E.; HICKS, M. E. Hepatic artery chemoembolization for 110 gastrointestinal stromal tumors: response, survival, and prognostic factors. **Cancer**, v. 107, n. 12, p. 2833-2841, 2006.
- LANDINI, G. Fractal in microscopy. **J Microsc**, v. 241, p. 1-8, 2011.
- LARSEN, P. D.; GALLETLY, D. C. Cardioventilatory coupling in heart rate variability: the value of standard analytical techniques. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 6, p. 821-826, 2001.
- LAURENT, A.; BEAUJEU, R.; WASSEF, M.; RÜFENACHT, D.; BOSCHETTI, E.; MERLAND, J. Trisacryl Gelatin Microspheres for Therapeutic Embolization, I: Development and In Vitro Evaluation. **Am J Neuroradiol**, v. 17, p. 533-540, 1996.
- LAURENT, A.; WASSEF, M.; MAURICE, J. S.; NAMUR, J.; PELAGE, J. P.; SERON, A.; CHAPOT, R.; MERLAND, J. Arterial Distribution of Calibrated Tris-Acryl Gelatin and Polyvinyl Alcohol Microspheres in a Sheep Kidney Model. **Investigative Radiology**, v. 41, n. 1, p. 8-14, 2006.
- LAURENT, A. Microspheres and Nonspherical Particles for Embolization. **Tech Vasc Intervent Radiol**, v. 10, p. 248-256, 2007.
- LAURENT, A.; PELAGE, J. P.; WASSEF, M.; MARTAL, J. Fertility after bilateral uterine artery embolization in a sheep model. **Fertility and Sterility**, v. 89, p. 1371-1383, 2008.
- LAURENT, A.; WASSEF, M.; NAMUR, J.; MARTAL, J.; LABARRE, D.; PELAGE, J. P. Recanalization and particle exclusion after embolization of uterine arteries in sheep: a long-term study. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 3, p. 884-892, 2009.
- LAURENT, A.; WASSEF, M.; NAMUR, J.; GHEGEDIBAN, H.; PELAGE, J. P. Arterial Distribution of Calibrated Tris-Acryl Gelatin and Polyvinyl Alcohol Embolization Microspheres in Sheep Uterus. **Cardiovasc Intervent Radiol**, v. 33, p. 995-1000, 2010.

- LEE, S. G.; KIM, J. P.; LYOO, W. S.; KWAK, J. W.; NOH, S. K.; PARK, C. S.; KIM, J. H. Preparation of Novel Syndiotactic Poly(vinyl alcohol) Microspheres through the Low-Temperature Suspension Copolymerization of Vinyl Pivalate and Vinyl Acetate and Heterogeneous Saponification. **J Appl Polym Sci**, v. 95, p. 1539-1548, 2005.
- LEE, S. G.; LYOO, W. S. Preparation of Monodisperse Poly(vinyl alcohol) Microspheres by Heterogeneous Surface Saponification and Iodine Complex Formation. **J Appl Polym Sci**, v. 107, p. 1701-1709, 2008.
- LEE, K.; LIAPI, E. A.; CORNELL, C.; REB, P.; BUIJS, M.; VOSSEN, J. A.; VENTURA, V. P.; GESCHWIND, J. H. Doxorubicin-Loaded QuadraSphere Microspheres: Plasma Pharmacokinetics and Intratumoral Drug Concentration in an Animal Model of Liver Cancer. **Cardiovasc Intervent Radiol**, v. 33, p. 576-582, 2010.
- LENTON, J.; KESSEL, D.; WATKINSON, A. F. Embolization of renal angiomyolipoma: immediate complications and long-term outcomes. **Clinical Radiology**, v. 63, p. 864-870, 2008.
- LEVA, A. D.; GRIZZI, F.; GAETANI, P.; GOGLIA, U.; TSCHABITSCHER, M.; MORTINI, P.; BAENA, R. R. Euclidean and fractal geometry of microvascular networks in normal and neoplastic pituitary tissue. **Neurosurg Rev**, v. 31, p. 271-281, 2008.
- LEVA, A. D.; GRIZZI, F.; TSCHABITSCHER, M.; COLOMBO, P.; CASALI, M.; SIMONELLI, M.; WIDHALM, G.; MUZZIO, P. C.; MATULA, C.; CHITI, A.; RODRIGUEZ, R.; BAENA, R. R. Correlation of microvascular fractal dimension with positron emission tomography [^{11}C]-methionine uptake in glioblastoma multiforme: Preliminary findings. **Microvascular Research**, v. 80, p. 267-273, 2010.
- LÉVEILLÉ, R.; HARDY, J.; ROBERTSON, J. T.; WILLIS, A. M.; BEARD, W. L.; WEISBRODE, S. E.; LEPAGE, O. M. Transarterial Coil Embolization of the Internal and External Carotid and Maxillary Arteries for Prevention of Hemorrhage From Guttural Pouch Mycosis in Horses. **Vet Surg**, v. 29, p. 389-397, 2000.
- LEWIS, A. L.; TAYLOR, R. R.; HALL, B.; GONZALEZ, V.; WILLIS, S. L.; STRATFORD, P. W. Pharmacokinetic and safety study of Doxorubicin-eluting beads in a porcine model of hepatic arterial embolization. **J Vasc Interv Radiol**, v. 17, p. 1335-1343, 2006.
- LI, H.; GIGER, M. L.; OLOPADE, O. I.; LAN, L. Fractal Analysis of Mammographic Parenchymal Patterns in Breast Cancer Risk Assessment. **Acad Radiol**, v. 14, p. 513-521, 2007.
- LIAPI, E.; GESCHWIND, J. F. H. Transcatheter and Ablative Therapeutic Approaches for Solid Malignancies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 8, p. 978-986, 2007.
- LINFANTE, I.; WAKHLOO, A. K. Brain Aneurysms and Arteriovenous Malformations: Advancements and Emerging Treatments in Endovascular Embolization. **Stroke**, v. 38, n. 4, p. 1411-1417, 2007.

LÓPES-BENÍTEZ, R.; RICHTER, G. M.; KAUCZOR, H.; STAMPFL, S.; KLADECK, J.; RADELEFF, B. A.; NEUKAMM, M.; HALLSCHEIDT, P. J. Analysis of Nontarget Embolization Mechanisms During Embolization and Chemoembolization Procedures. **Cardiovasc Intervent Radiol**, v.32, p. 615-622, 2009.

LOSA, G. A.; CASTELLI, C. Nuclear patterns of human breast cancer cells during apoptosis: characterisation by fractal dimension and co-occurrence matrix statistics. **Cell Tissue Res**, v. 322, p. 257-267, 2005.

LUO, D. Nanotechnology and DNA delivery. **MRS Bulletin**, v. 30, n. 9, p. 654-658, 2005.

LUZI, P.; BIANCIARDI, G.; MIRACCO, C.; SANTI, M. M.; VECCHIO, M. T.; ALIA, L.; TOSI, P. Fractal Analysis in Human Pathology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 879, p. 255-257, 1999.

LYOO, W. S.; LEE, H. W. Synthesis of high-molecular-weight poly(vinyl alcohol) with high yield by novel one-batch suspension polymerization of vinyl acetate and saponification. **Colloid Polym Sci**, v. 280, p. 835-840, 2002.

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma Revisão Sobre os Processos de Polimerização em Suspensão. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 166-179, 2007.

MALAGARI, K.; ALEXOPOULOU, E.; CHATZIMICHAEL, K.; HALL, B.; KOSKINAS, J.; RYAN, S.; GALLARDO, E.; KELEKIS, A.; GOULIAMOS, A.; KELEKIS, D. Transcatheter chemoembolization in the treatment of HCC in patients not eligible for curative treatments: midterm results of doxorubicin-loaded DC bead. **Abdom Imaging**, v. 33, p. 512-519, 2008a.

MALAGARI, K.; CHATZIMICHAEL, K.; ALEXOPOULOU, E.; KELEKIS, A.; HALL, B.; DOURAKIS, S.; DELIS, S.; GOULIAMOS, A.; KELEKIS, D. Transarterial Chemoembolization of Unresectable Hepatocellular Carcinoma with Drug Eluting Beads: Results of an Open-Label Study of 62 Patients. **Cardiovasc Intervent Radiol**, v. 31, p. 269-280, 2008b.

MALAGARI, K.; POMONI, M.; KELEKIS, A.; POMONI, A.; DOURAKIS, S.; SPYRIDOPOULOS, T.; MOSCHOURIS, H.; EMMANOUIL, E.; RIZOS, S.; KELEKIS, D. Prospective Randomized Comparison of Chemoembolization with Doxorubicin-Eluting Beads and Bland Embolization with BeadBlock for Hepatocellular Carcinoma. **Cardiovasc Intervent Radiol**, v. 33, p. 541-551, 2010.

MARGARITESCU, C.; RAICA, M.; PIRICI, D.; SIMIONESCU, C.; MOGOANTA, L.; STINGA, A. C.; STINGA, A. S.; RIBATTI, D. Podoplanin expression in tumor-free resection margins of oral squamous cell carcinomas: an immunohistochemical and fractal analysis study. **Histol Histopathol**, v. 25, p. 701-711, 2010.

MILLER, S. J.; THOMAS, W. P. Coil embolization of patent ductus arteriosus via the carotid artery in seven dogs. **J Vet Card**, v. 11, p. 129-136, 2009.

- MOREIRA, P. L.; AN, Y. H. Animal Models for Therapeutic Embolization. **Cardiovasc Intervent Radiol**, v. 26, p. 100-110, 2003.
- MORRISON, R.; BOYD, R. Hidratação dos Alcinos – Tautomeria. In:____. **Química Orgânica**. 13 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 504-505, 1996.
- MOSCHOURIS, H.; MALAGARI, K.; PAPADAKI, M. G.; KORNEZOS, I.; MATSAIDONIS, D. Contrast-Enhanced Ultrasonography of Hepatocellular Carcinoma After Chemoembolisation Using Drug-Eluting Beads: A Pilot Study Focused on Sustained Tumor Necrosis. **Cardiovasc Intervent Radiol**, v. 33, p. 1022-1027, 2010.
- NITTA, N.; OHTA, S.; TANAKA, T.; TAKAZAHURA, R.; TOYAMA, T.; SONODA, A.; SEKO, A.; FURUKAWA, A.; TAKAHASHI, M.; MURATA, K.; KURUMI, Y.; TANI, T.; SAKAMOTO, T.; TABATA, Y. An initial clinical study on the efficacy of cisplatin-releasing gelatin microspheres for metastatic liver tumors. **European Journal of Radiology**, v. 71, p. 519-526, 2009.
- OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C. Conceitos Básicos sobre Radiação. In:____. **Física para Ciências Biológicas e Biomédicas**. São Paulo: Harbra, p. 2-4, 1982.
- PAUMGARTNER, G; LOSA, G.; WEIBEL, E. R. Resolution effect on the stereological estimation of surface and volume and its interpretation in terms of fractal dimensions. **J Microsc**, v. 121, p. 51-63, 1981.
- PEIXOTO, L. S.; SILVA, F. M.; NIEMEYER, M. A. L.; ESPINOSA, G.; MELO, P. A.; NELE, M.; PINTO, J. C. Synthesis of Poly(Vinyl Alcohol) and/or Poly(Vinyl Acetate) Particles with Spherical Morphology and Core-Shell Structure and its Use in Vascular Embolization. **Macromol Symp**, v. 243, p. 190-199, 2006.
- PEIXOTO, L. S.; MELO, P. A.; NELE, M.; PINTO, J. C. Expanded Core/Shell Poly(vinyl acetate)/Poly(vinyl alcohol) Particles for Embolization. **Macromol. Mater. Eng.**, v. 294, p. 463-471, 2009.
- PEIXOTO, L. S.; CORDEIRO, F. B.; MELO, P. A.; NELE, M.; PINTO, J. C. Synthesis of Spherical Core-Shell PVAc-co-PMMA/PVA Particles for Use in Vascular Embolization. **Macromol Symp**, v. 299/300, p. 132-138, 2011.
- PELAGE, J. P.; LAURENT, A.; WASSEF, M.; BONNEAU M.; GERMAIN, D.; RYMER, R.; FLAUD, P.; MARTAL, J.; MERLAND, J. J. Uterine Artery Embolization in Sheep: Comparison of Acute Effects with Polyvinyl Alcohol Particles and Calibrated Microspheres. **Radiology**, v. 224, p. 436-445, 2002.
- PINTO, J. C.; LOPEZ, G. B.; NIEMEYER, M. A. L.; SILVA, F. M.; MELO, P. A.; NELE, M. Process for the synthesis of poly (vinyl alcohol) and/or poly (vinyl acetate) with spherical morphology and shell-and-nucleus structure and its use in vascular embolization. **W.O. Pat. 050591A2**, 2006.
- RASULI, P.; HAMMOND, I.; AL-MUTAIRI, B.; FRENCH, G. J.; AQUINO, J.; HADZIOMEROVIC, A.; GOULET, S.; JOLLY, E. E. Spherical Versus Conventional

Polyvinyl Alcohol Particles for Uterine Artery Embolization. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 19, n. 1, p. 42-46, 2008.

RATHBONE, M.J.; MARTINEZ, M. N. Modified release drug delivery in veterinary medicine. **Drug Discov Today**, v. 7, n. 15, p. 823-829, 2002.

REINEKE, T. M.; GRINSTAFF, M. W. Designer Materials for Nucleic Acid Delivery. **MRS Bulletin**, v. 30, n. 9, p. 635-639, 2005.

ROCHA, L. B.; ADAM, R. L.; LEITE, N. J.; METZE, K.; ROSSI, M. A. Shannon's Entropy and Fractal Dimension Provide an Objective Account of Bone Tissue Organization During Calvarial Bone Regeneration. **Microscopy Research and technique**, v. 71, p. 619-625, 2008.

ROEBUCK, D. J.; BARNACLE, A. M. Haemoptysis and bronchial artery embolization in children. **Paediatr Respir Rev**, v. 9, n. 2, p. 95-104, 2008.

ROTHEN-WEINHOLD, A.; DAHN, M.; GURNY, R. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. **Pharm Sci Technol Today**, v. 3, p. 222-231, 2000.

SCHNEIDER, M.; PLASSMANN, M.; RAUBER, K. Intrahepatic Venous Collaterals Preventing Successful Stent-supported Coil Embolization of Intrahepatic Shunts in Dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 50, n. 4, p. 376-384, 2009.

SCHWARTZ, M. J.; SMITH, E. B.; TROST, D. W.; VAUGHAN JR, E. D. Renal artery embolization: clinical indications and experience from over 100 cases. **BJU Int**, v. 99, n. 4, p. 881-886, 2007.

SEMENZIM, V. L.; BASSO, G. G.; SILVA, D. A.; VASCONCELLOS, A.; AGRELI, G.; LIMA-OLIVEIRA, A. P. M.; KAWASAKI-OYAMA, R. S.; BRAILE, D. M.; NERY, J. G. Synthesis and Characterization of Novel Highly Crystalline Poly(Vinyl Alcohol) Microspheres for Chemoembolization Therapy. **J Appl Polym Sci**, v. 121, p. 1417-1423, 2011.

SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Tech J**, v. 27, p. 379-423, 1948.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. Caracterização de superfícies por espectroscopia e microscopia. In:____. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, p. 488-492, 2002.

STROSBERG, J. R.; CHOI, J.; CANTOR, A. B.; KVOLS, L. K. Selective Hepatic Artery Embolization for Treatment of Patients with Metastatic Carcinoid and Pancreatic Endocrine Tumors. **Cancer Control**, v. 13, n. 1, p. 72-78, 2006.

TAMBASCO, M.; COSTELLO, B. M.; ALEXEI, K.; YAU, A. Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. **Micron**, v. 40, p. 486-494, 2009.

- TAMBASCO, M.; ELIASZIW, M.; MAGLIOCCO, A. M. Morphologic complexity of epithelial architecture for predicting invasive breast cancer survival. **J Translational Medicine**, v. 8, p.140-150, 2010.
- TAVERNA, G.; COLOMBO, P.; GRIZZI, F.; FRANCESCHINI, B.; CEVA-GRIMALDI, G.; SEVESO, G. G.; PICCINELLI, A.; GRAZIOTTI, P. Fractal analysis of two-dimensional vascularity in primary prostate cancer and surrounding non-tumoral parenchyma. **Pathology Research and Practice**, v. 205, p. 438-444, 2009.
- TAYLOR, R. R.; TANG, Y.; GONZALEZ, M. V.; STRATFORD, P. W.; LEWIS, A. L. Irinotecan Drug Eluting Beads for Use in Chemoembolization: *in vitro* and *in vivo* Evaluation for Drug Release Properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, p. 7-14, 2007.
- UPPAL, S. O.; VORONINE, D. V.; WENDT, E.; HECKMAN, C. A. Morphological Fractal Analysis of Shape in Cancer Cells Treated with Combinations of Microtubule-Polymerizing and -Depolymerizing Agents. **Microsc. Microanal.**, v. 16, p. 472–477, 2010.
- VAIDYA, S.; TOZER, K. R.; CHEN, J. An Overview of Embolic Agents. **Seminars in Interventional Radiology**, v. 25, n. 3, p. 204-215, 2008.
- VASILESCU, C.; HERLEA, V.; TALOS, F.; IVANOV, B.; DOBRESCU, R. Differences between intestinal and diffuse type of gastric carcinoma: A fractal analysis. **Interdisciplinary Applications of Fractal and Chaos Theory**. Bucuresti: Editora Academiei Romane, 2004.
- YU, Y.; LIN, C.; YEH, J.; LIN, W. Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-clay nanocomposite materials. **Polymer**, v. 44, p. 3553-3560, 2003.
- WEISSE, C.; NICHOLSON, M. E.; ROLLINGS, C.; HAMMER, K.; HURST, R.; SOLOMON, J. A. Use of percutaneous arterial embolization for treatment of intractable epistaxis in three dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 224, n. 8, p. 1307-1311, 2004.
- WEISSE, C. W.; BERENT, A. C.; TODD, K. L.; SOLOMON, J. A. Potential applications of interventional radiology in veterinary medicine. **J Am Vet Med Assoc**, v. 233, n. 10, p. 1564-1574, 2008.
- ZAR, J. H. Multiple Comparisons. In:____. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Printice Hall, 1999.

APÊNCICE

APÊNDICE A: RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE DIMENSÃO FRACTAL E ENTROPIA DE SHANNON

Tabela 9: Dimensão fractal dos tecidos subcutâneos - animal controle e animais submetidos ao implante das partículas (resultados agrupados por período de permanência nos ratos).

Aumento 4X	Nº imagens	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil inferior	Mediana	Quartil superior	Máximo
Controle	20	1,537	0,052	1,439	1,500	1,532	1,585	1,622
4 mol/L	15	1,530	0,022	1,481	1,526	1,533	1,542	1,569
7 dias	25 mol/L	15	1,652	0,016	1,624	1,642	1,657	1,669
Comercial	15	1,638	0,010	1,614	1,635	1,642	1,646	1,647
4 mol/L	15	1,604	0,026	1,573	1,581	1,589	1,634	1,638
15 dias	25 mol/L	15	1,613	0,054	1,515	1,567	1,632	1,667
Comercial	05	1,601	0,006	1,594	1,595	1,602	1,603	1,609
4 mol/L	15	1,373	0,083	1,274	1,289	1,365	1,448	1,499
30 dias	25 mol/L	15	1,614	0,031	1,554	1,593	1,611	1,661
Comercial	15	1,556	0,056	1,461	1,510	1,534	1,606	1,638
Aumento 10X								
Controle	30	1,488	0,117	1,282	1,368	1,517	1,606	1,642
4 mol/L	30	1,387	0,064	1,261	1,359	1,386	1,436	1,522
7 dias	25 mol/L	30	1,500	0,045	1,424	1,464	1,491	1,594
Comercial	30	1,426	0,038	1,340	1,405	1,435	1,457	1,487
4 mol/L	30	1,476	0,043	1,393	1,451	1,468	1,510	1,551
15 dias	25 mol/L	30	1,561	0,049	1,471	1,528	1,551	1,610
Comercial	10	1,548	0,027	1,483	1,540	1,557	1,566	1,573
4 mol/L	30	1,324	0,062	1,206	1,271	1,316	1,362	1,458
30 dias	25 mol/L	30	1,564	0,116	1,215	1,533	1,595	1,667
Comercial	30	1,519	0,026	1,454	1,500	1,521	1,540	1,559
Aumento 20X								
Controle	30	1,367	0,094	1,157	1,309	1,368	1,440	1,515
4 mol/L	30	1,337	0,070	1,234	1,285	1,325	1,386	1,501
7 dias	25 mol/L	30	1,420	0,041	1,332	1,398	1,420	1,512
Comercial	30	1,335	0,034	1,247	1,311	1,340	1,356	1,401
4 mol/L	30	1,356	0,050	1,272	1,313	1,355	1,389	1,474
15 dias	25 mol/L	30	1,468	0,044	1,376	1,376	1,467	1,547
Comercial	10	1,410	0,030	1,353	1,353	1,420	1,427	1,457
4 mol/L	30	1,322	0,065	1,180	1,278	1,329	1,371	1,419
30 dias	25 mol/L	30	1,491	0,070	1,259	1,450	1,501	1,586
Comercial	30	1,488	0,030	1,426	1,462	1,486	1,513	1,543
Aumento 40X								
Controle	30	1,268	0,107	1,091	1,201	1,264	1,353	1,500
4 mol/L	30	1,274	0,060	1,135	1,236	1,275	1,320	1,392
7 dias	25 mol/L	30	1,318	0,038	1,225	1,289	1,323	1,381
Comercial	30	1,308	0,023	1,251	1,295	1,312	1,327	1,339
4 mol/L	30	1,291	0,041	1,214	1,269	1,295	1,309	1,385
15 dias	25 mol/L	30	1,348	0,033	1,271	1,325	1,351	1,374
Comercial	10	1,314	0,042	1,244	1,296	1,318	1,334	1,396
4 mol/L	30	1,311	0,050	1,210	1,268	1,317	1,346	1,386
30 dias	25 mol/L	30	1,391	0,038	1,292	1,367	1,391	1,469
Comercial	30	1,403	0,027	1,333	1,385	1,404	1,423	1,449

Tabela 10: Dimensão fractal dos tecidos subcutâneos - animal controle e animais submetidos ao implante das partículas (resultados para cada partícula nos diferentes períodos de permanência).

Aumento 4X		Nº imagens	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil inferior	Mediana	Quartil superior	Máximo
Controle		20	1,537	0,052	1,439	1,500	1,532	1,585	1,622
4 mol/L	7 dias	15	1,530	0,022	1,481	1,526	1,533	1,542	1,569
	15 dias	15	1,604	0,026	1,573	1,581	1,589	1,634	1,638
	30 dias	15	1,373	0,083	1,274	1,289	1,365	1,448	1,499
25 mol/L	7 dias	15	1,652	0,016	1,624	1,642	1,657	1,662	1,669
	15 dias	15	1,613	0,054	1,515	1,567	1,632	1,662	1,667
	30 dias	15	1,614	0,031	1,554	1,593	1,611	1,639	1,661
Comercial	7 dias	15	1,638	0,010	1,614	1,635	1,642	1,646	1,647
	15 dias	05	1,601	0,006	1,594	1,595	1,602	1,603	1,609
	30 dias	15	1,556	0,056	1,461	1,510	1,534	1,606	1,638
Aumento 10X									
Controle		30	1,488	0,117	1,282	1,368	1,517	1,606	1,642
4 mol/L	7 dias	30	1,387	0,064	1,261	1,359	1,386	1,436	1,522
	15 dias	30	1,476	0,043	1,393	1,451	1,468	1,510	1,551
	30 dias	30	1,324	0,062	1,206	1,271	1,316	1,362	1,458
25 mol/L	7 dias	30	1,500	0,045	1,424	1,464	1,491	1,529	1,594
	15 dias	30	1,561	0,049	1,471	1,528	1,551	1,610	1,644
	30 dias	30	1,564	0,116	1,215	1,533	1,595	1,644	1,667
Comercial	7 dias	30	1,426	0,038	1,340	1,405	1,435	1,457	1,487
	15 dias	10	1,548	0,027	1,483	1,540	1,557	1,566	1,573
	30 dias	30	1,519	0,026	1,454	1,500	1,521	1,540	1,559
Aumento 20X									
Controle		30	1,367	0,094	1,157	1,309	1,368	1,440	1,515
4 mol/L	7 dias	30	1,337	0,070	1,234	1,285	1,325	1,386	1,501
	15 dias	30	1,356	0,050	1,272	1,313	1,355	1,389	1,474
	30 dias	30	1,322	0,065	1,180	1,278	1,329	1,371	1,419
25 mol/L	7 dias	30	1,420	0,041	1,332	1,398	1,420	1,447	1,512
	15 dias	30	1,468	0,044	1,376	1,376	1,467	1,511	1,547
	30 dias	30	1,491	0,070	1,259	1,450	1,501	1,540	1,586
Comercial	7 dias	30	1,335	0,034	1,247	1,311	1,340	1,356	1,401
	15 dias	10	1,410	0,030	1,353	1,353	1,420	1,427	1,457
	30 dias	30	1,488	0,030	1,426	1,462	1,486	1,513	1,543
Aumento 40X									
Controle		30	1,268	0,107	1,091	1,201	1,264	1,353	1,500
4 mol/L	7 dias	30	1,274	0,060	1,135	1,236	1,275	1,320	1,392
	15 dias	30	1,291	0,041	1,214	1,269	1,295	1,309	1,385
	30 dias	30	1,311	0,050	1,210	1,268	1,317	1,346	1,386
25 mol/L	7 dias	30	1,318	0,038	1,225	1,289	1,323	1,348	1,381
	15 dias	30	1,348	0,033	1,271	1,325	1,351	1,374	1,415
	30 dias	30	1,391	0,038	1,292	1,367	1,391	1,417	1,469
Comercial	7 dias	30	1,308	0,023	1,251	1,295	1,312	1,327	1,339
	15 dias	10	1,314	0,042	1,244	1,296	1,318	1,334	1,396
	30 dias	30	1,403	0,027	1,333	1,385	1,404	1,423	1,449

Tabela 11: Entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos - animal controle e animais submetidos ao implante das partículas (resultados agrupados por período de permanência nos ratos).

Aumento 4X		Nº imagens	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil inferior	Mediana	Quartil superior	Máximo
Controle		20	0,376	0,071	0,252	0,327	0,364	0,433	0,487
7 dias	4 mol/L	15	0,239	0,040	0,190	0,200	0,236	0,271	0,316
	25 mol/L	15	0,368	0,049	0,300	0,315	0,368	0,422	0,432
	Comercial	15	0,278	0,005	0,268	0,272	0,280	0,282	0,284
15 dias	4 mol/L	15	0,330	0,039	0,270	0,298	0,339	0,347	0,437
	25 mol/L	15	0,364	0,051	0,292	0,309	0,384	0,409	0,426
	Comercial	05	0,278	0,005	0,272	0,273	0,278	0,282	0,283
30 dias	4 mol/L	15	0,183	0,056	0,110	0,132	0,194	0,218	0,284
	25 mol/L	15	0,360	0,038	0,277	0,335	0,366	0,398	0,411
	Comercial	15	0,337	0,016	0,306	0,324	0,337	0,353	0,360
Aumento 10X									
Controle		30	0,367	0,066	0,236	0,368	0,406	0,441	0,504
7 dias	4 mol/L	30	0,231	0,050	0,131	0,193	0,235	0,275	0,310
	25 mol/L	30	0,314	0,047	0,242	0,272	0,312	0,348	0,403
	Comercial	30	0,259	0,044	0,201	0,234	0,251	0,266	0,366
15 dias	4 mol/L	30	0,255	0,055	0,186	0,209	0,241	0,270	0,375
	25 mol/L	30	0,400	0,053	0,318	0,353	0,422	0,445	0,474
	Comercial	10	0,349	0,018	0,310	0,338	0,351	0,353	0,370
30 dias	4 mol/L	30	0,191	0,095	0,076	0,120	0,176	0,218	0,427
	25 mol/L	30	0,348	0,083	0,144	0,321	0,355	0,415	0,452
	Comercial	30	0,381	0,045	0,262	0,351	0,384	0,416	0,438
Aumento 20X									
Controle		30	0,386	0,108	0,113	0,318	0,389	0,463	0,528
7 dias	4 mol/L	30	0,206	0,053	0,144	0,155	0,203	0,248	0,294
	25 mol/L	30	0,312	0,050	0,241	0,273	0,302	0,336	0,426
	Comercial	30	0,257	0,022	0,191	0,248	0,265	0,273	0,280
15 dias	4 mol/L	30	0,204	0,049	0,126	0,167	0,194	0,245	0,319
	25 mol/L	30	0,374	0,060	0,285	0,325	0,362	0,410	0,475
	Comercial	10	0,395	0,046	0,306	0,357	0,411	0,429	0,446
30 dias	4 mol/L	30	0,152	0,041	0,091	0,118	0,147	0,183	0,268
	25 mol/L	30	0,366	0,055	0,208	0,332	0,385	0,409	0,427
	Comercial	30	0,392	0,050	0,274	0,355	0,415	0,430	0,455
Aumento 40X									
Controle		30	0,380	0,140	0,059	0,316	0,422	0,483	0,530
7 dias	4 mol/L	30	0,208	0,046	0,125	0,163	0,203	0,243	0,310
	25 mol/L	30	0,350	0,063	0,216	0,303	0,365	0,403	0,446
	Comercial	30	0,361	0,025	0,327	0,345	0,355	0,366	0,413
15 dias	4 mol/L	30	0,242	0,070	0,126	0,184	0,241	0,291	0,386
	25 mol/L	30	0,371	0,065	0,270	0,312	0,362	0,440	0,480
	Comercial	10	0,410	0,023	0,382	0,393	0,402	0,422	0,457
30 dias	4 mol/L	30	0,197	0,048	0,096	0,164	0,198	0,237	0,292
	25 mol/L	30	0,383	0,044	0,277	0,350	0,390	0,404	0,469
	Comercial	30	0,391	0,021	0,340	0,379	0,389	0,404	0,426

Tabela 12: Entropia de Shannon dos tecidos subcutâneos - animal controle e animais submetidos ao implante das partículas (resultados para cada partícula nos diferentes períodos de permanência).

		Nº		Desvio		Quartil		Quartil	
Aumento 4X		imagens	Média	Padrão	Mínimo	inferior	Mediana	superior	Máximo
Controle		20	0,376	0,071	0,252	0,327	0,364	0,433	0,487
4 mol/L	7 dias	15	0,239	0,040	0,190	0,200	0,236	0,271	0,316
	15 dias	15	0,330	0,039	0,270	0,298	0,339	0,347	0,437
	30 dias	15	0,183	0,056	0,110	0,132	0,194	0,218	0,284
25 mol/L	7 dias	15	0,368	0,049	0,300	0,315	0,368	0,422	0,432
	15 dias	15	0,364	0,051	0,292	0,309	0,384	0,409	0,426
	30 dias	15	0,360	0,038	0,277	0,335	0,366	0,398	0,411
Comercial	7 dias	15	0,278	0,005	0,268	0,272	0,280	0,282	0,284
	15 dias	05	0,278	0,005	0,272	0,273	0,278	0,282	0,283
	30 dias	15	0,337	0,016	0,306	0,324	0,337	0,353	0,360
Aumento 10X									
Controle		30	0,367	0,066	0,236	0,368	0,406	0,441	0,504
4 mol/L	7 dias	30	0,231	0,050	0,131	0,193	0,235	0,275	0,310
	15 dias	30	0,255	0,055	0,186	0,209	0,241	0,270	0,375
	30 dias	30	0,191	0,095	0,076	0,120	0,176	0,218	0,427
25 mol/L	7 dias	30	0,314	0,047	0,242	0,272	0,312	0,348	0,403
	15 dias	30	0,400	0,053	0,318	0,353	0,422	0,445	0,474
	30 dias	30	0,348	0,083	0,144	0,321	0,355	0,415	0,452
Comercial	7 dias	30	0,259	0,044	0,201	0,234	0,251	0,266	0,366
	15 dias	10	0,349	0,018	0,310	0,338	0,351	0,353	0,370
	30 dias	30	0,381	0,045	0,262	0,351	0,384	0,416	0,438
Aumento 20X									
Controle		30	0,386	0,108	0,113	0,318	0,389	0,463	0,528
4 mol/L	7 dias	30	0,206	0,053	0,144	0,155	0,203	0,248	0,294
	15 dias	30	0,204	0,049	0,126	0,167	0,194	0,245	0,319
	30 dias	30	0,152	0,041	0,091	0,118	0,147	0,183	0,268
25 mol/L	7 dias	30	0,312	0,050	0,241	0,273	0,302	0,336	0,426
	15 dias	30	0,374	0,060	0,285	0,325	0,362	0,410	0,475
	30 dias	30	0,366	0,055	0,208	0,332	0,385	0,409	0,427
Comercial	7 dias	30	0,257	0,022	0,191	0,248	0,265	0,273	0,280
	15 dias	10	0,395	0,046	0,306	0,357	0,411	0,429	0,446
	30 dias	30	0,392	0,050	0,274	0,355	0,415	0,430	0,455
Aumento 40X									
Controle		30	0,380	0,140	0,059	0,316	0,422	0,483	0,530
4 mol/L	7 dias	30	0,208	0,046	0,125	0,163	0,203	0,243	0,310
	15 dias	30	0,242	0,070	0,126	0,184	0,241	0,291	0,386
	30 dias	30	0,197	0,048	0,096	0,164	0,198	0,237	0,292
25 mol/L	7 dias	30	0,350	0,063	0,216	0,303	0,365	0,403	0,446
	15 dias	30	0,371	0,065	0,270	0,312	0,362	0,440	0,480
	30 dias	30	0,383	0,044	0,277	0,350	0,390	0,404	0,469
Comercial	7 dias	30	0,361	0,025	0,327	0,345	0,355	0,366	0,413
	15 dias	10	0,410	0,023	0,382	0,393	0,402	0,422	0,457
	30 dias	30	0,391	0,021	0,340	0,379	0,389	0,404	0,426

ANEXOS

ANEXO A: PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS E ANAIS DE EVENTOS

SEMENZIM, V. L.; BASSO, G. G.; SILVA, D. A.; VASCONCELLOS, A.; AGRELI, G.; LIMA-OLIVEIRA, A. P. M.; KAWASAKI-OYAMA, R. S.; BRAILE, D. M.; NERY, J. G. Synthesis and Characterization of Novel Highly Crystalline Poly(Vinyl Alcohol) Microspheres for Chemoembolization Therapy. **Journal of Applied Polymer Science (Online)**, v. 121, p. 1417-1423, 2011.

SILVA, D. A.; SAKAMOTO, S. S.; FERREIRA, G. T. N. M.; TABOGA, S. R.; GODOY, M. F.; BRAILE, D. M.; NERY, J. G. Análise anatomopatológica e dimensão fractal de microesferas de poli(álcool vinílico) após implante subcutâneo em ratos. **18º Encontro da Sociedade Brasileira de Química**, 2011, São José do Rio Preto - SP.

SILVA, D. A.; BASSO, G. G.; SEMENZIM, V. L.; GODOY, M. F.; BRAILE, D. M.; NERY, J. G. Dimensão fractal de microesferas de poli(álcool vinílico) utilizadas em aplicações biomédicas. **18º Encontro da Sociedade Brasileira de Química**, 2011, São José do Rio Preto - SP.

SILVA, D. A.; SEMENZIM, V. L.; BASSO, G. G.; LUVIZOTTO, M. C. R.; ANDRADE, A. L.; BRAILE, D. M.; NERY, J. G. Histologic evaluation of highly crystalline poly(vinyl alcohol) microspheres for chemoembolization therapy. **X Brazilian MRS Meeting**, 2011, Gramado - RS.

SILVA, D. A.; SAKAMOTO, S. S.; FERREIRA, G. T. N. M.; LUVIZOTTO, M. C. R.; ANDRADE, A. L.; BRAILE, D. M.; NERY, J. G. Análise fractal de microesferas de poli(álcool vinílico) altamente cristalinas para aplicação em embolização e quimioembolização. **Simpósio Interdisciplinar Física e Bioinformática**, 2011, São José do Rio Preto - SP.

SILVA, D. A.; SEMENZIM, V. L.; BASSO, G. G.; TABOGA, S. R.; GODOY, M. F.; BRAILE, D. M.; NERY, J. G. Relação entre entropia de Shannon e reação inflamatória em ratos após implante de microesferas de poli(álcool vinílico) altamente cristalinas. **Simpósio Interdisciplinar Física e Bioinformática**, 2011, São José do Rio Preto - SP.

BASSO, G. G.; SEMENZIM, V. L.; SILVA, D. A.; AGRELI, G.; LIMA-OLIVEIRA, A. P. M.; NERY, J. G. Synthesis and characterization of poly(vinyl alcohol) spherical particles for utilization in embolization and chemoembolization therapies. **XII International Macromolecular Colloquium and 7th International Symposium on Natural Polymers and Composites**, 2010, Gramado - RS.

BASSO, G. G.; SEMENZIM, V. L.; SILVA, D. A.; AGRELI, G.; KAWASAKI-OYAMA, R. S.; BRAILE, D. M.; NERY, J. G. Preparation of Highly Crystalline Poly(Vinyl Alcohol) Microspheres for Embolization and Chemoembolization. **IX Brazilian MRS Meeting**, 2010, Ouro Preto - MG.

ANEXO B: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE IMPLANTE SUBCUTÂNEO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "ESTUDO HISTOLÓGICO DA APLICAÇÃO DE MICROESFERAS DE POLI(VINIL ÁLCOOL) DESENVOLVIDAS PARA APLICAÇÃO DE FÁRMACOS EM MEDICINA VETERINÁRIA" sob a responsabilidade do Prof Adjunto Alexandre Lima de Andrade e colaboração do Prof Ass Dr Geraldo Nery, Danilo Antonio da Silva e Silmara Sanae Sakamoto está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 10/10/2010 de acordo com o protocolo 2010-007408.

Araçatuba, 10 de outubr de 2010

Profa. Adjunto Tereza Cristina Cardoso da Silva

Presidente da CEEA – FOA - Unesp

ANEXO C: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE EMBOLIZAÇÃO

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA FAMERP	<i>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto</i> Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/ SP
DELIBERAÇÃO CEEA Nº 003/2011	
A Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEEA/FAMERP, em reunião desta data analisou o projeto de pesquisa intitulado “Embolização vascular renal e coelhos para estudo comparativo da reação inflamatória renal entre micropartículas de poli (álcool vinílico)” (Protocolo FAMERP nº 0741/2011), sob responsabilidade do Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, e deliberou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi aprovado por essa Comissão, com a seguinte recomendação: o pesquisador deverá monitorar o bem estar dos animais no período pós-cirúrgico para se certificar da necessidade de um analgésico que não interfira com os dados a serem coletados na pesquisa.	
Atenção: Ao final do estudo o pesquisador deverá preencher o Formulário do Relatório Final e enviar ao CEEA.	
São José do Rio Preto, 10 de fevereiro de 2011.	
 Profa. Dra. Débora Ap. Pires de Campos Zuccari Presidente da CEEA FAMERP	