



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS EM UM MODELO
MURINO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME:
COMPARAÇÃO ENTRE AS VIAS INTRANASAL E ENDOVENOSA**

BRASÍLIA
2018

AMANDA ALENCAR CABRAL

**ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS EM UM MODELO
MURINO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME:
COMPARAÇÃO ENTRE AS VIAS INTRANASAL E ENDOVENOSA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, com ênfase em Morfologia Funcional, pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Mara de Oliveira.

BRASÍLIA

2018

*Dedico este trabalho aos meus pais, Álvaro e Susani,
minha irmã Flávia & Anderson e ao meu namorado
José Athayde pelo incentivo e apoio durante toda esta
jornada.*

AGRADECIMENTOS

Faço das palavras de Marthin Luther King as minhas: *“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”*.

De uma forma geral, para não ser injusta, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho e para o meu crescimento como profissional.

Em especial, agradeço aos meus pais amados, Álvaro e Susani, por acreditarem em mim e me apoiarem durante toda a jornada. Obrigada por entenderem que a distância é necessária para o meu crescimento profissional e pessoal! Flávia e Anderson por me abrigarem em sua casa durante esses 2 anos, me apoiarem e incentivarem. Nem tenho palavras para dizer o quanto vocês me ajudaram e foram importantes! Ao meu namorado José Athayde, pesquisador do qual me orgulho, por ter sempre me dado todo o apoio necessário em todas as vezes em que me senti exausta, por ter sido meu parceiro de pesquisa e divagações científicas, mesmo eu querendo vencer todos os argumentos.

À professora Daniela Mara por acreditar neste estudo e por toda a paciência e incentivo durante essa jornada.

Ao professor Ricardo Bentes por ter cedido a infraestrutura e materiais do seu laboratório para realização desse estudo.

À professora Márcia Mortari por deixar seu laboratório disponível para que todas as cirurgias fossem feitas, e a sua aluna Maria por ter me ensinado a cirurgia e ter estado disponível sempre a me ajudar e também o seu aluno Gabriel por ter tido paciência em me explicar toda a estrutura cerebral.

Aos professores Marcelo Sousa e Juliano Chaker do Laboratório de Nanotecnologia Verde (UnB – Faculdade de Ceilândia, CEM04) por terem auxiliado e permitido que a análise do ICP-OES fosse feita.

Aos demais professores (João Paulo, Jaqueline, Sônia Bao, Andris, Monica, Aline Pic-Taylor e tantos outros) que também disponibilizaram equipamentos e recursos. Vocês me ensinaram que ciência não é lugar para individualismo, todos estamos lutando do mesmo lado da guerra, seja ela contra o câncer, ignorância, à favor da acessibilidade para todos e para o desenvolvimento de uma ciência translacional.

Ao Dr. Carpaneda pela disponibilidade e gentileza em ceder as amostras e por acreditar e investir na ciência básica. Também a equipe do professor Ricardo Titz por ter cedido as amostras da linhagem tumoral U87MG.

Ao técnico Chiquinho da biofísica por ter me ajudado na liofilização das amostras.

À todos os meus amigos, em especial Babi, Luiza, Raquel, Ray e Anuska. “A amizade é a certeza que, aconteça o que acontecer, você jamais se sentirá desamparado”. Vocês são incríveis!

À Vanessa por ter sido companheira de laboratório, por ter participado da transdução das células tumorais, por todas as preocupações compartilhadas e discussões científicas.

Aos demais colegas e amigos cientistas do grupo de nanobiotecnologia, os quais foram indispensáveis nesta caminhada que por muitas vezes parecia sem fim. Acredito que há uma citação que resume nossos sentimentos nessa nossa profissão/paixão, que diz: *“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”* (Carl Sagan).

.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos dez”.

(George Bernard Shaw).

RESUMO

O câncer é o nome dado a um conjunto de doenças relacionadas responsáveis pelas maiores taxas de morte ao redor do mundo, tanto em países mais ou menos desenvolvidos. Dentre eles está o Glioblastoma Multiforme (GBM), originado nas células gliais e classificado como um astrocitoma de grau IV, caracteristicamente agressivo e invasivo. Sabendo da baixa expectativa de vida dos pacientes com esta condição, terapias alternativas têm sido incentivadas de forma a tentar combater o tumor com as mais diversas estratégias, visando atingir todas as células da massa tumoral. O uso de células mesenquimais (MSCs) como carreador de terapias à tumores já vem sendo investigado e tem apresentado bons resultados, entretanto, estabelecer um protocolo de administração efetivo é essencial. Uma das estratégias que se tem usado para entender esse potencial migratório é sua marcação com nanopartículas magnéticas. Por isso, este estudo teve como objetivo investigar e comparar a administração de MSCs por via intranasal e endovenosa em um modelo murino de glioma. Para tal, as MSCs foram isoladas de lipoaspirado humano e marcadas com nanopartículas magnéticas para visualização e quantificação *in vivo*. Foi feita a transdução lentiviral da linhagem tumoral U87MG com luciferase para facilitar o estabelecimento do modelo animal de glioma por meio de acompanhamento de sua bioluminescência. Posteriormente, as MSCs marcadas com nanopartículas foram administradas pelas vias intranasal e endovenosa em camundongos imunodeficientes previamente enxertados com células U87MG e, ao final, sua capacidade migratória foi avaliada por meio de análise histológica e determinação da biodistribuição de ferro por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. Os dados obtidos foram analisados conforme o teste estatístico apropriado e apresentados como média e erro padrão. Observamos por meio dos ensaios *in vitro* que a marcação das MSCs com nanopartículas foi eficiente, visto que foi possível evidenciar o ferro na célula e estas tiveram tendência migratória em direção ao campo magnético. O estabelecimento da linhagem tumoral modificada com luciferase foi efetivo, porém a transdução com GFP não foi efetiva, visto que poucas células se mostraram fluorescentes. Já nos ensaios *in vivo*, a administração das MSCs marcadas após o estabelecimento do modelo murino de glioblastoma demonstrou uma maior eficiência da via intranasal, pois teve um maior acúmulo de ferro no cérebro e menor concentração nos pulmões, em comparação com a via endovenosa. Dessa forma, a via intranasal se mostrou mais eficaz e deve ser priorizada quando o objetivo é atingir o cérebro e reduzir possíveis efeitos associados ao acúmulo do tratamento nos pulmões.

Palavras-chave: Células mesenquimais, nanopartículas magnéticas, glioma, câncer, vias de administração.

ABSTRACT

Cancer is the name given to a set of related diseases responsible for highest death rates around the world, both in underdeveloped or developed countries. Among them, is Glioblastoma Multiforme (GBM), which originates in glial cells and is classified as a grade IV astrocytoma, characteristically aggressive and invasive. Knowing low life expectancy of patients with this condition, alternative therapies have been encouraged in order to try to fight tumor with most diverse strategies, aiming to reach all cells of the tumor mass. The use of mesenchymal stromal cells (MSCs) as a carrier of tumor therapies has been investigated and has shown good results, however, establishing an effective administration protocol is essential. One of the strategies that has been used to understand this migratory potential is labeling the cells with magnetic nanoparticles. Therefore, this study aimed to investigate and compare intranasal and intravenous administrations routes for MSCs in a murine model of glioma. For this, human MSCs were isolated from liposuction and labeled with magnetic nanoparticles for visualization and quantification in vivo. Transduction of the U87MG tumor cell line with luciferase lentiviral particles was performed to facilitate establishment of the animal model of glioma by monitoring bioluminescence. Subsequently, MSCs labeled with magnetic nanoparticles were injected intravenously and intranasally in immunodeficient glioblastoma mice model with U87MG cells and, ultimately, their migratory capacity was evaluated by both histological analysis and biodistribution of iron analysed by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma. Data were analyzed by using appropriate statistical tests and reported as mean and standard error. We observed through in vitro assays that labelling and further tracking of MSCs with nanoparticles was efficient, since it was possible to evidence the iron into the cell and these had a migratory tendency towards the magnetic field. Establishment of luciferase-expressing tumor line was effective, but the GFP transduction was not effective, since few cells were fluorescent. In the in vivo assays, after established of glioblastoma murine model, we observed a higher efficiency of intranasal administration route when comparing to endovenous route. Higher accumulation of iron in brain and a lower concentration in lungs were found in intranasal group, in comparison with intravenous route group. Thus, intranasal route has proven to be more effective and should be prioritized when the goal is to reach brain and reduce possible effects associated with accumulation of treatment in lungs.

Keywords: Mesenchymal stromal cells, magnetic nanoparticles, glioma, cancer, administration routes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cortes sagitais da cabeça murina e humana comparando as rotas de passagem para o cérebro quando se é feita administração intranasal. Adaptado de LI et al. (2018). Onde, as setas em cor azul representam a rota olfativa e em cor verde a rota trigeminal.....	4
Figura 2 – Fluxograma Experimental.....	10
Figura 3 – Protocolo de isolamento de células mesenquimais do lipoaspirado. Sendo, (A) Amostra de lipoaspirado coletada após cirurgia plastica; (B) Lipoaspirado incubado com tripsina; (C) Amostra após centrifugação; (D) Pellet contendo fração estromal; (E) Pellet em meio de cultivo.....	12
Figura 4 – Garrafa de cultivo com ímãs dispostos para seleção magnética.....	15
Figura 5 – Cronograma experimental in vivo. Sendo: (I) Controle – somente indução tumoral; (II) Via Intranasal – animais que receberam tratamento intranasal; (III) Via Endovenosa – animais tratados com injeção pela veia caudal lateral. Onde: MSCs+Nano: células mesenquimais marcadas com nanopartículas magnéticas; ICP-OES: espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente.....	17
Figura 6 – Camundongo em decúbito ventral preso por meio de barras intra-auriculares e dos dentes incisivos inferiores em aparelho estereotáxico.....	18
Figura 7 – Imobilização dos animais para injeção administração das MSCs+Nano. Sendo, (a) camundongo imobilizado para administração intranasal; (b) animal imobilizado por meio de aparato de contenção.....	20
Figura 8 – Análise fenotípica de células mesenquimais do tecido adiposo. Onde, as barras representam o percentual dos eventos detectados para a marcação com os anticorpos CD90-FITC, CD73-APC, CD105-PerCP-Cy TM 5.5, CD44-PE e Negativo correspondente aos anticorpos CD45, CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR.....	23
Figura 9 – Caracterização do tamanho e carga superficial das nanopartículas magnéticas dispersas em meio aquoso. Sendo, (A) tamanho hidrodinâmico; (B) potencial zeta. Onde, (nm) nanômetro; (mV) milivolts.....	24
Figura 10 – Eletromicrografia de transmissão das nanopartículas magnéticas.....	25

Figura 11 – Frequência de distribuição das nanopartículas obtidas por meio das fotomicrografias eletrônicas de transmissão. Onde, os valores do diâmetro estão representados pela mediana; nm – diâmetro em nanômetros; linha verde - curva gaussiana.....	25
Figura 12 – Marcação celular com nanopartículas magnéticas evidenciada com a coloração de Azul da Prússia. Sendo, (a) controle: MSCs cultivadas em meio sem nanopartículas, e (b) MSCs+Nano: MSCs marcadas por 24 horas com nanopartículas diluídas a 0,2 mg/mL. Barra: 100µm. Aumento: 400x.....	26
Figura 13 – 24 horas após a incubação das MSCs+Nano em garrafa de cultivo com imãs. Onde, a seta aponta para o ferro acumulado no formato da disposição dos imãs no final da garrafa. Os imãs foram retirados para esta fotografia.....	27
Figura 14 – Esquema das regiões da garrafa fotografadas. Sendo, (R1) região oposta aos imãs; (R2) região mediana; (R3) região das bordas dos imãs.....	28
Figura 15 – Fotomicrografias das diferentes regiões da garrafa. Sendo, (R1) região oposta aos imãs; (R2) região mediana; (R3) região das bordas dos imãs.....	29
Figura 16 – Sinal de bioluminescência das células U87MG. Sendo, A) Bioluminescência das células U87MG transduzidas (U87MG Luciferase) e não transduzidas (U87MG WT) na presença de D-luciferina; B) Valor médio da bioluminescência nos seis minutos de observação, expresso em fótons por segundo.....	30
Figura 17 – Microscopia de fluorescência das células U87MG expressando GFP. As células GFP positivas estão representadas em verde; A barra de escala é de 100 µm.....	31
Figura 18 – Representação da bioluminescência das células tumorais U87MG-luciferase enxertadas na região intraestriatal em cérebro de camundongos visualizada pelo equipamento Ivis Lumina XR. Sendo, (A) Medição da bioluminescência dos animais de cada grupo ao longo de 12 dias após a injeção; e (B) Fotografias de um animal enxertado e acompanhado ao longo de 12 dias. Todos os valores de bioluminescência estão representados em fótons/segundo/cm ² /sr, sendo a média e erro padrão do pico da atividade enzimática no tempo de vinte minutos.....	32
Figura 19 – Peso médio dos camundongos de cada grupo monitorados durante todo o período de experimental. Sendo, dia 1 correspondente ao dia da cirurgia e o dia 22 ao dia em que os animais foram sacrificados. Onde, o círculo vermelho corresponde ao dia em que as MSCs+Nano foram administradas.....	33

Figura 20 – Análise histológica do cérebro dos animais que receberam administração via nasal (A e B) e caudal (C e D). H&E – coloração com hematoxilina e eosina; PERLS – coloração com o método de Perls e contracoloração com vermelho neutro. Onde, (setas) – Ferro evidenciado em azul, (A) – grupo nasal corado com H&E; (B) – grupo nasal corado com PERLS; (C) – grupo caudal corado com H&E; (D) – grupo caudal corado com PERLS. Objetiva 20x e escala de 200 µm.....34

Figura 21 – Análise da biodistribuição do ferro em diferentes órgãos. Onde, Nasal – animais que receberam administração pela via intranasal; Caudal – animais que receberam administração endovenosa pela veia caudal. Os dados normalizados subtraindo do valor de ferro do grupo controle e estão representados como média e erro padrão. Sendo, (*) < 0,05; (**) < 0,01, correspondente à significância estatística em relação ao controle, determinada por ANOVA e pós-teste de Tukey.....36

Figura 22 – Peso relativo dos órgãos. Sendo, (%) percentual dos órgãos em relação ao peso corporal. Dados apresentados como média e erro padrão.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas de estereotáxica utilizadas neste estudo. Sendo, AP – anteroposterior, MD – mediolateral, DV – dorsoventral.....	19
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **cm²** Centímetro quadrado
- **μL** Microlitro
- **μm** Micrometro
- **μg/mL** Micrograma por mililitro
- **γ-Fe₂O₃** Maghemita
- **%** Porcentagem
- **BHE** Barreira hematoencefálica
- **DH** Diâmetro hidrodinâmico
- **Fe₃O₄** Magnetita
- **GBM** Glioblastoma multiforme
- **GFP** Proteína fluorescente verde
- **H&E** Hematoxilina e eosina
- **ICP-OES** Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
- **INCA** Instituto nacional do câncer
- **OMS** Organização mundial da saúde
- **MET** Microscopia eletrônica de transmissão
- **mg/kg** Miligrama por quilograma
- **mV** Milivolts
- **MSCs** Células mesenquimais
- **MSCs+Nano** MSCs marcadas com nanopartículas magnéticas
- **nm** Nanômetro
- **PDI** Índice de polidispersão
- **PBS** Tampão fosfato salino
- **SNC** Sistema nervoso central
- **UnB** Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O CÂNCER.....	1
1.1.1. GLIOBLASTOMA MULTIFORME E OS DESAFIOS.....	1
1.2. NANOTECNOLOGIA E O CÂNCER.....	4
1.3. CÉLULAS MESENQUIMAIS.....	5
1.3.1. HOMING E POTENCIAL CARREADOR.....	6
2. OBJETIVO.....	9
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. ETAPA 1 – IN VITRO.....	11
3.1.1. OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO (MSC)	11
3.1.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	12
3.1.2.1. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA.....	13
3.1.2.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	13
3.1.3. MARCAÇÃO DAS MSC COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MSCs+NANO).....	13
3.1.3.1. EVIDENCIAMENTO DO FERRO NA CÉLULA.....	13
3.1.3.2. MOBILIZAÇÃO MAGNÉTICA.....	14
3.1.4. OBTENÇÃO, CULTIVO E TRANSDUÇÃO DA LINHAGEM CELULAR U87MG	15
3.2. ETAPA 2 – IN VIVO.....	16
3.2.1. MODELO TUMORAL MURINO.....	17
3.2.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	17
3.2.3. INFUSÃO DAS MSCs+NANO.....	19
3.2.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	20
3.2.5. ANÁLISE DE BIODISTRIBUIÇÃO DO FERRO.....	21
3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. ETAPA 1 – IN VITRO.....	23

4.1.1. OBTENÇÃO E CULTIVO DAS MSCs	23
4.1.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	24
4.1.3. MARCAÇÃO DAS MSCs COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MSCs+NANO).....	26
4.1.3.1. EVIDENCIAMENTO DO FERRO NA CÉLULA.....	26
4.1.3.2. MOBILIZAÇÃO MAGNÉTICA.....	26
4.1.4. TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS U87MG.....	30
4.2. ETAPA 2 – <i>IN VIVO</i>	31
4.2.1. MODELO TUMORAL.....	31
4.2.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	33
4.2.3. BIODISTRIBUIÇÃO DE FERRO.....	35
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÕES.....	45
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. O CÂNCER

O câncer é o nome dado a um conjunto de doenças relacionadas responsáveis pelas maiores taxas de morte ao redor do mundo tanto em países mais ou menos desenvolvidos, sendo, em 2012, estimado cerca de 8,2 milhões de mortes (TORRE *et al.*, 2015). No geral, há uma aquisição de alterações genéticas relacionadas que desregulam diversos mecanismo ou vias fisiológicas importantes para o metabolismo celular e, por consequência, levando as células a adquirirem um perfil de crescimento descontrolado que resulta na formação de tumores e, muitas vezes, no potencial de invadir os tecidos adjacentes (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

1.1.1. GLIOBLASTOMA MULTIFORME E OS DESAFIOS

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) correspondem a 6% de todos os cânceres, sendo os gliomas astrocíticos os tipos mais frequentes, representando cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do SNC. As recentes estimativas do INCA para o biênio 2018-2019 são de cerca de 5.810 novos casos para homens e de 5.510 novos casos para mulheres para cada ano do biênio (INCA, 2017).

O Glioblastoma Multiforme (GBM) é originado nas células gliais (astrócitos) e constitui um astrocitoma de grau IV na classificação dos tumores do SNC estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (LOUIS *et al.*, 2016), o qual pode surgir de uma mutação "*de novo*" ou evoluir a partir de glioma de grau mais baixo (RENI *et al.*, 2017). Esse câncer também é conhecido por ser o tipo de tumor cerebral primário mais comum em adultos com mais de 45 anos e por sua agressividade. O caráter heterogêneo e alta instabilidade genética tornam esses tumores morfológicamente e epigeneticamente plásticos, sendo encontradas subpopulações de células geneticamente diferentes em uma mesma massa tumoral (WATKINS & SONTHEIMER, 2012; MULLINS *et al.*, 2013; ALTIERI *et al.*, 2014; HO & SHIM, 2017).

Além disso, o microambiente também é heterogêneo, sendo composto pelas células tumorais, células-tronco tumorais, células estromais e do sistema imune recrutadas pelo próprio tumor e que, por sua vez, afetam o comportamento do mesmo (BUSSARD *et al.*, 2016). Onde, dentre as células não cancerosas que vão ser recrutadas pelo tumor para compor este microambiente, estão: as células mesenquimais do cérebro e da medula óssea, adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, células parenquimatosas, macrófagos do tipo M2, linfócitos T

reguladores, células supressoras derivadas de mielóide (CHARLES *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2013; HAMBARDZUMYAN & BERGERS, 2015; BUSSARD *et al.*, 2016; HO & SHIM, 2017; SHAHAR *et al.*, 2017).

Outra característica do microambiente é a hipóxia que, segundo HO & SHIM (2017), foi vista como tendo uma distribuição espacial heterogênea dentro do tumor, o que segundo os autores seria um indicativo de que as diferentes células dentro da massa tumoral estariam respondendo de forma diferenciada à essa característica, contribuindo para uma maior heterogeneidade do tumor à nível molecular e metabólico (KEFAS *et al.*, 2013), pois contribuem para a secreção de diversos fatores envolvidos na promoção da angiogênese, inflamação, indução da transição epitelial-mesenquimal (WEI *et al.*, 2011; JAIN, 2013; HAMBARDZUMYAN & BERGERS, 2015; MAGAÑA-MALDONADO *et al.*, 2016) e que, também, estariam contribuindo para a proteção das células à ação das terapias existentes (STAEDTKE *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2016; JAWHARI *et al.*, 2016).

Toda essa complexa rede de interações celulares ocorrendo dentro do tumor está diretamente relacionada ao aumento da malignidade e resistência à terapia, (ressecção cirúrgica máxima seguida de radioterapia e quimioterapia), o que leva as altas taxas de reincidência desses tumores (STUPP *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2012; BUSSARD *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2016; HO & SHIM, 2017).

Uma das grandes limitações para o tratamento efetivo de tumores cerebrais é a presença da barreira hematoencefálica (BHE), que tem a função de proteger o SNC física e fisiologicamente e, por isso, acaba dificultando a passagem de agentes terapêuticos administrados por vias sistêmicas e leva a necessidade de um tratamento mais invasivo por meio da administração direta no cérebro (HUYNH *et al.*, 2006; LAQUINTANA *et al.*, 2009; OBEROI *et al.*, 2016).

Além disso, a localização da massa tumoral em regiões importantes ou de difícil acesso no cérebro impede a total remoção e tratamento, resultado na assustadora estimativa de sobrevivência dos pacientes variando entre 12-15 meses (SNEED *et al.*, 1998; LACROIX *et al.*, 2001; KOIZUMI *et al.*, 2011; WATKINS & SONTHEIMER, 2012; MAHIMOUDI & HADJIPANAYIS, 2014). Não se pode esquecer, também, os sintomas associados que comprometem a qualidade de vida, podendo até mesmo limitar a continuidade do tratamento, os quais podem variar de acordo com a localização da massa tumoral, como: (1) dor de cabeça persistente, (2) visão dupla ou turva, (3) vômito, (4) perda de apetite, (5) mudanças de humor e personalidade, (6) mudanças na capacidade de pensar e aprender, (7) convulsões e outros (GAZZOTTI *et al.*, 2011; DIRVEN *et al.*, 2016; RENI *et al.*, 2017).

Dentre todos os desafios enfrentados para se combater o GBM, o principal é a entrega de agentes terapêuticos de forma eficaz (CHAREST *et al.*, 2013; MIYAI *et al.*, 2017). Dentre as vias diretas mais utilizadas, estão: (1) administração diretamente na massa tumoral; (2) intracerebroventricular; ou (3) vias semelhantes que permitam a entrega direta ao líquido cefalorraquidiano, mas que por serem vias altamente invasivas, representam um grande risco aos pacientes e não podem ser utilizadas em todos os casos, devido a variação da acessibilidade da massa tumoral em cada paciente e, também, não permitem uma distribuição eficaz do tratamento no tumor (LAQUINTANA *et al.*, 2009; OBEROI *et al.*, 2016; ORUNOGLU *et al.*, 2017). A via endovenosa também é bastante utilizada devido a facilidade de acesso, todavia, por causa da BHE e a circulação sistêmica, esta via pode levar a uma gama de efeitos adversos associados e necessidade de doses elevadas para que fármaco/tratamento consiga atingir o tumor na concentração ideal (HUYNH *et al.*, 2006; LAQUINTANA *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2016; ORUNOGLU *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, visando uma administração não invasiva, tem crescido o interesse e o número de estudos sobre a aplicação de terapias via intranasal (REITZ *et al.*, 2012; PINEDA *et al.*, 2017; SEKERDAG *et al.*, 2017; SHOBO *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2017). Como demonstrado por LI *et al.* (2018), esta via elimina a necessidade de ultrapassar a BHE visto que, uma vez na cavidade nasal, o tratamento pode seguir pela rota olfativa ou trigeminal e chegar direto ao cérebro (Figura 1). Porém, mesmo promissora, ainda há um decaimento da eficácia na distribuição dos fármacos livres através do cérebro à medida em que o tumor se torna mais distante/infiltrado (BALYASNIKOVA *et al.*, 2014; OBEROI *et al.*, 2016).

Como dito por OBEROI *et al.* (2016), a maior limitação no tratamento de GBM ainda é a entrega ineficaz dos medicamentos ao tumor. Portanto, até aqui, fica clara a necessidade de se investigar novas estratégias que permitam uma maior/total eliminação das células tumorais e, conseqüentemente, garantam um aumento e melhora da expectativa de vida dos pacientes (WALID, 2008; ROY *et al.*, 2015).

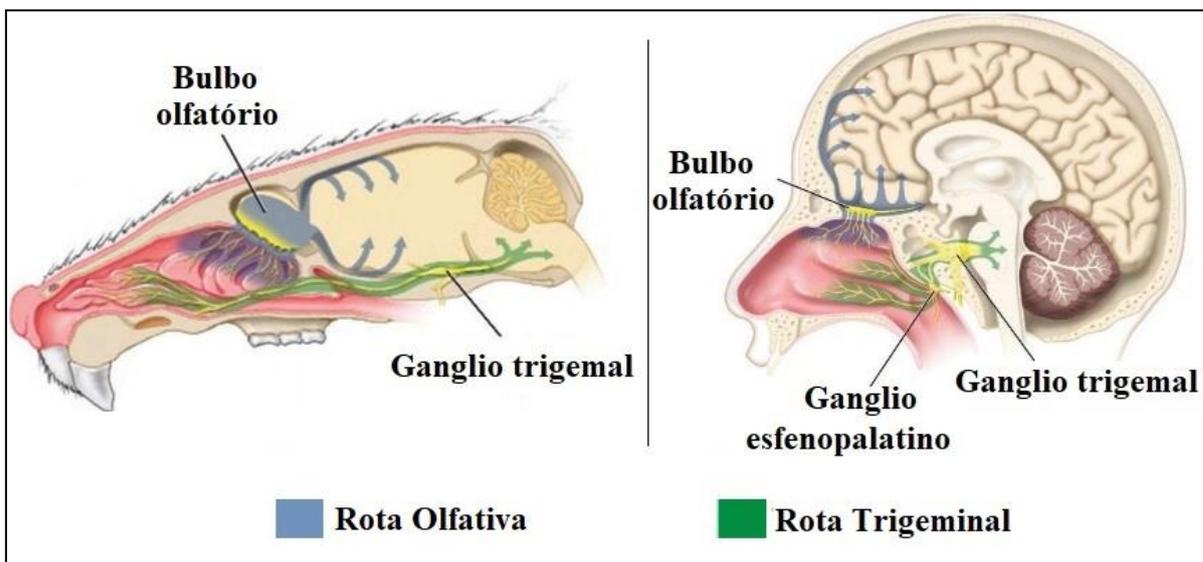


Figura 1 - Corte sagital da cabeça murino e humana comparando as rotas de passagem para o cérebro quando se é feita administração intranasal de tratamento. Adaptado de LI *et al.* (2018). Onde, as setas em cor azul representam a rota olfativa e em cor verde a rota trigeminal.

1.2. NANOTECNOLOGIA E O CÂNCER

A nanotecnologia é o estudo de materiais em escala nanométrica que vem ganhando espaço nos estudos para aplicações biológicas e médicas (SALATA, 2004; SAHOO *et al.*, 2007). Essa área tem sido considerada um dos mais novos campos de pesquisa e desenvolvimento, tendo suas contribuições na área medicina aumentado nas últimas décadas, dando uma nova face, inclusive nos tratamentos oncológicos (YANG *et al.*, 2011; JOANITTI *et al.*, 2017).

Diversos tipos de nanoestruturas já foram desenvolvidas (lipossomas, lipídicas sólidas, nanoemulsões, nanocapsulas, de ouro, poliméricas, magnéticas e outras) e seu uso levou a grandes avanços nas pesquisas contra o câncer, pois permite: o encapsulamento de fármacos, uma entrega direcionada ao tumor e/ou microambiente, maior distribuição na região tumoral e liberação controlada do fármaco que, conseqüentemente, tem gerado respostas mais efetivas e com menos efeitos adversos (BAETKE *et al.*, 2015; SPRING *et al.*, 2015; HODGKINSON *et al.*, 2017; GANASSIN *et al.*, 2018).

As nanopartículas magnéticas tem sido bastante estudadas devido a sua biocompatibilidade, sendo, normalmente, compostas por óxido de ferro como a magnetita (Fe_3O_4), podendo ser combinada com diferentes íons (ZHAO *et al.*, 2009; SABELLE *et al.*, 2015; GHAZANFARI *et al.*, 2016), o que lhes confere um comportamento magnético quando

expostas a um campo magnético (MAHMOUDI *et al.*, 2011; PERECIN *et al.*, 2016; KAUR *et al.*, 2016; SEKERDAG *et al.*, 2017).

Os seus efeitos têm sido investigados para as mais diversas aplicações como, por exemplo, para marcação celular para acompanhamento *in vivo* (AKHAN *et al.*, 2015; LIANG *et al.*, 2016), carreamento de fármacos ou terapia gênica (ZHANG *et al.*, 2016; ANTONOW *et al.*, 2017), engenharia tecidual (SHI *et al.*, 1999; THIAN *et al.*, 2006), marcação e separação de populações de células de interesse (RADISIC *et al.*, 2006), hipertermia magnética (QUINTO *et al.*, 2015; KALBER *et al.*, 2016) e outros.

Entretanto, ainda se faz necessário escolher a melhor via para uma administração eficaz e segura para tumores invasivos, como o GBM (MAHMOUDI & HADJIPANAYIS, 2014), objetivando uma aplicação não invasiva e perda excessiva do tratamento, decorrente de extravasamento e eliminação comum em via sistêmica (MAHMOUDI *et al.*, 2011; MAIER-HAUFF *et al.*, 2011; SHEVTSOV & MULTHOFF, 2016; ARGIBAY *et al.*, 2017).

1.3. CÉLULAS MESENQUIMAIS

As células mesenquimais (MSCs – do *inglês* mesenchymal stromal cells) são células multipotentes, indiferenciadas e, de acordo com a Sociedade Internacional para Terapia Celular, devem: (1) aderir ao plástico e ter morfologia semelhante a fibroblastos; (2) ter a capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares distintas *in vitro*, como osteoblastos, adipócitos e condrócitos; e (3) possuir o seguinte perfil imunofenotípico: CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺ e CD45⁻, CD34⁻ e CD14⁻ (DOMINICI *et al.*, 2006; BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

A facilidade de obtenção das mais variadas fontes gera grande interesse em seu estudo, podendo ser isoladas da polpa de dente decíduo, medula óssea, cordão umbilical, placenta, tecido adiposo, fluxo menstrual e entre outras (MEIRELLES *et al.*, 2006; BARBOZA *et al.*, 2014; SIBOV *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2015; POTDAR *et al.*, 2015; SECUNDA *et al.*, 2015; SASSO *et al.*, 2017).

As MSCs isoladas do tecido adiposo têm sido bastante estudadas em virtude do seu rápido crescimento *in vitro*, potencial de diferenciação semelhante as células isoladas da medula óssea e, principalmente, devido a facilidade de obtenção, visto que há uma alta demanda de cirurgias de lipoaspiração, o que possibilita de isolar uma grande quantidade de células de um tecido que, normalmente, seria descartado, facilitando até mesmo o seu uso comercial (BERTASSOLI *et al.*, 2013; MAHMOUDIFAR & DORAN, 2015)

O interesse geral nas MSCs se deve às suas diversas funções, sendo a engenharia tecidual a mais conhecida, em virtude da sua capacidade de diferenciação em vários tipos celulares (RODRIGUEZ-FUENTES *et al.*, 2015; SASSO *et al.*, 2017). Outros usos potenciais são sua utilização em estudos que visam melhorar a regeneração tecidual devido seus efeitos parácrinos (SASSO *et al.*, 2017; WATANABE *et al.*, 2018) e, também, a sua utilização para carreamento de terapias até uma região lesionada ou tumor (YONG *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2017; MENG *et al.*, 2018).

1.3.1. HOMING E POTENCIAL CARREADOR

A capacidade inata de migração das MSCs, também conhecida como *homing*, não está totalmente esclarecida, mas é a base para o tratamento com células, visto que as confere capacidade de se acumular ao redor de tecidos lesionados (SHAH *et al.*, 2008; ROGER *et al.*, 2010; CARBAJAL *et al.*, 2011; KOIZUMI *et al.*, 2011; SHAH, 2016), o que as torna potenciais carreadores para levar agentes anticâncer direto para o local do tumor e, até mesmo, para micrometástases (LI *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018).

Até o momento, o que se sabe é que fatores presentes no microambiente tumoral estariam direcionando a migração das MSCs para aquele local (CHUTE, 2006; HUANG *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018). Acredita-se fatores solúveis, como quimiocinas, estariam sendo secretados pelo tumor e atraindo as MSCs, bem como as regiões de hipóxia e perfil inflamatório característicos do microambiente (GUAN & CHEN, 2013; BAJETTO *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2017), estariam envolvidos no aumento da permeabilidade vascular para induzir o *homing* e a enxertia de MSCs no tumor (JACOBS *et al.*, 2013; BEHNAN *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; SHAHAR *et al.* 2016; YIN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018), onde irão auxiliar diversas funções do tumor (HONG *et al.*, 2014; BREZNIK *et al.*, 2017).

Sabendo das poucas opções de tratamentos disponíveis na clínica e do seu limitado efeito terapêutico para pacientes com tumores cerebrais, uma variedade de estudos tem buscado investigar o papel das MSCs como potenciais carreadores de terapias para se combater esses tumores (NAKAMIZO *et al.*, 2005; BAJETTO *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018). Dentre as terapias testadas para gliomas, pode-se citar o carreamento de vírus oncolíticos (YONG *et al.*, 2009), terapia gênica (NAKAMIZO *et al.*, 2005; ALTANER, 2008; BALYASNIKOVA *et al.*, 2014; DE MELO *et al.*, 2015), fármacos livres ou nanoestruturados (LI *et al.*, 2011; AUFFINGER *et al.*, 2013; PACIONI *et al.*, 2015) e outros.

Em seu trabalho, YONG *et al.*, (2009) analisaram a capacidade de MSCs em carrear vírus oncolítico até enxerto de células de glioma no cérebro de camundongos, após serem injetadas na artéria carótida direita. Ao final, foi observada a inibição do crescimento do glioma nos animais tratados e, conseqüentemente, aumento de 30-40% na sobrevivência média a longo prazo.

Um outro estudo com resultados interessantes foi o de PACIONI *et al.* (2015), onde se investigou a eficiência das MSCs em carrear e liberar controladamente o quimioterápico paclitaxel em um modelo ortotópico de glioma, quando injetadas diretamente no cérebro em uma região adjacente ao tumor. Os resultados mostraram que as MSCs tiveram uma boa capacidade migratória até tumor, independente da presença do fármaco intracelular, e foram capazes de fazer a liberação de forma eficiente, o que resultou na regressão do tumor e nenhum dano colateral ao tecido normal.

Concomitantemente, tem-se investigado a capacidade de migração dessas células quando administradas por diferentes vias objetivando assim, facilitar a aplicação de terapias e estabelecer protocolos que evitem riscos aos pacientes decorrentes da necessidade de injeção intracerebral (REAGAN & KAPLAN, 2011), como exemplo temos a via endovenosa (SMITH *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2016), intra-arterial (YONG *et al.*, 2009) e intranasal (BALYASNIKOVA *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2017).

No que diz respeito aos tratamentos feitos pela via endovenosa, há alguns fatores que limitam o uso dessa via (KURTZ *et al.*, 2008; LEIBACHER & HENSCHLER, 2016; LI *et al.*, 2018), pois há uma diluição do tratamento no sangue e nem tudo chega ao cérebro, visto que devido ao tamanho dos capilares boa parte tende a ficar presa nos pulmões, podendo resultar em agregados que levam a embolias e hemorragias, além do tratamento ser distribuído para outros órgãos, principalmente o fígado, o baço e os rins (GAO *et al.*, 2001; SCHREPFER *et al.*, 2007; FISHER *et al.*, 2009; SHEN *et al.*, 2015; SCHMUCK *et al.*, 2016; MARQUINA *et al.*, 2017). Podendo, dessa forma, reduzir a eficácia terapêutica, representar riscos aos pacientes e muitas vezes piorar o quadro clínico (LEIBACHER & HENSCHLER, 2016).

Visando um tratamento menos invasivo e mais seguro, a via intranasal (Figura 1) tem se mostrado interessante para aplicação de MSCs carreando diferentes terapias (LI *et al.*, 2018), como ficou demonstrado no estudo de BALYASNIKOVA *et al.* (2014), onde foi avaliada a capacidade de MSCs expressando um ligante indutor de apoptose em migrar, após injetadas na cavidade nasal, para o cérebro em modelo murino de glioma, o que resultou na redução de tumor e aumento da sobrevivência média dos animais.

LI *et al.* (2015) sugerem que as diferentes respostas terapêuticas observadas podem estar relacionadas a falta de padronização da metodologia, visto que os estudos variam em diversos aspectos como a fonte das MSCs, modelo animal e a via de administração. Por isso, este estudo se propôs investigar o uso de células mesenquimais isoladas do tecido adiposo marcadas com nanopartículas magnéticas, de forma a comparar a eficiência da migração dessas quando injetadas pela via endovenosa e intranasal.

2. OBJETIVO

Comparar a eficiência de entrega de células mesenquimais administradas por duas diferentes vias, intranasal e endovenosa, em modelo murino de glioma.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento e cultivo das células mesenquimais do tecido adiposo (MSCs);
- Caracterização das nanopartículas magnéticas utilizadas como rastreadores;
- Marcação das MSCs com nanopartículas magnéticas (MSCs+Nano);
- Estabelecimento de linhagem celular tumoral U87MG com luciferase e GFP;
- Estabelecimento do protocolo de cirurgia estereotáxica para enxerto das células U87MG em camundongos;
- Avaliação do potencial uso da via intranasal e/ou via endovenosa para administração de MSCs+Nano;

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram divididos em duas etapas, sendo a primeira o estudo *in vitro* e a segunda estudo *in vivo*, conforme a Figura 2.

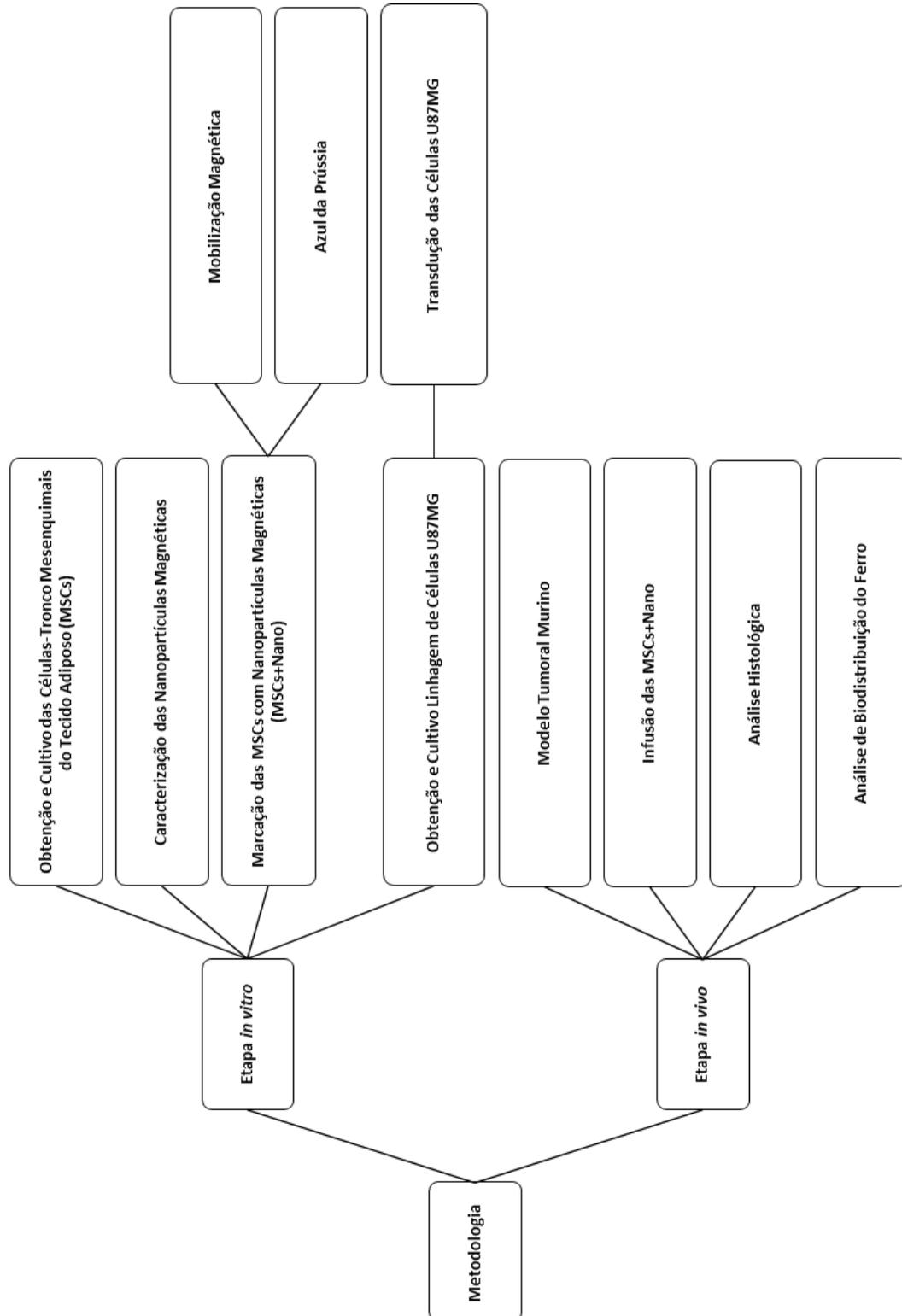


Figura 2 – Fluxograma Experimental.

3.1. ETAPA 1 – *IN VITRO*

3.1.1. OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO

As MSCs foram isoladas de amostras de lipoaspirado com a colaboração do médico cirurgião Dr. Carlos Augusto Carpaneda. As amostras de gordura foram coletadas pelo Dr. Carpaneda na Clínica Carpaneda de Cirurgia Plástica de forma estéril, onde, após a coleta, o lipoaspirado foi encaminhado para a sala de cultivo de células do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (UnB).

Para o isolamento das células, foi utilizado um protocolo previamente estabelecido e adaptado (Figura 3) com base em YARAK & OKAMOTO (2010) e ALVES *et al.* (2017), onde, em fluxo laminar, o lipoaspirado foi incubado com uma solução de tripsina-EDTA (GIBCO®), contendo 2,5 g/L de tripsina (1:250) e 0,38 g/L de EDTA em solução salina balanceada de Hank, sendo 10mL de tripsina a cada 20 mL de lipoaspirado, por 30 minutos a 37°C, sendo realizada uma agitação vigorosa a cada 5 minutos.

Após os 30 minutos, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 1400 rpm, e, em seguida, o sobrenadante contendo a fração adiposa foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de tampão fosfato salino (PBS), para lavagem e retirada dos resíduos de tripsina, e transferidas para outro tubo e centrifugadas novamente por 10 minutos. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo a fração estromal foi ressuspensionado em 5 mL meio de cultivo DMEM-HIGH (High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium – GIBCO®), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO®), antibiótico-antimicótico (GIBCO® – contendo 10000UI/ml de penicilina, 10000 µg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de Anfotericina B) e L-Glutamina (GIBCO - 10 µl/ml). Em seguida, foi transferido 1 mL da suspensão para cinco garrafas de 75cm² com mais 8 mL de meio de cultura.

Ao passar 48 horas do isolamento, foi feita a trocar parcial do meio de cultura e após mais 48 horas foram feitas duas lavagens com PBS para remoção dos debris e células não aderidas. As culturas de MSCs foram acondicionadas em estufa a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e 70% de umidade, sendo subcultivadas sempre que atingiram 80% de confluência e utilizadas até a terceira passagem celular.

Para confirmar o isolamento das células mesenquimais, foi utilizada a análise de marcadores específicos em citômetro de fluxo com auxílio do kit BD Stemflow™ hMSC Analysis, onde é possível verificar a presença de populações positivas (CD105-PerCP-

CyTM5.5/CD73-APC/CD90-FITC) e negativas (CD45/CD34/CD11b/CD19/HLA-DR PE) para a expressão marcadores específicos destas células.

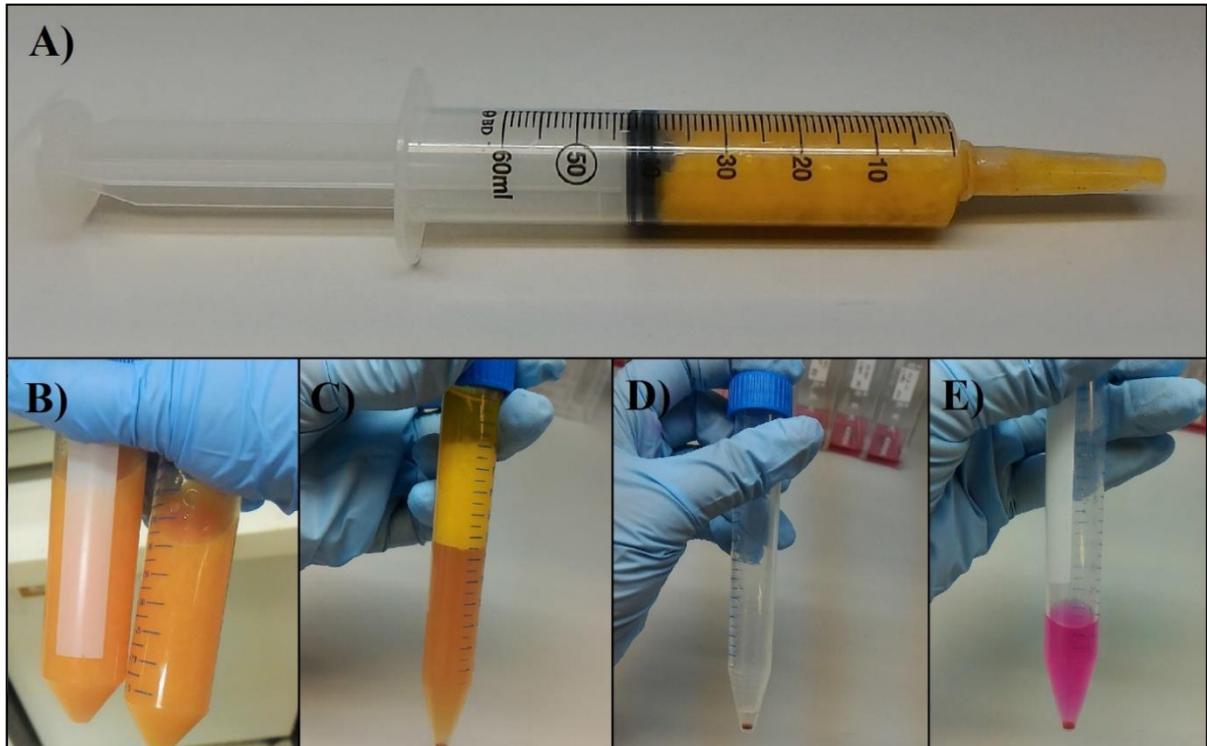


Figura 3 – Protocolo de isolamento de células mesenquimais do lipoaspirado. Sendo, (A) Amostra de lipoaspirado coletada pelo Dr. Carpaneda; (B) Lipoaspirado incubado com tripsina; (C) Amostra após centrifugação; (D) Pellet contendo fração estromal; (E) Pellet em meio de cultivo.

3.1.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas magnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) recobertas com citrato (maghemita-citrato) numa concentração de 58 mg/mL foram, gentilmente, cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa do Laboratório de Nanotecnologia Verde da Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia.

Após a obtenção, foi feita a caracterização do diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta e a caracterização estrutural com microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.1.2.1. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA

Os valores de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta foram obtidos como uma média de três leituras, sendo as nanopartículas diluídas em água Mili-Q (1:100, v:v) e a leitura realizada por meio do equipamento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcester-shire, UK) a 25 °C, localizado no Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia da UnB.

3.1.2.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

A análise das partículas por MET foi feita para determinar o tamanho médio e a forma das nanopartículas. Para tal, amostras foram diluídas em água Mili-Q (1:100, v:v) e uma alíquota de 10µL foi colocada em telas de cobre de 300 mesh, previamente cobertas com resina Formvar®, sendo deixadas para secar por 24 horas. Ao final, as partículas foram contrastadas em vapor do agente tetróxido de ósmio (1%, p:v) por 60 minutos e analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL JEM-1011). Após a obtenção das imagens, foi utilizado o *software* ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, USA) para determinar o diâmetro médio e obter a frequência de distribuição dos tamanhos.

3.1.3. MARCAÇÃO DAS MSCs COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MSCs+NANO)

Ao atingir 80% de confluência, seguindo o protocolo previamente estabelecido por KALBER *et al.* (2016), as MSCs foram expostas às nanopartículas maghemita-citrato (MSCs+Nano), adicionadas juntamente com o meio de cultivo sempre em uma concentração de 0,2 mg/mL por 24 horas.

3.1.3.1. EVIDENCIAMENTO DO FERRO NA CÉLULA

Para visualização da marcação celular com as nanopartículas de maghemita-citrato *in vitro*, 10⁵ MSCs foram plaqueadas em uma placa de 6 poços, divididas em dois grupos, em triplicata, sendo: (1) MSCs+Nano: células que receberam meio com nanopartículas; e (2) controle: meio sem nanopartículas.

Ao atingirem 80% de confluência, foi feita incubação com nanopartículas ou meio de cultivo. Após 24 horas, todos os poços foram lavados ao menos 3x com PBS para a retirada de nanopartículas não internalizadas. Em seguida, as células foram fixadas com metanol gelado por 5 minutos e lavadas com água destilada.

Para evidenciar o ferro, foi utilizada a coloração de Perls, a qual consiste numa solução 1:1 de ferrocianeto de potássio:ácido clorídrico com concentração final de 2% para cada um deles, durante 20 minutos, seguido por duas lavagens em água destilada. Logo após, as células foram contra coradas com uma solução vermelho rápido nuclear 0,5% (Sigma) por 10 minutos, seguido de lavagem com água corrente até que o excesso de corante fosse retirado. Ao final, as células foram visualizadas em microscópio óptico e fotografadas.

3.1.3.2. MOBILIZAÇÃO MAGNÉTICA

De forma a demonstrar a marcação das células com nanopartículas magnéticas e, conseqüentemente, sua capacidade de migrar na presença de um campo magnético, foram fixados quatro ímãs cilíndricos de neodímio (5,92 mm de diâmetro e 2,86 mm de espessura) na parte final de uma garrafa de cultivo de 75 cm² (Figura 4).

As MSCs foram marcadas com nanopartículas conforme o protocolo previamente descrito, e após 24 horas foram plaqueadas na garrafa com os ímãs, sendo incubadas em estufa a 37°C por mais 24 horas. Após esse tempo, foi analisada a migração das MSCs+Nano em direção a extremidade com os ímãs, por meio da visualização de diferentes regiões da garrafa em microscópio invertido (Invitrogen™ EVOS™ FL Auto Imaging System). Para uma melhor visualização foi feita a fixação com metanol e coloração com azul da prússia, conforme citado anteriormente.



Figura 4 – Garrafa de cultivo com ímãs dispostos para seleção magnética.

3.1.4. OBTENÇÃO, CULTIVO E TRANSDUÇÃO DA LINHAGEM CELULAR U87MG

As amostras de células da linhagem U87MG, considerada uma linhagem likely-glioblastoma e uma das mais utilizadas nos estudos deste tipo de câncer em modelo animal (CLARK *et al.*, 2010; ALLEN *et al.*, 2016), foram cedidas pelo laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica, localizado na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² com o meio de cultura completo, composto por Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (Gibco/Invitrogen Corporation) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO), antibiótico-antimicótico (GIBCO – contendo 10000UI/ml de penicilina, 10000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de Anfotericina B) e L-Glutamina (GIBCO - 10 µl/mL), numa incubadora umidificada (Thermo Fisher Scientific Inc. 3110, Waltham, MA) com 5% de CO² e uma temperatura de 37°C, sendo o meio de cultivo trocado a cada três dias, e subcultivadas sempre que atingem 80% de confluência ou congeladas em nitrogênio líquido para uso posterior.

Para o rastreamento da migração e proliferação das células U87MG implantadas, foi feita a transdução lentiviral conjugada de luciferase para rastreamento *in vivo* e GFP (proteína fluorescente verde) para detecção *ex vivo* (Firefly luciferase + eGFP Lentifect™ Lentiviral Particles - GeneCopoeia™).

Para isso foi utilizado duas garrafas pequenas de 25 cm² de células U87MG com 60% de confluência com 2 mL de meio de cultivo completo, sendo divididas em: grupo controle (negativa) e grupo da transdução (positiva), onde foi adicionado 2 µL do agente de transdução polybrene (Sigma-Aldrich®) em ambos os grupos e, em seguida, adicionado 100 µL da solução lentiviral conjugada no grupo positivo. Decorridos três dias da adição lentiviral, foi adicionada puromicina (Gibco®) em ambos os grupos numa concentração de 1,0 µg/mL para fazer a seleção das células de interesse. As células foram mantidas na garrafa até atingir 80% de confluência, quando foram criopreservadas e subcultivadas.

Para confirmação dos resultados, as células U87MG transduzidas foram plaqueadas em placa de 24 poços em duplicata, numa concentração de 10⁵ células, juntamente com células não transduzidas como controle. Ao atingir a confluência, foi utilizado o equipamento de imagem em tempo real IVIS® Lumina (XRIII, PerkinElmer, EUA) para confirmar a transdução com luciferase e visualizar a bioluminescência ao adicionar 10 µL de D-luciferina (Sigma-Aldrich) na concentração de 15 mg/mL em cada poço. Para confirmar a transdução com GFP, a mesma placa foi colocada em microscópio invertido de fluorescência (Invitrogen™ EVOS™ FL Auto Imaging System), onde foi utilizado o filtro GFP (excitação/emissão: 470/520 nm) e contraste de fase.

3.2. ETAPA 2 – *IN VIVO*

Após a finalização da etapa *in vitro*, o cronograma experimental do estudo *in vivo* ocorreu como descrito na Figura 5. Os animais receberam o enxerto de células tumorais e foram acompanhados 24 horas após a cirurgia, sendo a taxa de bioluminescência das células modificadas acompanhada por 12 dias. No dia 15, foi feita a administração das MSCs+Nano. A pesagem dos animais foi feita duas vezes por semana ao longo de todo o experimento. No dia 22, os animais foram sacrificados para análise histológica e da biodistribuição do ferro.

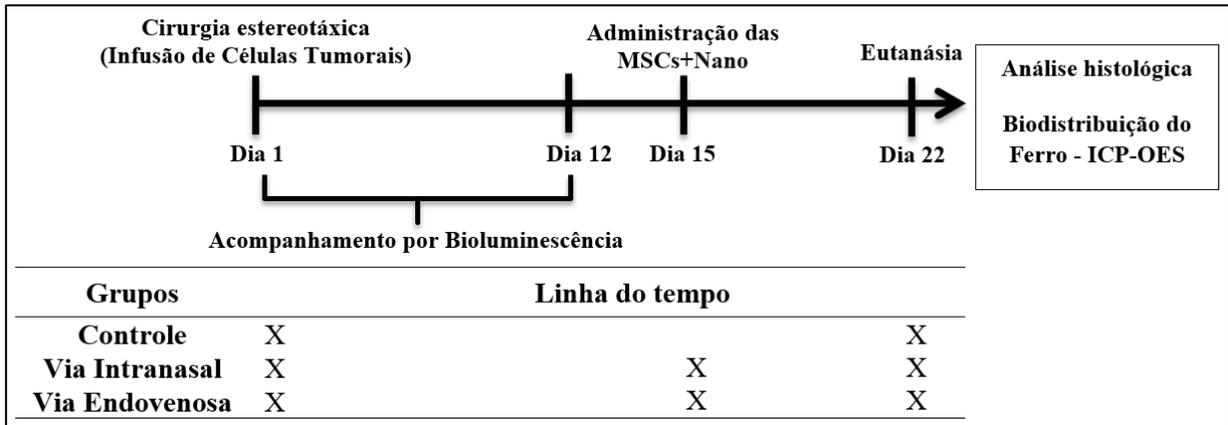


Figura 5 – Cronograma experimental *in vivo*. Sendo: (I) Controle – somente indução tumoral; (II) Via Intranasal – animais que receberam tratamento intranasal; (III) Via Endovenosa – animais tratados com injeção pela veia caudal lateral. Onde: MSCs+Nano: células mesenquimais marcadas com nanopartículas magnéticas; ICP-OES: espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente.

3.2.1. MODELO TUMORAL MURINO

Todos os princípios éticos sobre experimentação e manipulação animal foram respeitados e o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA – UnB) (certificado 28/2017).

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Nude (HFHIIINU) (machos) com idade entre 6-8 semanas, sempre mantidos no biotério do Departamento de Genética e Morfologia da UnB, com a temperatura mantida em aproximadamente 23°C, ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas e recebendo água e ração *ad libitum*.

Um total de 30 camundongos foram utilizados, sendo divididos em três grupos:

- **Controle (n=10)**: animais que receberam uma infusão de 5×10^5 células tumorais;
- **Via Intranasal (n=10)**: enxerto de 5×10^5 células tumorais e infusão de 10^6 MSCs+Nano pela via intranasal;
- **Via Endovenosa (n=10)**: enxerto de 5×10^5 células tumorais e infusão de 10^6 MSCs+Nano pela veia lateral caudal.

3.2.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Todos os animais foram sedados com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) via intraperitoneal e tiveram seu peso corporal mensurado duas vezes por semana ao longo de todo o experimento.

A metodologia utilizada para enxerto das células tumorais foi adaptada do trabalho de BREHAR *et al.* (2008), onde o animal foi fixado a um aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos®) em decúbito ventral por meio de barras intra-auriculares e dos dentes incisivos inferiores, conforme Figura 6. Em seguida, foi feita a assepsia da região superior da cabeça com iodopolvidine, seguido da aplicação cloridrato de lidocaína com hemitartrato de norepinefrina (Lidostesim® 3%, via subcutânea), onde foi feita uma incisão na pele da região dorsal do crânio e a remoção do periósteo com uma solução líquida de peróxido de hidrogênio para exposição do crânio e visualização do bregma.



Figura 6 – Camundongo em decúbito ventral preso por meio de barras intra-auriculares e dos dentes incisivos inferiores em aparelho estereotáxico.

Após a visualização do bregma, foi feita a medição (Tabela 1) do ponto para infusão das células U87MG expressando luciferase, seguindo as orientações do Atlas Estereotáxico de Paxinos e Franklin (2001), foi marcado sobre a tábua óssea as coordenadas em relação ao bregma e, em seguida, realizada a trepanação da calota óssea com uma broca dentária.

Tabela 1 – Coordenadas de estereotáxica utilizadas. Sendo, AP – anteroposterior, MD –mediolateral, DV – dorsoventral.

Local	Medidas (mm)
Estriado	+1,0 AP, +1,8 ML, -3,0 DV

Foi utilizada uma seringa Hamilton com auxílio de uma bomba de infusão para implantar 5×10^5 células U87MG em 4 μL de meio de cultura injetados lentamente por 10 minutos, após a injeção a seringa permaneceu no local por 5 minutos para evitar retração do líquido injetado.

Após a retirada da agulha, foi feito um capacete de acrílico para proteger a calota craniana, composto por resina acrílica (Dentbras[®], Brasil) polimerizada com acrílico líquido (Dentbras[®], Brasil), o qual foi fixado com auxílio de cola superbonder (Loctite[®]). Ao final, de modo profilático, foi passado em toda região ao redor do capacete uma pomada antibiótica própria para infecção de pele (Sulfato de Neomicina com Bacitracina Zíncica, Copyright[®] 2018 EMS Pharma).

O crescimento das células tumorais foi acompanhado duas vezes por semana em um período de 12 dias, através do equipamento IVIS[®] Lumina XR, onde foi possível determinar a taxa de crescimento das células tumorais por meio da análise da bioluminescência, após injeção intraperitoneal de 100 μL de D-luciferina (Sigma-Aldrich) na concentração de 15mg/mL. Durante todas as análises no IVIS LUMINA[®], os animais foram anestesiados com anestésico inalatório isoflurano na concentração de 1,5%. Foi determinado o pico da atividade enzimática da luciferina no tempo de exposição de 60 segundos em um total de vinte leituras.

3.2.3. INFUSÃO DAS MSCS+NANO

Quinze dias após a infusão das células tumorais, as MSCs+Nano foram marcadas conforme o protocolo previamente descrito e ressuspensas em uma concentração de 10^6 células, as quais foram centrifugadas novamente por 3 minutos, tendo o seu sobrenadante retirado, onde se seguiu o protocolo referente a via de administração utilizada.

Sendo, para a via intranasal foi tomado como base o protocolo adaptado de DANIELYAN *et al.* (2009), onde as MSCs+Nano foram ressuspensas em um volume total de 15 μL de meio de cultivo. Para a infusão, os animais foram anestesiados com isoflurano 1,5% para facilitar a imobilização e evitar reflexos para expelir a solução. Com auxílio de uma

micropipeta, um volume de 7,5 μ L da solução com células foi colocado em cada narina em um intervalo de tempo de sessenta segundos entre cada gota, permitindo que o animal aspirasse todo o líquido e evitando possíveis reflexos de deglutição ou de expelir o líquido (Figura 7a).

Já para a via endovenosa, os animais foram imobilizados em um aparato de contenção (Figura 7b) e um total de 10⁶ células marcadas com nanopartículas e diluídas em 100 μ L de meio de cultivo foi injetado na veia caudal lateral.

Todos os animais foram eutanasiados 7 dias após a infusão de MSCs+Nano.

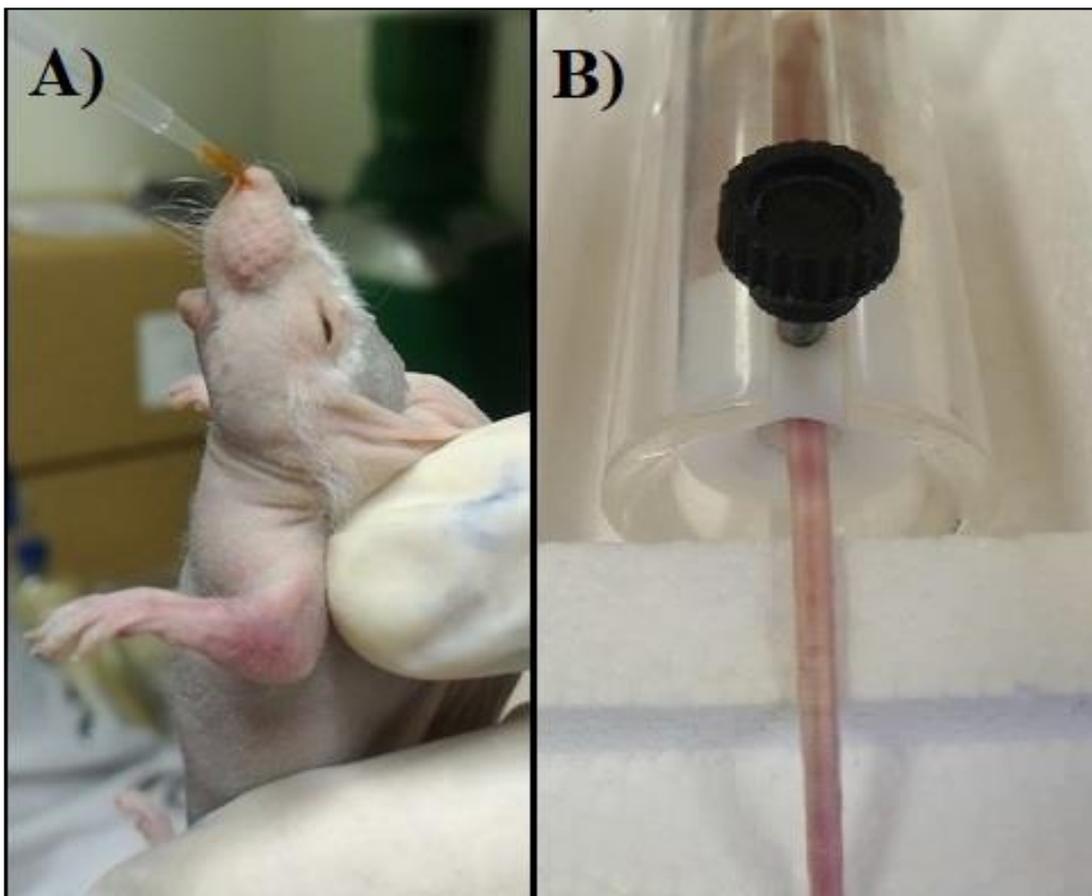


Figura 7 – Imobilização dos animais para injeção administração das MSCs+Nano. Sendo, (a) camundongo imobilizado para administração intranasal; (b) animal imobilizado por meio de aparato de contenção.

3.2.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a análise histológica, os animais (n=3 para cada grupo) foram sedados (ketamina 50 mg/kg e xilazina 5 mg/k) e sacrificados por meio de perfusão via transcardíaca com solução de PBS e em seguida paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (0,1 M), em seguida os cérebros

foram retirados e mantidos em paraformaldeído tamponado a 4% por 24 horas e, posteriormente, processados.

O processamento se deu por meio da desidratação em etanol com concentrações crescentes por 1 hora cada (70%, 80% e 90%) e em três diferentes soluções de etanol 100% por 1 hora cada. Em seguida, os cérebros foram colocados em uma solução de álcool:xilol (1:1) por 1 hora, seguido por 3 banhos em xilol por mais 1 hora cada e mais três banhos em parafina líquida a 60°C. Para a inclusão, os cérebros foram cortados coronalmente em duas bandas e, ao final, incluídos em fôrmas com parafina para obtenção do bloco.

Após emblocados, os cérebros foram cortados por completo em fatias coronais de 5µm com auxílio de um micrótomo, sendo os cortes feitos de forma seriada com descarte de dez cortes entre cada série e alocados em lâminas de vidro numeradas para que as duas colorações fossem feitas em regiões próximas.

Todas as lâminas foram processadas de forma semelhante, sendo sempre submetidas a três banhos sucessivos em xilol e mais três em álcool 100% (1 minuto cada), seguido de banhos em concentrações decrescentes de álcool (90%, 80% e 70%, todos por 1 minuto).

A partir deste ponto foi feito um processamento diferentes para as lâminas pares e ímpares, sendo utilizados os corantes:

- Hematoxilina e Eosina (H&E): banho em hematoxilina por 1 minuto e 2 minutos em eosina. Sempre com lavagens em água destilada entre um e outro para retirar o excesso.
- Azul de prússia (método de Perls para evidenciar em azul a presença de ferro): as lâminas foram colocadas em uma solução (1:1) contendo 2% de ferrocianeto de potássio e ácido clorídrico, submetidos a agitação suave. Após 30 minutos, foram feitas duas lavagens em água destilada, seguida de coloração por 10 minutos com uma solução vermelho rápido.

Após a coloração, foi feita a desidratação com concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e três banhos em 100%), seguido de três banhos consecutivos em xilol puro. Ao final, os cortes foram recobertos com verniz para colocação das lâminas, sendo as lâminas deixadas para secar por 24 horas e, posteriormente, analisadas utilizando EVOS FL Cell Imaging System (Life Technologies).

3.2.5. BIODISTRIBUIÇÃO DO FERRO

Afim de analisar de forma quantitativa a biodistribuição de ferro *in vivo*, após a injeção de MSCs+Nano, foi utilizada a análise por espectrometria de massa por plasma acoplado

indutivamente (ICP-OES). Para isso, os animais (n=5 por grupo) foram sacrificados com dose letal de anestésico (60 mg/kg) e os órgãos (cérebro, fígado, baço, rins e pulmões) foram coletados e congelados.

Para retirada total de água, os órgãos foram colocados em um liofilizador (L101 – LIOTOP), localizado no Departamento de Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UnB.

Após a secagem, foi iniciado o processo de digestão química, onde foi adicionado 1 mL de ácido nítrico 65% e esperado um período de 72 horas para total digestão de toda a massa, sendo esta a amostra estoque. Em seguida, foi preparada uma solução com água Milli-Q contendo 1% da amostra estoque (volume total de 10 mL)

Ao final, as amostras foram levadas ao Laboratório de Nanotecnologia Verde (UnB – Faculdade de Ceilândia, CEM04) para análise da concentração de ferro por meio de ICP-OES (PerkinElmer, Optima 8000) com base no protocolo já estabelecido de SOUSA *et al.* (2011).

3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão e avaliados estatisticamente por meio do teste mais indicado, utilizando o pacote estatístico SPSS 20 (IBM[®]), sendo para os resultados:

- Quantitativos: foi avaliada a normalidade. Para os dados normais foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. E para os dados não normais foi realizado o teste de Kruskal-Wallis.

Os gráficos foram criados utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0. Para todas as análises foi sempre considerado um intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

4.1. ETAPA 1 – *IN VITRO*

4.1.1. OBTENÇÃO E CULTIVO DAS MSCs

Para confirmar o isolamento de MSCs do lipoaspirado, as células foram caracterizadas conforme os marcadores específicos em citometria de fluxo (Figura 8), onde é possível ver populações positiva para os marcadores de superfície CD90 (100%), CD73 (99,7%), CD105 (97,4%) e CD44 (99,6%). Já para os marcadores CD45, CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR (Mix Negativo), apenas 12% das células foram positivas.

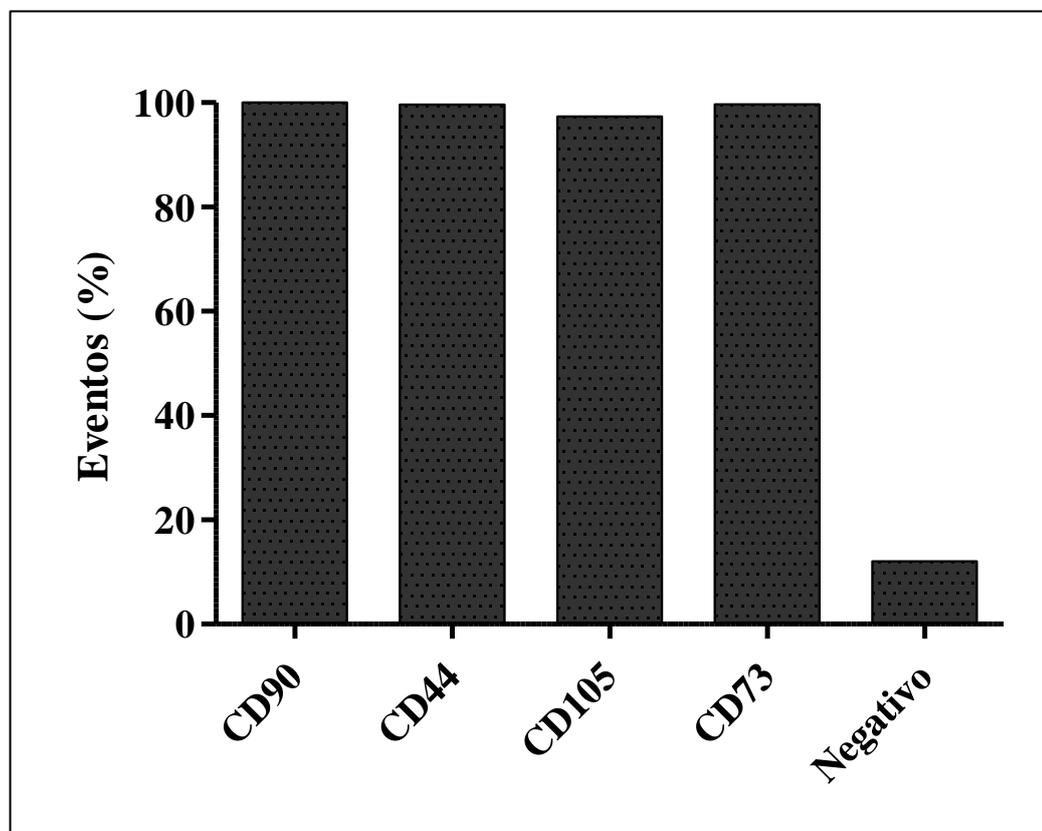


Figura 8 – Análise fenotípica de células mesenquimais do tecido adiposo. Onde, as barras representam o percentual dos eventos detectados para a marcação com os anticorpos CD90-FITC, CD73-APC, CD105-PerCP-CyTM5.5, CD44-PE e Negativo correspondente aos anticorpos CD45, CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR

4.1.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

As nanopartículas apresentaram o DH médio de $47,39 \text{ nm} \pm 1,070$, o PDI de $0,15 \pm 0,026$ e potencial zeta de $-0,103 \pm 0,188$ (Figura 9), o que significa que há uma distribuição homogênea do DH, mostrando que elas são monodispersas, e potencial zeta levemente negativo. A análise morfológica obtida por MET demonstrou que as nanopartículas utilizadas eram esféricas e homogêneas (Figura 10), sendo o diâmetro médio calculado foi de $6,3 \text{ nm}$ (Figura 11).

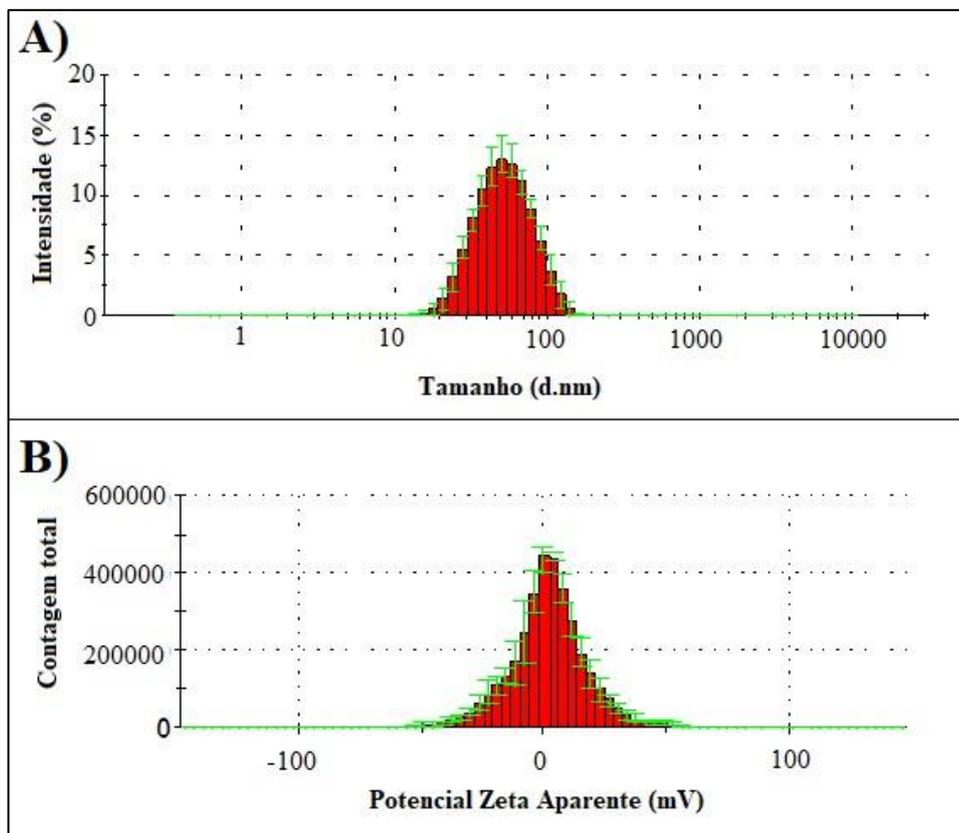


Figura 9 – Caracterização do tamanho e carga superficial das nanopartículas magnéticas dispersas em meio aquoso. Sendo, (A) tamanho hidrodinâmico; (B) potencial zeta. Onde, (nm) nanômetro; (mV) milivolts.

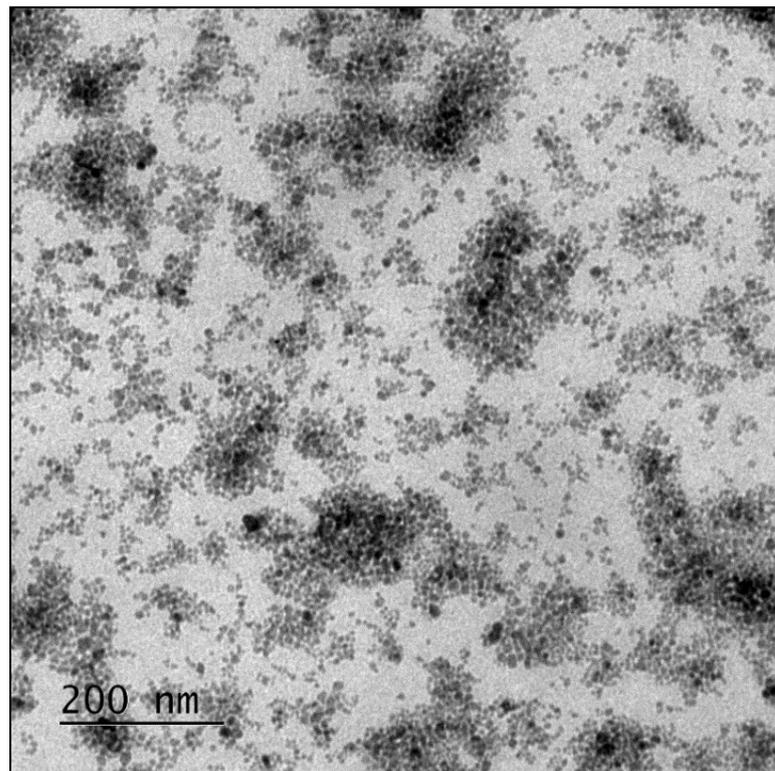


Figura 10 – Eletromicrografia de transmissão das nanopartículas magnéticas.

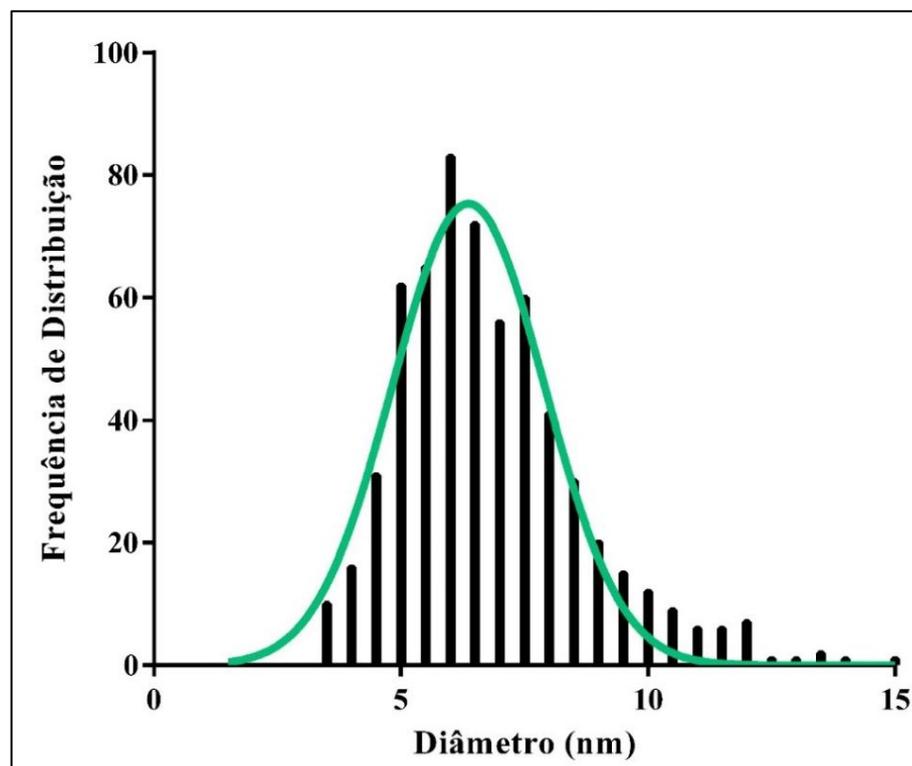


Figura 11 – Frequência de distribuição das nanopartículas obtidas por meio das fotomicrografias eletrônicas de transmissão. Onde, os valores do diâmetro estão representados pela mediana; nm – diâmetro em nanômetros; linha verde - curva gaussiana.

4.1.3. MARCAÇÃO DAS MSCs COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MSCs+Nano)

4.1.3.1. EVIDENCIAMENTO DO FERRO NA CÉLULA

Foi feita a coloração pelo método de Perls e contraste com vermelho rápido nuclear, onde é possível visualizar o ferro na cor azul, citoplasma rosado e núcleo avermelhado (Figura 12). No grupo controle (Figura 12a), é possível visualizar o citoplasma rosado e o núcleo rosado em tom mais escuro. Já no grupo MSCs+Nano (Figura 12b), há uma clara presença do ferro evidenciado em azul na região citoplasmática, sem nenhuma alteração morfológica nuclear (rosado em tom mais escuro) e manutenção do formato caracteristicamente fusiforme.

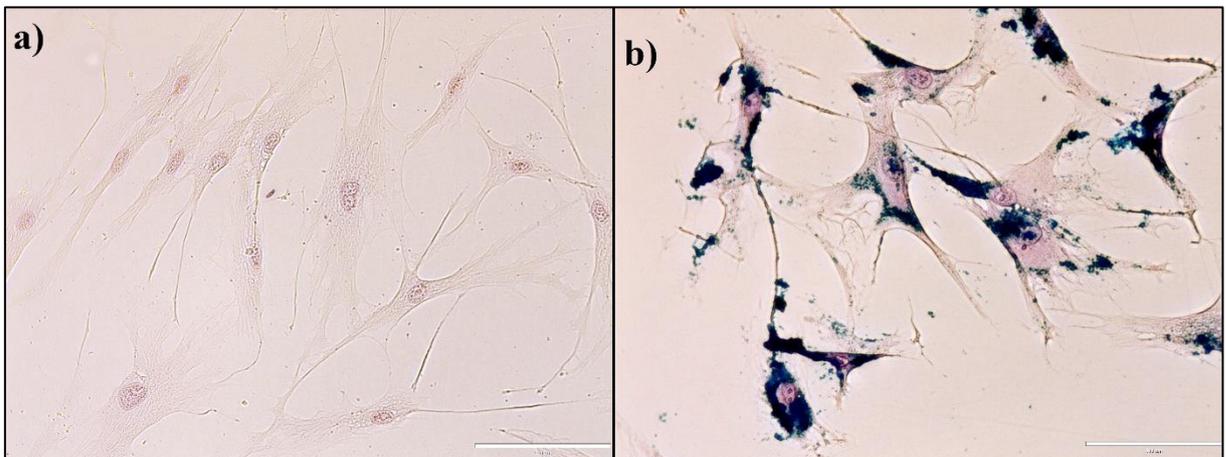


Figura 12 – Marcação celular com nanopartículas magnéticas evidenciada com a coloração de Azul da Prússia. Sendo, (a) controle: MSCs cultivadas em meio sem nanopartículas, e (b) MSCs+Nano: MSCs marcadas por 24 horas com nanopartículas diluídas a 0,2 mg/mL. Barra: 100µm. Aumento: 400x.

4.1.3.2. MOBILIZAÇÃO MAGNÉTICA

De forma a demonstrar a marcação das células com nanopartículas magnéticas e, conseqüentemente, sua capacidade de migrar na presença de um campo magnético, as células marcadas foram cultivadas em garrafa de cultivo com imãs.

Após 24 horas de incubação, os imãs foram retirados e é possível ver um grande acúmulo de ferro na região com os imãs (Figura 13). Em seguida, foi feita a coloração do ferro com o Azul da Prússia e para demonstrar que as células estavam migrando para a região com

os imãs, foram tiradas fotos de diferentes posições da garrafa de cultivo, como demonstrado na Figura 14, onde é possível perceber maior densidade celular nas regiões de borda dos imãs (Figura 15.R3), em contraste com a região mais distante ao imã e mediana (Figura 15.R1 e R2).



Figura 13 – 24 horas após a incubação das MSCs+Nano em garrafa de cultivo com imãs. Onde, a seta aponta para o ferro acumulado no formato da disposição dos imãs no final da garrafa. Os imãs foram retirados para esta fotografia.

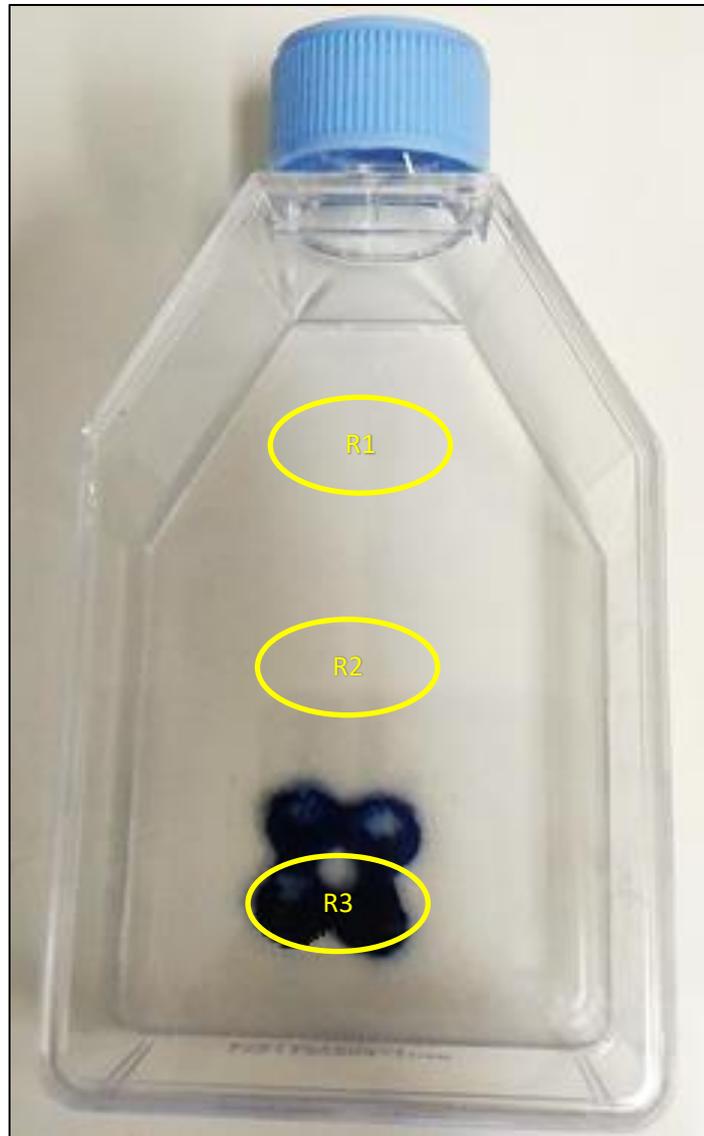


Figura 14 – Esquema das regiões da garrafa fotografadas. Sendo, (R1) região oposta aos imãs; (R2) região mediana; (R3) região das bordas dos imãs.

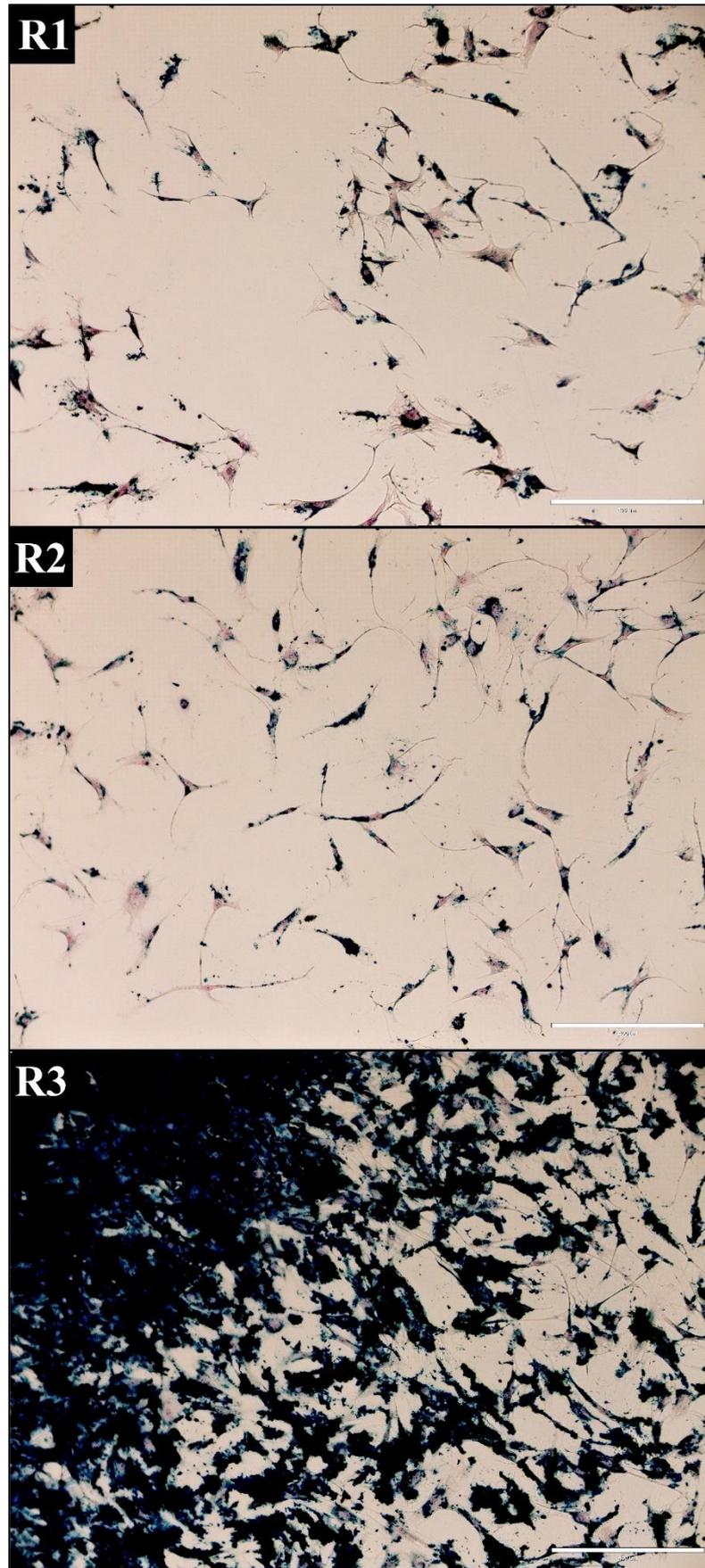


Figura 15 – Fotomicrografias das diferentes regiões da garrafa. Sendo, (R1) região oposta aos imãs; (R2) região mediana; (R3) região das bordas dos imãs.

4.1.4. TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS U87MG

Através do equipamento IVIS Lumina foi possível visualizar a bioluminescência expressa pelas células U87MG na presença da luciferina por um período de seis minutos (Figura 16), sendo o controle representado pelas células não transduzidas. Onde, é possível visualizar a bioluminescências das células transduzidas e a não expressão das células não transduzidas (controle), o que confirmou a transdução lentiviral positiva para luciferase.

Já na microscopia de fluorescência, conseguiu-se confirmar a presença de células positivas para GFP no grupo transduzido, porém nem todas as células expressaram essa característica (Figura 17). Isto pode ser devido ao fato destas células terem sido expostas à dois lentivírus diferentes, onde a capacidade de infecção do lentivírus GFP positivo pode ser menor do que o lentivírus positivo para luciferase.

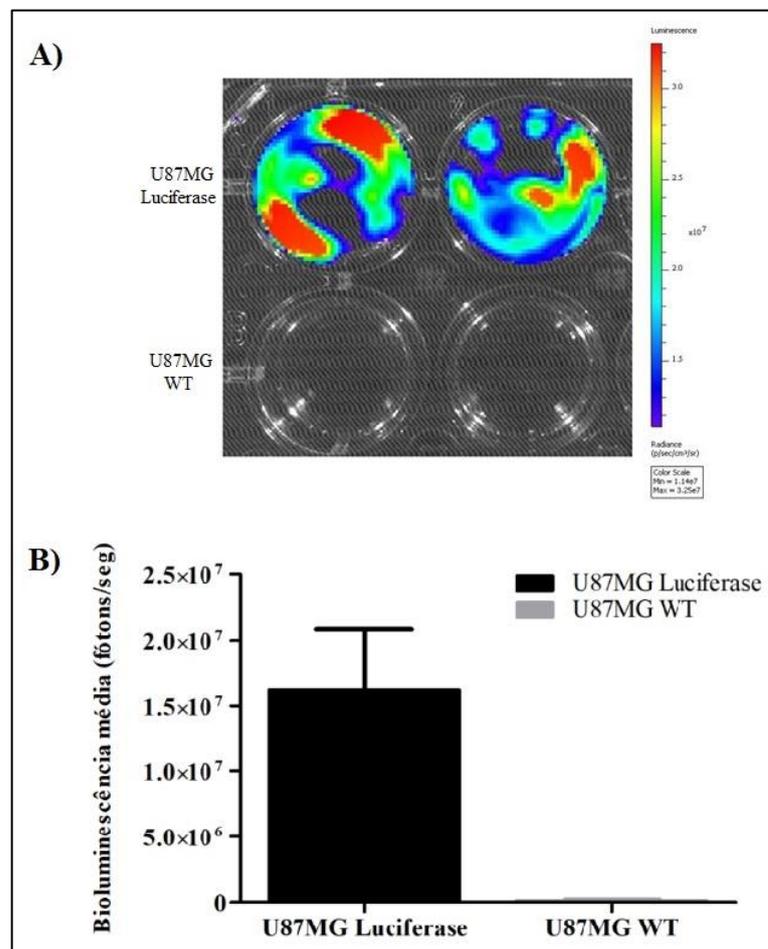


Figura 16 – Sinal de bioluminescência das células U87MG. Sendo, A) Bioluminescência das células U87MG transduzidas (U87MG Luciferase) e não transduzidas (U87MG WT) na presença de D-luciferina; B) Valor médio da bioluminescência nos seis minutos de observação, expresso em fótons por segundo.

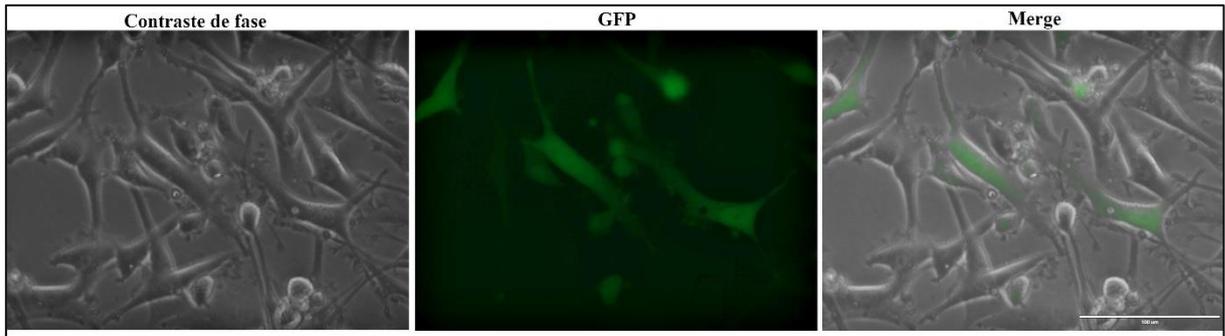


Figura 17 – Microscopia de fluorescência das células U87MG expressando GFP. As células GFP positivas estão representadas em verde; A barra de escala é de 100 µm.

4.2. ETAPA 2 – *IN VIVO*

4.2.1. MODELO TUMORAL MURINO

Na Figura 18 é possível observar os dados de bioluminescência expresso pelas células U87MG-Luciferase enxertadas no cérebro dos animais (região do estriado), onde é possível detectar que as células implantadas tendem a reduzir o sinal de bioluminescência em relação ao dia 1 após a cirurgia, possivelmente devido a morte celular de parte das células transplantadas. Porém, após o dia 10 foi observada uma tendência comum de crescimento do sinal, o que pode estar relacionado a estabilização/adaptação do local e, conseqüentemente, proliferação celular. É importante ressaltar que o sinal de bioluminescência está vindo exatamente da região mais à esquerda aonde foi feita a abertura e as células foram implantadas.

O monitoramento da variação de peso dos animais ao longo de todo o período de estudo está representado na Figura 19. Sendo o dia 1 correspondente ao dia da cirurgia e o dia 2 ao dia posterior a cirurgia, onde a perda de peso observada no dia 2 pode estar relacionada ao fato da cirurgia ser um procedimento longo, de no mínimo 45 minutos por animal, e, por isso, não permitindo que os animais se alimentassem normalmente devido a anestesia e tempo de recuperação. Não foi observada diferença estatísticas entre os grupos. Entretanto, não foi relatada nenhuma morte pós-cirúrgica ou em decorrência do crescimento tumoral.

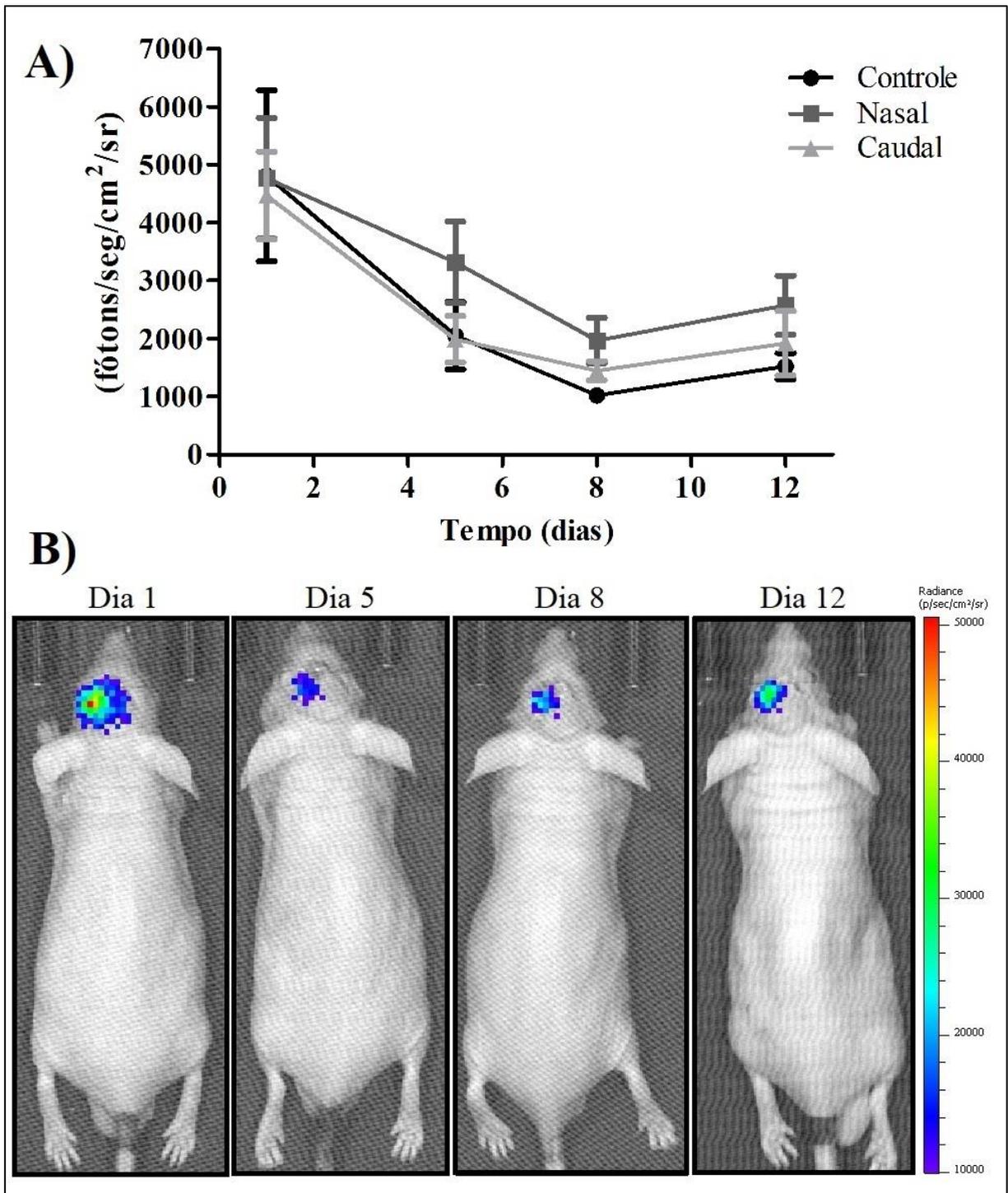


Figura 18 – Representação da bioluminescência das células tumorais U87MG-luciferase enxertadas na região intraestriatal em cérebro de camundongos visualizada pelo equipamento Ivis Lumina XR. Sendo, (A) Medição da bioluminescência dos animais de cada grupo ao longo de 12 dias após a injeção; e (B) Fotografias de um animal enxertado e acompanhado ao longo de 12 dias. Todos os valores de bioluminescência estão representados em fótons/segundo/cm²/sr, sendo a média e erro padrão do pico da atividade enzimática no tempo de vinte minutos.

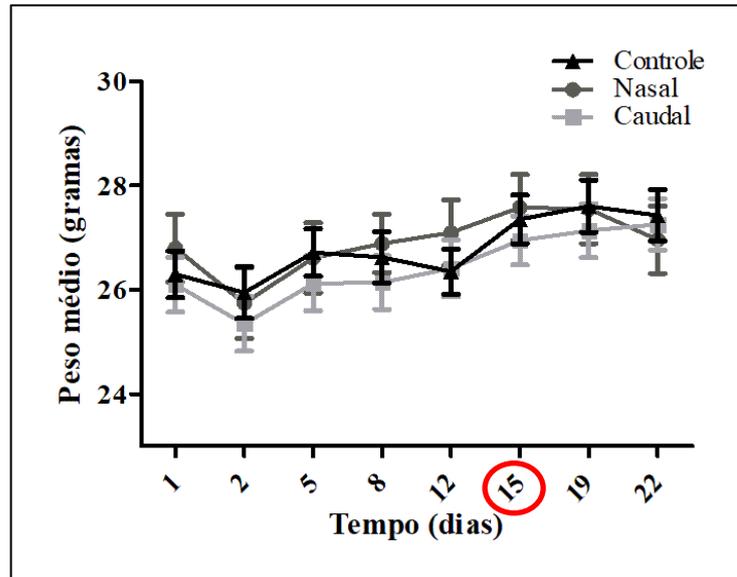


Figura 19 – Peso médio dos camundongos de cada grupo monitorados durante todo o período de experimental. Sendo, dia 1 correspondente ao dia da cirurgia e o dia 22 ao dia em que os animais foram sacrificados. Onde, o círculo vermelho corresponde ao dia em que as MSCs+Nano foram administradas.

4.2.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Na Figura 20, estão representados os cortes histológicos de cada grupo analisado (Nasal, Caudal e Controle) vinte e dois dias após a implantação do tumor e 7 dias após a administração de MSCs, onde é possível confirmar a presença do tumor em todos os grupos por meio da coloração com H&E, assim como detectado por meio da análise de bioluminescência acompanhada por doze dias (Figura 18). Sendo, um tumor com bordas delimitadas e alta densidade celular, conforme o esperado, mostrando que o modelo tumoral foi estabelecido com sucesso neste estudo.

Também foi possível detectar a presença de nanopartículas no cérebro dos animais que receberam administração de MSCs+Nano via intranasal e endovenosa, demonstrada por meio da técnica de Perls para coloração de ferro em azul (Figura 20), o que mostra a viabilidade de uso de ambas as vias de administração. Entretanto, no grupo que recebeu administração nasal é possível perceber um maior acúmulo de ferro na região do tumor, quando comparado com o grupo que recebeu administração por meio da veia caudal.

É importante ressaltar que, como esta é apenas uma caracterização qualitativa, não é possível quantificar o ferro, impossibilitando determinar qual via estaria permitindo uma maior acumulação do ferro no tumor. Apenas um animal morreu após a aplicação do tratamento endovenoso, não houve nenhuma morte em decorrência de administração ou relacionada ao possível crescimento do tumor.

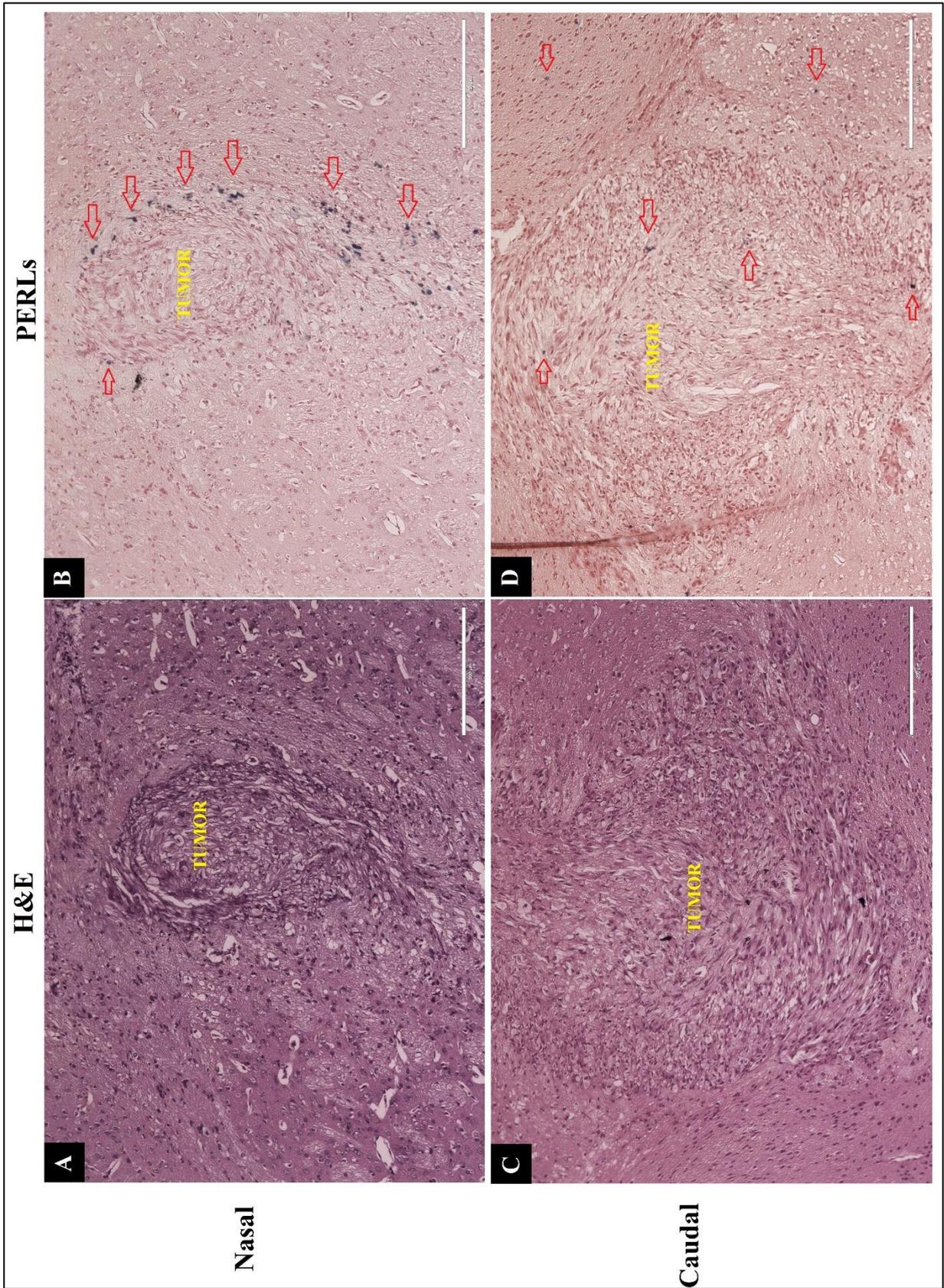


Figura 20 – Análise histológica do cérebro dos animais que receberam administração via nasal (A e B) e caudal (C e D). H&E – coloração com hematoxilina e eosina; PERLs – coloração com o método de Perls e contracoloração com vermelho neutro. Onde, (setas) – Ferro evidenciado em azul, (A) – grupo nasal corado com H&E; (B) – grupo nasal corado com PERLs; (C) – grupo caudal corado com H&E; (D) – grupo caudal corado com PERLs. Objetiva 20x e escala de 200 μ m.

4.2.3. BIODISTRIBUIÇÃO DE FERRO

Afim de determinar qualitativamente qual via permitiu uma entrega mais eficiente de ferro no cérebro, foi realizada a análise de biodistribuição por ICP-OES. Na Figura 21 podemos observar a concentração de ferro (ug/Kg) em cada órgão analisado. É importante ressaltar que essa análise faz a quantificação total de ferro, seja biológico ou proveniente das nanopartículas, por isso, os valores dos grupos nasal e caudal foram normalizados subtraindo a concentração obtida com a análise dos órgãos dos animais do grupo controle. O peso médio relativo de cada órgão dos grupos analisados está representado na Figura 22, onde não houve diferença estatística significativa.

A quantificação de ferro no cérebro do grupo nasal teve diferença estatística (representada por asteriscos) em relação ao controle, já o grupo caudal não teve diferença estatística, mostrando que há um aumento de ferro no cérebro nos animais que receberam tratamento intranasal, indicando que as MSCs+Nano estariam conseguindo penetrar nesse órgão.

Também foi detectada diferença na concentração do ferro nos rins dos animais que receberam administração intranasal, em relação ao controle, indicando que as MSCs+Nano estariam indo também para esse órgão sete dias após a administração. Já no pulmão, foi observada diferença significativa na concentração de ferro do grupo caudal, também em relação ao controle, o que pode estar relacionado a morte logo após a administração endovenosa, mencionada no item anterior, provavelmente em decorrência de uma possível formação de trombo ou embolia, visto que foi em menos de cinco minutos após a injeção.

A concentração de ferro no fígado e baço não apresentou diferença estatística em nenhum dos grupos analisados, o que pode estar indicando que o tratamento injetado não está sendo significativamente acumulado nesses órgãos no período de tempo analisado nesse estudo. Não foi encontrada significância estatística entre os grupos nasal e caudal, somente em relação ao controle.

Na tentativa de entender qual o percentual de ferro entre cada grupo, foi estimada a diferença em relação ao controle para cada órgão que deu diferença significativa (Figura 21), onde no cérebro temos um cerca de 25% a mais de ferro no grupo nasal e 11% no grupo caudal. Nos rins, temos 23% para o grupo nasal e 17% para o grupo caudal. Já nos pulmões, foi detectada cerca de 21% a mais na concentração de ferro no grupo caudal em relação ao controle e 7% para o grupo nasal.

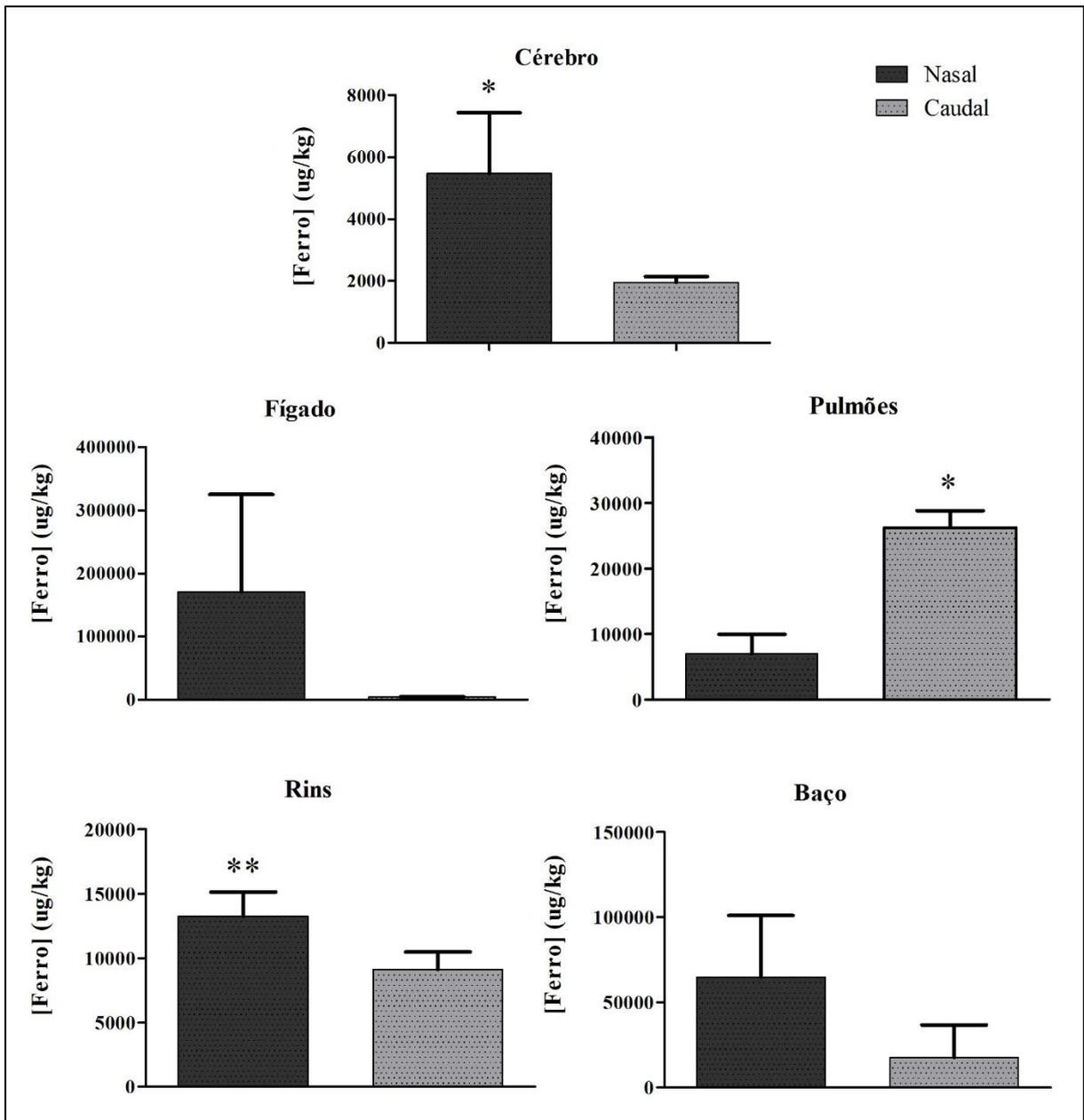


Figura 21 – Análise da biodistribuição do ferro em diferentes órgãos. Onde, Nasal – animais que receberam administração pela via intranasal; Caudal – animais que receberam administração endovenosa pela veia caudal. Os dados foram normalizados subtraindo do valor de ferro do grupo controle e estão representados como média e erro padrão. Sendo, (*) < 0,05; (**) < 0,01, correspondente à significância estatística em relação ao controle, determinada por ANOVA e pós-teste de Tukey.

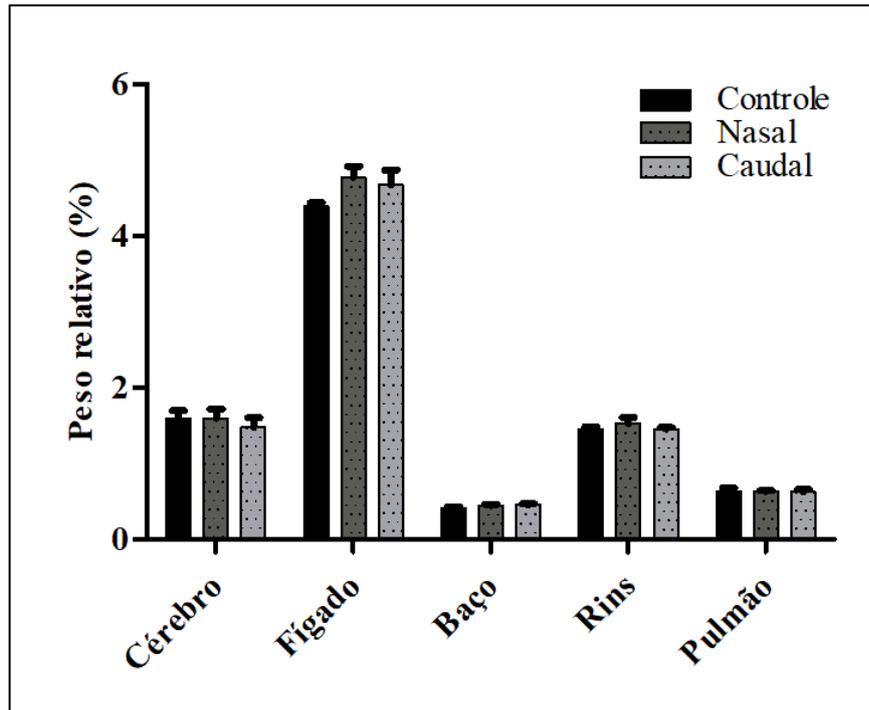


Figura 22 – Peso relativo dos órgãos. Sendo, (%) percentual dos órgãos em relação ao peso corporal.

Dados representados como média e erro padrão.

5. DISCUSSÃO

Nos dias de hoje, tratar pacientes com tumores cerebrais ainda representa um grande desafio, principalmente quando se trata de tumores invasivos e resistentes como o GBM (STAEDTKE *et al.*, 2015; HUANG *et al.* 2016; JAWHARI *et al.*, 2016; HO & SHIM, 2017; DENG *et al.*, 2018). O que justifica a alta taxa de mortalidade encontrada à nível mundial e a qualidade de vida comprometida dos pacientes com esta condição (GAZZOTTI *et al.*, 2011; MAHIMOUDI & HADJIPANAYIS, 2014; DIRVEN *et al.*, 2016; INCA, 2017; RENI *et al.*, 2017).

Dentre a principal dificuldade física encontrada quando se tenta tratar estes pacientes e que limita a eficácia das terapias existentes está a BHE, a qual existe como uma proteção biológica importante do sistema nervoso central, visando a retenção de agentes químicos ou partículas que possam comprometer a atividade cerebral e, por consequência, também é eficaz em impedir que as terapias injetadas por vias sistêmicas cheguem com eficiência ao tumor (LAQUINTANA *et al.*, 2009; KIM *et a.*, 2015; VAN TELLINGEN *et al.*, 2015; OBEROI *et al.*, 2016).

A limitação conferida pela BHE leva a necessidade de administração do tratamento direto no cérebro, a qual representa risco aos pacientes, e como alternativa usa-se também vias sistêmicas em conjunto com ou não com o rompimento temporário da BHE (HUYNH *et al.*, 2006; LAQUINTANA *et al.*, 2009; KIM *et a.*, 2015; VAN TELLINGEN *et al.*, 2015; OBEROI *et al.*, 2016; ARGIBAY *et al.*, 2017). Entretanto, esse rompimento é conhecidamente agressivo e arriscado por permitir passagem de diversas substâncias além da terapia antitumoral, o que expõe o paciente a infecções e possíveis efeitos colaterais (KIM *et a.*, 2015)

Sabendo que um dos principais desafios é administração de terapias a estes tumores (MIYAI *et al.*, 2017), tem surgido alguns estudos explorado a via de administração intranasal (REITZ *et al.*, 2012; PINEDA *et al.*, 2017; SEKERDAG *et al.*, 2017; SHOBO *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2017). O que se sabe, até o momento, é que ela permite a entrada do tratamento por duas possíveis rotas, representadas na Figura 1, por isso é considerada uma via não invasiva quando comparada com as outras disponíveis (LI *et al.*, 2018). Entretanto, apesar do potencial dessa via, ainda há uma baixa eficiência na entrega quando se administra fármacos livres (XI *et al.*, 2015).

Visando contrapor todas essas limitações e aumentar a entrega do tratamento ao tumor ou lesão, tem-se investigado o uso de MSCs como carreadoras de terapias, devido à possuírem capacidade migratória intrínseca ou *homing* para diferentes patologias (LABUSCA *et al.*, 2018).

Essas células vêm sendo testadas para aprimoramento das técnicas de entrega de terapias disponíveis como uma espécie de “cavalo de Tróia” e têm tido eficácia comprovada, tanto para entrega de nanoestruturas quanto para outros tipos de terapias e, também, para aprimoramento das técnicas de imagem (NAKAMIZO *et al.*, 2005; ALTANER, 2008; LI *et al.*, 2011; AUFFINGER *et al.*, 2013; BALYASNIKOVA *et al.*, 2014; DE MELO *et al.*, 2015; PACIONI *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2018).

Dentre as vias de administração já estudadas para aplicação de MSCs está a via endovenosa (WU *et al.*, 2008; JIAMING & NIU, 2015; ARGIBAY *et al.*, 2017), intranasal (BALYASNIKOVA *et al.*, 2014; SALAMA *et al.*, 2017), intra-arterial (ARGIBAY *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017) e aplicação diretamente no cérebro (CHOI *et al.*, 2011; JIAMING & NIU, 2015; YIN *et al.*, 2015; PACIONI *et al.*, 2017).

Apesar dos estudos disponíveis, ainda não há um consenso entre os pesquisadores sobre qual destas vias seria a mais indicada quando o objetivo é atingir o cérebro, seja para tratamento de lesões ou tumores. Por isso, buscou-se por meio deste estudo analisar e comparar duas vias mais comuns e com menor grau de invasividade em relação às vias mencionadas para aplicação de MSCs na tentativa de contribuir para o estabelecimento de um protocolo de administração para estudos futuros de carreamento de tratamentos, bem como analisar a possível distribuição em outros órgãos.

Uma das formas que se pode utilizar para analisar a migração de células é através de sua marcação com nanopartículas magnéticas, devido a sua biocompatibilidade comprovada, tamanhos variáveis que permitem a incorporação e retenção no citoplasma celular, facilidade de visualização no tecido por meio do método de Perls que evidencia o ferro em azul e outras análises quantitativas da concentração de ferro (GAMARRA *et al.*, 2010; MAMANI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016; WIERZBINSKI *et al.*, 2018), propriedades estas exploradas neste estudo.

As nanopartículas utilizadas neste estudo eram esféricas, monodispersas e com diâmetro médio de 6,3 nm, o que as caracteriza como nanopartículas superparamagnéticas e lhes confere propriedades magnéticas quando expostas a um campo magnético e retorno ao estado de repouso quando se retira o campo (SINGH *et al.*, 2010; BULL *et al.*, 2014; DENG *et al.*, 2018). O valor do DH das nanopartículas foi de aproximadamente 47,39 nm. Essa diferença em relação ao diâmetro médio encontrado pode ser explicada pelo fato de que o DH contabiliza a cobertura da partícula e seu movimento browniano em meio aquoso, o que faz com que a medida do espalhamento dinâmico de luz contabilize a frequência e amplitude desse movimento no solvente utilizado, diferente da análise do MET, a qual analisa as nanopartículas após secagem

ou cruas, ou seja, o seu cristal (DOMINGOS *et al.*, 2009; CLAYTON *et al.*, 2016; KAASALAINEN *et al.*, 2017).

A propriedade de atração magnética foi explorada aqui para demonstrar a marcação eficiente das MSCs, visto que há uma tendência em migrar em direção ao campo magnético em maior concentração (Figura 14 e 15), assim como relatado por outros autores que utilizaram ímãs para demonstrar a marcação de MSCs com nanopartículas magnéticas e, conseqüentemente, sua capacidade de mobilização magnética (NAKAMAE *et al.*, 2010; SHEN *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016; KOLECKA *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que mesmo as MSCs que ficaram longe dos ímãs tiveram ferro intracelular evidenciado em azul, o qual pode não ter sido suficiente para que possibilitasse a atração ou elas podem ter aderido antes de serem atraídas. Dessa forma, a marcação das MSCs foi eficiente e não houve detecção de alteração de sua morfologia caracteristicamente fusiforme ou deformação do núcleo celular (Figura 12 e 15), mostrando que a incorporação de nanopartículas não representa risco às células, corroborando com o que já vem sendo descrito por outros estudos (SHEN *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016; KOLECKA *et al.*, 2017), onde foi visto que as nanopartículas ficam retidas no citoplasma das MSCs, sem ocasionar alteração morfológica, nem efeito citotóxico ou comprometimento de sua diferenciação, proliferação e migração.

Para poder analisar o *homing* das MSCs+Nano até um tumor no cérebro, foi necessário primeiro estabelecer um modelo tumoral murino com a linhagem celular U87MG. As análises de bioluminescência permitiram um acompanhamento do crescimento tumoral nos doze primeiros dias e após vinte e dois dias foi feita análise histológica, a qual comprovou que o protocolo cirúrgico para implantação do tumor foi eficiente e, apesar do estresse inicial e queda na taxa de bioluminescência, provavelmente decorrente do estresse celular, o enxerto das células U87MG continuou crescendo e formou uma pequena massa tumoral com margens delimitadas e alta densidade celular (Figura 20), características típicas dos tumores formados com essa linhagem (RADAELLI *et al.*, 2009; BURDEN-GULLEY *et al.*, 2011; MIAO *et al.*, 2014).

Após a injeção intranasal e endovenosa, o potencial migratório das MSCs+Nano até o tumor foi analisado por meio do método de Perls para evidenciar o ferro em azul e poder destacar, indiretamente, as células marcadas. Na Figura 20, é possível observar a presença do ferro próximo e ao redor da massa tumoral nos animais de ambos os grupos que receberam a administração de MSCs, sendo uma maior quantidade de ferro encontrada no grupo que recebeu aplicação via intranasal. É importante ressaltar aqui que somente com a análise

imunohistoquímica, que será realizada futuramente, daria para afirmar com precisão a presença das MSCs.

Essa maior presença de ferro no grupo nasal está relacionada ao que já vem sendo demonstrado por outros autores, onde tem-se visto que as células quando administradas na cavidade nasal estariam migrando diretamente para o cérebro (DANIELYAN *et al.*, 2011; REITZ *et al.*, 2012; BALYASNIKOVA *et al.*, 2014; DANIELYAN *et al.*, 2014; DONEGA *et al.*, 2015 SALAMA *et al.*, 2015; DEY *et al.*, 2016; CLAVREUL *et al.*, 2017).

Anteriormente e em concordância com o presente estudo, BALYASNIKOVA *et al.* (2014) injetaram pela via intranasal MSCs induzidas a expressar um ligante indutor de apoptose e analisaram sua capacidade migratória até o tumor cerebral em camundongos, onde se viu que as células migraram até o tumor, permitindo um aumento na sobrevivência dos animais.

Na análise histológica dos animais do grupo caudal, é possível visualizar o ferro em menor concentração ao redor do tumor, quando comparada com as imagens do grupo nasal (Figura 20), isso se deve ao que já vem sendo discutido e demonstrado na literatura, visto que as MSCs possuem a capacidade de transmigrar a BHE quando injetadas por essa via, mesmo que em baixa concentração (HARTING *et al.*, 2009; ARGIBAY *et al.*, 2017; NAKAJIMA *et al.*, 2017; EZQUER *et al.*, 2018). As MSCs+Nano foram evidenciadas na região da borda do tumor, o que pode estar relacionado ao período de tempo analisado nesse estudo, por isso, uma análise em diferentes intervalos de tempo seria interessante para que possamos entender como essas células estão adentrando no tumor ao longo do tempo.

Uma das principais questões quando se explora a capacidade migratória das MSCs para o cérebro ainda é compreender seu perfil migratório (LIU *et al.*, 2013), diante disso, foi realizado um estudo da biodistribuição do ferro no corpo, afim de elucidar o perfil de distribuição dessas células e detectar o possível aprisionamento em outros órgãos e, conseqüentemente, analisar o potencial risco no seu uso.

A análise da biodistribuição foi feita por meio de ICP-OES, que é uma análise precisa do teor de ferro e que permitiu aferir um padrão de distribuição entre os órgãos, detectou uma diferença significativa na concentração de ferro no cérebro quando as MSCs+Nano foram injetadas pela via intranasal, o que entra em concordância com nossos achados histológicos e o que vem sendo demonstrado na literatura já mencionada. Não foi observada diferença significativa na concentração de ferro do grupo caudal (Figura 22).

A diferença de apenas 11% na concentração de ferro total, em relação ao controle, quando se injetou MSCs+Nano pela via endovenosa pode ser explicada pelo mencionado no trabalho de TURTZO *et al.* (2015), os quais avaliaram a capacidade das MSCs em migrarem

para o cérebro lesionado. Em seu estudo, os autores viram que poucas células estariam chegando ao local desejado quando injetadas por via endovenosa e, por isso, essa via seria ineficaz quando o objetivo é permitir que uma grande quantidade de células chegue ao local e resulte em um efeito terapêutico positivo. Dessa forma, a quantidade de células que estariam conseguindo chegar ao cérebro é muito baixa, o que corrobora com o nosso achado histopatológico, visto que esse grupo apresentou uma presença muito pequena de ferro no tecido em comparação ao grupo nasal (Figura 20), semelhante ao observado também por HARTING *et al.* (2009).

Sabendo que foi administrada a mesma concentração de MSCs+Nano nos dois grupos experimentais, o baixo valor total de ferro encontrado na análise de biodistribuição no grupo caudal em comparação com o valor total do ferro do grupo nasal pode estar relacionado à eliminação das células pelo organismo (ARGIBAY *et al.*, 2017). O que nos leva a concluir que a via intranasal também estaria levando à uma menor taxa de eliminação das MSCs no período de tempo analisado, o que podemos associar à uma menor perda do tratamento no futuro.

Um dado que chamou atenção foi a alta concentração de ferro no pulmão do grupo caudal, cerca de 21% a mais que o controle, o que corrobora com o encontrado por HARTING *et al.* (2009), os quais analisaram a capacidade migratória das MSCs quando injetada pela via endovenosa em um modelo animal com injúria cerebral e viram que a maior parte das células ficou retida nos pulmões. Os autores viram que somente 1,5-3,7% das células foram capazes de atravessar os pulmões e alcançar a circulação arterial, entretanto, desse valor, apenas 0,0005% teriam conseguindo chegar ao parênquima cerebral mesmo após 2 semanas de observação, e, por isso, essa não seria uma via eficaz quando o objetivo é chegar ao cérebro.

É importante ressaltar que o que estamos quantificando aqui é a quantidade de ferro que está chegando no cérebro e não a quantidade de células, como HARTING *et al.* (2009) fez em seu estudo. O que pode estar relacionado a diferença percentual encontrada, visto que mesmo que esteja chegando uma baixa quantidade de células pela via endovenosa, a quantidade de nanopartículas/ferro que essas células podem carrear estaria dando a diferença de 21% em relação ao controle encontrada no presente estudo. Para evidenciar e quantificar as MSCs seria necessário fazer uma análise imunohistoquímica específica para destacar essas células no tecido (em andamento).

Quando o tratamento foi administrado via intranasal, a tendência de acúmulo de ferro no pulmão reduziu para 7% de diferença em relação ao controle, dado que em conjunto com a detecção significativa intracerebral, permite aferir que essa é uma outra relação benéfica no uso

futuro da via intranasal, já que estaria levando a diminuição do risco de acúmulo de MSCs+Nano intrapulmonar, representando benefício aos pacientes.

A retenção observada no pulmão aumenta o risco de formação de microembolias e hemorragias, que apesar de não ter sido avaliado neste estudo, foi relatado por outros estudos como uma das principais limitações no uso da via endovenosa (HARTING *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2015; TURTZO *et al.*, 2015; ARGIBAY *et al.*, 2017; EZQUER *et al.*, 2018), visto que podem piorar o estado de saúde dos pacientes e elevar o risco de óbito.

Quanto aos outros órgãos, foi observada uma diferença significativa de 23% em relação ao controle na concentração de ferro dos rins do grupo nasal, o que é algo esperado devido a função básica dos rins que é a depuração de substâncias e, conseqüentemente, sua excreção pela urina (DANIELYAN *et al.*, 2011; ARAMI *et al.*, 2015; PATIL *et al.*, 2015).

Ressaltamos que o papel que as MSCs exercem sobre o tumor ainda é contraditório, visto que alguns estudos têm relacionado essas células à efeitos negativos sobre a progressão tumoral e outros como constituintes importantes do microambiente tumoral e contribuintes positivas para o crescimento do tumor, relacionada à sua atividade imunossupressora (GUAN & CHEN, 2013; HO *et al.*, 2013; LEE & HONG, 2017; MAFFEY *et al.*, 2017; SHAHAR *et al.*, 2017). Em seu trabalho SHAHAR *et al.* (2017) isolaram MSCs de tumores primários de pacientes com glioma de alto grau e viram que elas estariam estimulando a proliferação e malignidade do tumor.

Uma forma de se contornar os efeitos das MSCs sobre o crescimento do tumor é o uso da hipertermia magnética, a qual utiliza a aplicação de um campo magnético alternado para induzir o aumento da temperatura tumoral (43-47°C) visando a lise das células tumorais (PAVON & OKAMOTO, 2007). Essa técnica tem sido relacionada à uma diminuição significativa da massa tumoral e sobrevivência do tecido normal, adjacente ao tumor, visto que o tumor é mais sensível ao aumento da temperatura do que o tecido saudável (WUST *et al.*, 2002; RACHAKATLA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2012; HAYASHI *et al.*, 2013). Dessa forma, as MSCs carreando as partículas iriam sofrer apoptose com o aquecimento e liberar as nanopartículas dentro do nicho tumoral, possibilitando até mesmo uma segunda indução de hipertermia e, quando carreando fármacos, estes estariam sendo liberados no local do tumor.

Portanto, com base nos resultados apresentados, acreditamos que a via intranasal deve ser priorizada nos próximos estudos, já que o objetivo é levar a maior concentração da terapia ao tumor sem que haja necessidade de um procedimento invasivo e, também, a redução dos riscos associados a administração das terapias por outras vias (REITZ *et al.*, 2012; BALYASNIKOVA *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2017). Dessa forma, há algumas vantagens claras

observadas nesse estudo em utilizar a via intranasal no lugar da endovenosa para tratamento no cérebro, como: (1) não é invasiva; (2) diminuição do risco de trombos intravasculares; (3) menor risco de embolia pulmonar; (4) menos perda do tratamento decorrente de extravasamento vascular; (5) maior acúmulo de ferro intracerebral.

6. CONCLUSÕES

Os três principais propósitos deste estudo foram: (1) estabelecer um modelo tumoral murino de glioma, demonstrado pelos resultados de bioluminescência (Figura 17) e histologia (Figura 19); (2) marcar MSCs com nanopartículas magnéticas para rastreamento *ex vivo*, demonstrado pelas análises *in vitro* (Figuras 11, 12 e 14); (3) comparar viabilidade de uso da via intranasal e endovenosa para administração das MSCs+Nano em um modelo animal de glioma, analisada por meio das análises de biodistribuição (Figura 22) e histologia com coloração de ferro pelo método de Perls (Figura 20).

No geral, demonstrou-se que a linhagem U87MG expressando luciferase desenvolvida no presente estudo é eficiente para o estabelecimento e acompanhamento do modelo de glioma murino. Também se viu que a via intranasal é mais eficaz para administração de MSCs-Nano e, além disso, está levando à menos riscos associados, visto que a via endovenosa levou a uma maior retenção pulmonar, o que pode, a longo prazo e com múltiplas administrações da terapia necessárias para o bombardeamento do tumor, levar à formação de trombos/embolia e, conseqüentemente, um prognóstico negativo para o paciente.

Dessa forma, esse estudo nos leva a encorajar a abordagem da via intranasal como primeira escolha para administração de células mesenquimais carreando terapias, quando o objetivo é atingir o cérebro.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Alguns estudos relacionados aos resultados encontrados aqui já estão em andamento, como: (1) a caracterização do processo de endocitose e exocitose das nanopartículas pelas MSCs por meio da análise de ICP-OES; (2) determinação da quantidade de ferro por célula; (3) análise da ultraestrutura das MSCs marcadas com nanopartículas por meio de MET; (4) análise imunohistoquímica para visualização das MSCs no tecido; (5) análise quantitativa da presença MSCs+Nano por meio da análise histológica do grupo controle, nasal e caudal.

Incentiva-se que nos estudos futuros sejam utilizadas outras técnicas de imagem e detecção, como o uso de ressonância magnética, tanto para análise do crescimento tumoral quanto do perfil migratório das células mesenquimais. O uso de MSCs bioluminescentes seria interessante também para elucidar melhor o perfil migratório ao longo do tempo das MSCs, além da utilização de nanopartículas fluorescentes que ampliem as formas de detecção e controle, visto que algumas podem estar sendo expelidas das células.

Uma outra possibilidade que fica aberta é a investigação de MSCs carreando fármacos nanoestruturados que atuem contra o glioma e, também, a análise da possível influência positiva ou negativa que as MSCs estariam exercendo na região tumoral, visto que o efeito terapêutico teria que compensar a possível influência que essas células podem estar exercendo sobre o tumor. Por fim, também se sugere a investigação do uso de ímãs para atração magnética *in vivo*, de forma a induzir a migração de uma maior quantidade de células para o local, seguida da aplicação de um campo magnético alternado visando a indução de hipertermia magnética.

REFERÊNCIAS

- AKHAN E.; TUNCEL D. & AKCALI K.C. **Nanoparticle labeling of bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells: their use in differentiation and tracking.** *Biomed Res Int.* 2015:298430. 2015.
- ALLEN M; BJERKE M *et al.* **Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news.** *Sci. Trans. Med.* 8(354): 1-4. 2016.
- ALTANER C. **Glioblastoma and stem cells.** *Neoplasma.* 55(5):369-74. 2008.
- ALTIERI R; AGNOLETTI A *et al.* **Molecular biology of gliomas: present and future challenges.** *Transl Med UniSa.* 10:29-37. 2014.
- ALVES EGL; SERAKIDES R *et al.* **Isolation and culture of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow of dogs.** *Cienc. anim. bras.* 18: 1-14, e-34050. 2017.
- ANTONOW MB; ASBAHR AC *et al.* **Liquid formulation containing doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules: Cytotoxicity in human breast cancer cell line and *in vitro* uptake mechanism.** *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 76:374-382. 2017.
- ARAMI H; KHANDHAR A *et al.* **In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles.** *Chem Soc Rev.* 44(23): 8576–8607. 2015.
- ARGIBAY B; TREKKER J *et al.* **Intraarterial route increases the risk of cerebral lesions after mesenchymal cell administration in animal model of ischemia.** *Sci Rep.* 7:40758. 2017.
- AUFFINGER B; MORSHED R *et al.* **Drug-Loaded Nanoparticle Systems And Adult Stem Cells: A Potential Marriage For The Treatment Of Malignant Glioma?** *Oncotarget.* 4(3): 378–396. 2013.
- BAETKE SC; LAMMERS T & KIESSLING F. **Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer.** *Br J Radiol.* 88(1054):20150207. 2015.
- BAJETTO A; PATTAROZZI A *et al.* **Different Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Glioblastoma Stem Cells by Direct Cell Interaction or Via Released Soluble Factors.** *Front Cell Neurosci.* 13;11:312. 2017.
- BALYASNIKOVA IV; PRASOL MS *et al.* **Intranasal delivery of mesenchymal stem cells significantly extends survival of irradiated mice with experimental brain tumors.** *Mol Ther.* 22(1):140-8. 2014.
- BARBOZA CA; GINANI F *et al.* **Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells.** *Einstein (Sao Paulo).* 12(1):75-81. 2014.

- BERTASSOLI BM; NETO ACA *et al.* **Mesenchymal Stem Cells - Emphasis in Adipose Tissue.** *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56(4):607-617. 2013.
- BREHAR FM; CIUREA AV *et al.* **The development of xenograft glioblastoma implants in nude mice brain.** *Send to J Med Life.* 1(3):275-86. 2008.
- BREZNIK B; MOTALN H *et al.* **Mesenchymal stem cells differentially affect the invasion of distinct glioblastoma cell lines.** *Oncotarget.*, 8(15):25482-25499. 2017.
- BULL E; MADANI SY *et al.* **Stem cell tracking using iron oxide nanoparticles.** *Int J Nanomedicine.* 9:1641-53. 2014.
- BUSSARD KM; MUTKUS L *et al.* **Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment.** *Breast Cancer Res.* 18:84. 2016.
- BURDEN-GULLEY SM; QUTAISH MQ *et al.* **Novel cryo-imaging of the glioma tumor microenvironment reveals migration and dispersal pathways in vivid three-dimensional detail.** *Cancer Res.* 71(17):5932-40. 2011.
- BYDŁOWSKI SP; DEBES AA *et al.* **Biological characteristics of mesenchymal stem cells.** *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 31(Supl. 1):25-35. 2009.
- CARBAJAL KS; SCHAUMBURG C *et al.* **Migration of engrafted neural stem cells is mediated by CXCL12 signaling through CXCR4 in a viral model of multiple sclerosis.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(24):11068–11073. 2011.
- CHAREST G; SANCHE L *et al.* **Optimization of the route of platinum drugs administration to optimize the concomitant treatment with radiotherapy for glioblastoma implanted in the Fischer rat brain.** *J Neurooncol.* 115(3): 365–373. 2013.
- CHARLES NA; HOLLAND EC *et al.* **The Brain Tumor Microenvironment.** *Glia.* 59:1169–1180. 2011.
- CHOI JH; CHUNG JY *et al.* **Cell Proliferation and Neuroblast Differentiation in the Rat Dentate Gyrus After Intrathecal Treatment with Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells.** *Cell Mol Neurobiol.* 31:1271–1280. 2011.
- CHUTE JP. **Stem cell homing.** *Curr Opin Hematol.* 13(6):399-406. 2006.
- CLARK MJ; HOMER N *et al.* **U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line.** *PLoS Genet.* 6(1):e1000832. 2010.
- CLAYTON KN; SALAMEH JW *et al.* **Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry.** *Biomicrofluidics.* 10(5): 054107. 2016.

- CLAVREUL A; POURBAGHI-MASOULEH M *et al.* **Human mesenchymal stromal cells as cellular drug-delivery vectors for glioblastoma therapy: a good deal?** *J Exp Clin Cancer Res.* 36(1):135. 2017.
- CORES J; CARANASOS TG *et al.* **Magnetically Targeted Stem Cell Delivery for Regenerative Medicine.** *Journal of functional biomaterials.* 6(3):526–46. 2015.
- DA SILVA AC; CABRAL FR *et al.* **Tumor growth analysis by magnetic resonance imaging of the C6 glioblastoma model with prospects for the assessment of magnetohyperthermia therapy.** *Einstein (Sao Paulo).* 10(1):11-5. 2012.
- DANIELYAN L; SCHAFER R *et al.* **Therapeutic Efficacy of Intranasally Delivered Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Parkinson Disease.** *Rejuvenation Res.* 14(1):3-16. 2011.
- DANIELYAN L; SCHÄFER R *et al.* **Intranasal delivery of cells to the brain.** *Eur J Cell Biol.* 88(6):315-24. 2009.
- DANIELYAN L; BER-HAMMER S *et al.* **Intranasal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, macrophages, and microglia to the brain in mouse models of Alzheimer's and Parkinson's disease.** *Cell Transplant.* 23(1):S123-39. 2014.
- DE MELO SM; BITTENCOURT S *et al.* **The Anti-Tumor Effects of Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cell Transduced with HSV-Tk Gene on U-87-Driven Brain Tumor.** *PLoS One.* 10(6): e0128922. 2015.
- DENG SL; LI YQ & ZHAO G. **Imaging Gliomas with Nanoparticle-Labeled Stem Cells.** *Chin Med J (Engl).* 131(6): 721–730. 2018.
- DEY M; YU D *et al.* **Intranasal Oncolytic Virotherapy with CXCR4-Enhanced Stem Cells Extends Survival in Mouse Model of Glioma.** *Stem Cell Reports.* 7(3):471-482. 2016.
- DIRVEN L; KOEKKOEK JAF *et al.* **Health-related quality of life in brain tumor patients: as an endpoint in clinical trials and its value in clinical care.** *Expert Review of Quality of Life in Cancer Care.* 1:1, 37-44. 2016.
- DOMINGOS RF; BAALOUSHA MA *et al.* **Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes.** *Environ. Sci. Technol.* 43: 7277–7284. 2009.
- DOMINICI M; LE BLANC K *et al.* **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy.* 8(4):315-7. 2006.

- DONEGA V; NIJBOER CH *et al.* **Assessment of long-term safety and efficacy of intranasal mesenchymal stem cell treatment for neonatal brain injury in the mouse.** *Pediatr Res.* 78(5): 520–526. 2015.
- EZQUER F; MORALES P *et al.* **Intravenous administration of anti-inflammatory mesenchymal stem cell spheroids reduces chronic alcohol intake and abolishes binge drinking.** *Sci Rep.* 8(1):4325. 2018.
- FISCHER UM; HARTING MT *et al.* **Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect.** *Stem Cells Dev.* 18(5):683–92. 2009.
- GAMARRA LF; DACOSTA-FILHO AJ *et al.* **Ferromagnetic resonance for the quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biological materials.** *Int J Nanomedicine.* 5:203–211. 2010.
- GANASSIN R; SOUZA LG *et al.* **Decoration of a Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride)-Shelled Selol Nanocapsule with Folic Acid Increases Its Activity Against Different Cancer Cell Lines In Vitro.** *J. Nanosci. Nanotechnol.* 18(1):522-528. 2018.
- GAO J; DENNIS JE *et al.* **The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion.** *Cells Tissues Organs.* 169(1):12–20. 2001.
- GAZZOTTI MR; MALHEIROS SM *et al.* **Quality of life and physical limitations in primary brain tumor patients.** *Qual Life Res.* 20(10):1639-43.2011.
- GUAN J & CHEN J. **Mesenchymal stem cells in the tumor microenvironment.** *Biomed Rep.* 1(4): 517–521. 2013.
- GUO L; GE J *et al.* **Three-dimensional spheroid-cultured mesenchymal stem cells devoid of embolism attenuate brain stroke injury after intra-arterial injection.** *Stem Cells Dev.* 23(9):978-89. 2014.
- HAMBARDZUMYAN D & BERGERS G. **Glioblastoma: Defining Tumor Niches.** *Trends Cancer.* 1(4): 252–265. 2015.
- HANAHAHAN D. & WEINBERG R. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** *Cell.* 144(5): 646-674. 2011.
- HARTING MT; JIMENEZ F *et al.* **Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury.** *J Neurosurg.* 110:1189–1197. 2009.
- HAYASHI K; NAKAMURA M *et al.* **Superparamagnetic nanoparticle clusters for cancer theranostics combining magnetic resonance imaging and hyperthermia treatment.** *Theranostics.* 3(6):366-76. 2013.

- HO IAW & SHIM WSN. **Contribution of the Microenvironmental Niche to Glioblastoma Heterogeneity.** *Biomed Res Int.* 2017:9634172. 2017.
- HO IA; TOH HC *et al.* **Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis.** *Stem Cells.* 31: 146–55. 2013.
- HODGKINSON N; KRUGER CA & ABRAHAMSE H. **Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells.** *Tumour Biol.* 39(10):1010428317734691. 2017.
- HONG IS; LEE HY & KANG KS. **Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies?** *Mutat Res.* 768:98-106. 2014.
- HUANG X; ZHANG F *et al.* **Design Considerations of Iron-Based Nanoclusters for Noninvasive Tracking of Mesenchymal Stem Cell Homing.** *ACS Nano.* 8(5): 4403–4414. 2014.
- HUANG W-J; CHEN W-W & ZHANG X. **Glioblastoma multiforme: Effect of hypoxia and hypoxia inducible factors on therapeutic approaches (Review).** *Oncology Letters.* 12: 2283-2288. 2016.
- HUYNH GH; DEEN DF & SZOKA FCJR. **Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors.** *J. Control. Release.* 110:236–259. 2006.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** *Coordenação de Prevenção e Vigilância.* – Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 18 de Fevereiro de 2018.
- JAIN R.K. **Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: Bench to bedside to biomarkers.** *J Clin Oncol.* 31(17): 2205-2218. 2013.
- JAWHARI S; RATINAUD MH & VERDIER M. **Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone 'ménage-à-trois'.** *Cell Death Dis.* 7(10):e2434. 2016.
- JIAMING M & NIU C. **Comparing neuroprotective effects of CDNF-expressing bone marrow derived mesenchymal stem cells via differing routes of administration utilizing an in vivo model of Parkinson's disease.** *Neurol Sci.* 36(2):281-7. 2015.
- JOANITTI GA; GANASSIN R *et al.* **Nanostructured Systems for the Organelle-specific Delivery of Anticancer Drugs.** *Mini Rev Med Chem.* 17(3):224-236. 2017.
- KAASALAINEN M; ASEYEV V *et al.* **Size, Stability, and Porosity of Mesoporous Nanoparticles Characterized with Light Scattering.** *Nanoscale Res Lett.* 2:74. 2017.

- KAUR P; ALIRU ML *et al.* **Hyperthermia Using Nanoparticles – Promises and Pitfalls.** *Int J Hyperthermia.* 32(1): 76–88. 2016.
- KALBER TL; ORDIDGE KL *et al.* **Hyperthermia treatment of tumors by mesenchymal stem cell-delivered superparamagnetic iron oxide nanoparticles.** *Int J Nanomedicine.* 11:197383. 2016.
- KEFAS B; FLOYD DH *et al.* **A miR-297/hypoxia/DGK-a axis regulating glioblastoma survival.** *Neuro-Oncology.* 15(12):1652–1663. 2013.
- KIM YG; JEON S *et al.* **Existence of glioma stroma mesenchymal stem-like cells in Korean glioma specimens.** *Childs Nerv Syst.* 29:549–563. 2013.
- KIM SS; HARFORD JB *et al.* **Effective treatment of glioblastoma requires crossing the blood–brain barrier and targeting tumors including cancer stem cells: The promise of nanomedicine.** *Biochem Biophys Res Commun.* 468(3): 485–489. 2015.
- KIM SJ; LEWIS B *et al.* **Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Direct Labeling of Stem Cells and In Vivo MRI Tracking.** *Contrast Media Mol Imaging.* 11(1):55–64. 2016.
- KIM HN; KIM DY *et al.* **Feasibility and Efficacy of Intra-Arterial Administration of Mesenchymal Stem Cells in an Animal Model of Double Toxin-Induced Multiple System Atrophy.** *Stem Cells Transl Med.* 6(5): 1424–1433. 2017.
- KOIZUMI S; GU C *et al.* **Migration of mouse-induced pluripotent stem cells to glioma-conditioned medium is mediated by tumor-associated specific growth factors.** *Oncol Lett.* 2(2):283–288. 2011.
- KOLECKA MA; ARNHOLD S *et al.* **Behaviour of adipose-derived canine mesenchymal stem cells after superparamagnetic iron oxide nanoparticles labelling for magnetic resonance imaging.** *BMC Veterinary Research.* 13:62. 2017.
- KURTZ A. **Mesenchymal Stem Cell Delivery Routes and Fate.** *Int J Stem Cells.* 1(1): 1–7. 2008.
- LABUSCA L; HEREA DD & MASHAYEKHI K. **Stem cells as delivery vehicles for regenerative medicine: challenges and perspectives.** *World J Stem Cells.* 10(5): 43–56. 2018.
- LACROIX M; ABI-SAID D *et al.* **A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival.** *J Neurosurg.* 95(2):190–8. 2001.
- LAQUINTANA V; TRAPANI A *et al.* **New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors.** *Expert Opin Drug Deliv.* 6(10): 1017–1032. 2009.
- LAZENNEC G & LAM PY. **Recent discoveries concerning the tumor - mesenchymal stem cell interactions.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1866 (2): 290–299. 2016.

- LEE HY & HONG IS. **Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential.** *Cancer Sci.* 108 (10): 1939-1946. 2017
- LEIBACHER J & HENSCHLER R. **Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells.** *Stem Cell Res Ther.* 7: 7. 2016.
- LI L; GUAN Y *et al.* **Silica nanorattle-doxorubicinanchored mesenchymal stem cells for tumor-tropic therapy.** *ACS Nano* 5:7462-70. 2011.
- LI G; BONAMICI N *et al.* **Intranasal delivery of stem cell-based therapies for the treatment of brain malignancies.** *Expert Opin Drug Deliv.* 15(2): 163–172. 2018.
- LI Z; FAN D & XIONG D. **Mesenchymal stem cells as delivery vectors for anti-tumor therapy.** *Stem Cell Investig.* 2:6. 2015.
- LIANG PC; CHEN YC & CHIANG CF. **Doxorubicin-modified magnetic nanoparticles as a drug delivery system for magnetic resonance imaging-monitoring magnet-enhancing tumor chemotherapy.** *Int J Nanomedicine.* 12;11:2021-37. 2016.
- LIU L; ECKERT MA *et al.* **From Blood to the Brain: Can Systemically Transplanted Mesenchymal Stem Cells Cross the Blood-Brain Barrier?** *Stem Cells Int.* 2013:435093. 2013.
- LOPES TG; CASTILHO-FERNANDES A & TEDESCO AC. **Ampla caracterização do Glioblastoma e abordagens terapêuticas.** *Revista da Universidade Vale do Rio Verde.* 10(2):12-25. 2012.
- LOUIS DN; PERRY A *et al.* **The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.** *Acta Neuropathol.* 131(6):803-20. 2016.
- MAFFEY A; STORINI C *et al.* **Mesenchymal stem cells from tumor microenvironment favour breast cancer stem cell proliferation, cancerogenic and metastatic potential, via ionotropic purinergic signalling.** *Sci Rep.* 7(1):13162. 2017.
- MAGAÑA-MALDONADO R; CHÁVEZ-CORTEZ EG *et al.* **Immunological Evasion in Glioblastoma.** *Biomed Res Int.* 2016:7487313. 2016.
- MAHMOUDIFAR N & DORAN PM. **Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue.** *Methods Mol Biol.* 1340:53-64. 2015.
- MAHMOUDI K & HADJIPANAYI CG. **The application of magnetic nanoparticles for the treatment of brain tumors.** *Front Chem.* 3;2:109. 2014.
- MAHMOUDI M; SANT S *et al.* **Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy.** *Adv Drug Deliv Rev.* 63(1-2):24-46. 2011.

- MAIER-HAUFF K; ULRICH F *et al.* **Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme.** *J Neurooncol.* 103(2):317-24. 2011.
- MAMANI JB; MALHEIROS JM *et al.* **In vivo magnetic resonance imaging tracking of C6 glioma cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles.** *Einstein.* 10(2):164-70. 2012.
- MARQUINA M; COLLADO JA *et al.* **Biodistribution and Immunogenicity of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Intraarticular Chondrocyte Xenotransplantation.** *Front Immunol.* 8:1465. 2017.
- MEIRELLES LS; CHAGASTELLES PC & NARDI NB. **Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal organs and tissues.** *J Cell Sci.* 119: 2204- 2213. 2006.
- MENG X; LI J *et al.* **Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Overexpressing IL10 Attenuates Cardiac.** *J Cell Physiol.* 233(1):587-595. 2018.
- MIAO H; CHOI BD *et al.* **EGFRvIII-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Migrate to and Kill Tumor Deposits Infiltrating the Brain Parenchyma in an Invasive Xenograft Model of Glioblastoma.** *PLoS One.* 9(4):e94281. 2014.
- MIYAI M; TOMITA H *et al.* **Current trends in mouse models of glioblastoma.** *J Neurooncol.* 135(3):423-432. 2017.
- MULLINS CS; SCHNEIDER B *et al.* **Establishment and Characterization of Primary Glioblastoma Cell Lines from Fresh and Frozen Material: A Detailed Comparison.** *PLoS One.* 8(8):e71070. 2013.
- NAKAJIMA M; NITO C *et al.* **Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Interleukin-10 Promote Neuroprotection in Experimental Acute Ischemic Stroke.** *Mol Ther Methods Clin Dev.* 6: 102-111. 2017.
- NAKAMAE T; ADACHI N *et al.* **The effect of an external magnetic force on cell adhesion and proliferation of magnetically labeled mesenchymal stem cells.** *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2(1):5. 2010.
- NAKAMIZO A; MARINI F *et al.* **Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas.** *Cancer Res.* 65(8):3307-18. 2005.
- OBEROIRK; PARRISH KE *et al.* **Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood-brain barrier to treat glioblastoma.** *Neuro Oncol.* 18(1):27-36. 2016.
- ORUNOGLE M; KAFFASHI A *et al.* **Effects of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the RG2 rat glioma model.** *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 78:32-38. 2017.

- PACIONI S; D'ALESSANDRIS QG *et al.* **Human mesenchymal stromal cells inhibit tumor growth in orthotopic glioblastoma xenografts.** *Stem Cell Res Ther.* 8: 53. 2017.
- PATIL US; ADIREDDY S *et al.* **In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation and Quantification of Iron Oxide Nanoparticles.** *Int. J. Mol. Sci.* 16: 24417-24450. 2015.
- PARK IS; MONDAL A *et al.* **Adipose-derived stromal cell cluster with light therapy enhance angiogenesis and skin wound healing in mice.** *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 462:171e177. 2015.
- PAVON LF & OKAMOTO OK. **Aplicações de recursos nanobiotecnológicos em câncer.** *Einstein.* 5(1):74-77. 2007.
- PERECIN C.J. **Nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas com polímeros para aplicação no tratamento de câncer por hipertermia.** 2016. 92f. *Dissertação (Mestrado) – Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos.* 2016.
- PINEDA JR; JEITANY M *et al.* **Intranasal Administration of Temozolomide Delayed the Development of Brain Tumors Initiated by Human Glioma Stem-Like Cell in Nude Mice.** *J Cancer Sci Ther.* 9:3. 2017.
- POTDAR PD & JETHMALANI YD. **Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine.** *World J Stem Cells.* 7(5): 839–851. 2015.
- QUINTO CA; MOHINDRA P *et al.* **Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment.** *Nanoscale.* 7(29):12728-36. 2015.
- RACHAKATLA RS; BALIVADA S *et al.* **Attenuation of mouse melanoma by A/C magnetic field after delivery of bi-magnetic nanoparticles by neural progenitor cells.** *ACS Nano.* 4(12):7093–7104. 2010.
- RADAELLI E; CERUTI R *et al.* **Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease.** *Histol Histopathol.* 24(7):879-91. 2009.
- RADISIC M; IYER RK & MURTHY SK. **Micro- and nanotechnology in cell separation.** *Int J Nanomedicine.* 1(1): 3–14. 2006.
- REAGAN MR & KAPLAN DL. **Mesenchymal Stem Cell Tumor-Homing: Detection Methods in Disease Model Systems.** *Stem Cells.* 29(6): 920–927. 2011.
- REITZ M; DEMESTRE M *et al.* **Intranasal delivery of neural stem/progenitor cells: a noninvasive passage to target intracerebral glioma.** *Stem Cells Transl Med.* 1(12):866-73. 2012.

- RENI M; MAZZA E *et al.* **Central nervous system gliomas.** *Crit Rev Oncol Hematol.* 113:213-234. 2017.
- RODRÍGUEZ-FUENTES N; REYNOSO-DUCOING O *et al.* **Isolation of Human Mesenchymal Stem Cells and their Cultivation on the Porous Bone Matrix.** *J Vis Exp.* (96): 51999. 2015.
- ROGER M; CLAVREUL A *et al.* **Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors.** *Biomaterials.* 31(32):8393-401. 2010.
- ROY S; LAHIRI D *et al.* **Recurrent Glioblastoma: Where we stand.** *South Asian J Cancer.* 4(4):163-73. 2015.
- SABALE S; JADHAV V *et al.* **Superparamagnetic MFe₂O₄ (M = Ni, Co, Zn, Mn) nanoparticles: synthesis, characterization, induction heating and cell viability studies for cancer hyperthermia applications.** *J Mater Sci Mater Med.* 26(3):127. 2015.
- SHAHAR T; ROZOVSKI U *et al.* **Percentage of mesenchymal stem cells in high-grade glioma tumor samples correlates with patient survival.** *Neuro-Oncology.* 19(5), 660–668. 2017.
- SAHOO SK; PARVEEN S & PANDA JJ. **The present and future of nanotechnology in human health care.** *Nanomedicine.* 3(1):20-31. 2007.
- SALAMA M; SOBH M *et al.* **Effect of intranasal stem cell administration on the nigrostriatal system in a mouse model of Parkinson's disease.** *Exp Ther Med.* 13(3): 976–982. 2017.
- SALATA OV. **Applications of nanoparticles in biology and medicine.** *J Nanobiotechnology.* 2(1):3. 2004.
- SASSO GRS; CALIÓ ML *et al.* **Células oriundas do fluxo menstrual: possíveis aplicações.** *Reprod clim.* 32(1):39–42 2017.
- SCHMUCK EG; KOCH JM *et al.* **Biodistribution and Clearance of Human Mesenchymal Stem Cells by Quantitative Three-Dimensional Cryo-Imaging After Intravenous Infusion in a Rat Lung Injury Model.** *Stem Cells Transl Med.* 5(12): 1668–1675. 2016.
- SCHREPFER S; DEUSE T *et al.* **Stem cell transplantation: the lung barrier.** *Transplant Proc.* 39(2):573–576. 2007.
- SECUNDA R; VENNILA R *et al.* **Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study.** *Cytotechnology.* 67:793–807. 2015.

- SEKERDAG E; LULE S *et al.* **A potential non-invasive glioblastoma treatment: Nose-to-brain delivery of farnesylthiosalicylic acid incorporated hybrid nanoparticles.** *J Control Release.* 261:187-198. 2017.
- SHAH K. **Stem cell-based therapies for tumors in the brain: are we there yet?** *Neuro Oncol.* 0:1-13. 2016.
- SHAH K; HINGTGEN S *et al.* **Bimodal viral vectors and in vivo imaging reveal the fate of human neural stem cells in experimental glioma model.** *J Neurosci.* 28(17): 4406–4413. 2008.
- SHAHAR T; ROZOVSKI U *et al.* **Percentage of mesenchymal stem cells in high-grade glioma tumor samples correlates with patient survival.** *Neuro-Oncology.* 19(5), 660–668. 2017.
- SHEN Y; LIU X *et al.* **Comparison of Magnetic Intensities for Mesenchymal Stem Cell Targeting Therapy on Ischemic Myocardial Repair: High Magnetic Intensity Improves Cell Retention but Has no Additional Functional Benefit.** *Cell Transplant.* 24(10):1981-97. 2015.
- SHEVTSO M & MULTHOFF G. **Recent Developments of Magnetic Nanoparticles for Theranostics of Brain Tumor.** *Curr Drug Metab.* 17(8):737-744. 2016.
- SHI H; TSAI WB *et al.* **Template imprinted nanostructured surfaces for protein recognition.** *Nature.* 398:593- 7. 1999.
- SHOBO A; PAMREDDY A *et al.* **Enhanced brain penetration of pretomanid by intranasal administration of an oil-in-water nanoemulsion.** *Nanomedicine (Lond).* 13(9):997-1008. 2018.
- SILVA LHA; DA SILVA JR *et al.* **Labeling mesenchymal cells with DMSA-coated gold and iron oxide nanoparticles: assessment of biocompatibility and potential applications.** *Nanobiotechnol.* 14:59. 2016.
- SINGH N; JENKINS GJS *et al.* **Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION).** *Nano reviews.* 1: 10.3402/nano.v1i0.5358. 2010.
- SMITH CL; CHAICHANA KL *et al.* **Pre-Exposure of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells to Soluble Factors Enhances Their Homing to Brain Cancer.** *Stem Cells Transl Med.* 4(3): 239–251. 2015.
- SNEED PK; STAUFFER PR *et al.* **Survival benefit of hyperthermia in a prospective randomized trial of brachytherapy boost ± hyperthermia for glioblastoma multiforme.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 40:287–295. 1998.

- SOUSA MH; SILVA GJ *et al.* **Chemical analysis of size-tailored magnetic colloids using slurry nebulization in ICP-OES.** *Microchemical Journal.* 97(2):182–187. 2011.
- SPRING BQ; RIZVI I *et al.* **The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance.** *Photochem Photobiol Sci.* 14(8):1476-91. 2015.
- STAEDTKE V; BAI RY *et al.* **Clostridium novyi-NT can cause regression of orthotopically implanted glioblastomas in rats.** *Oncotarget.* 6(8):5536-46. 2015
- STUPP R; MASON WP *et al.* **Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.** *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996. 2005.
- THIAN ES; HUANG J; BEST S.M. *et al.* **The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films.** *Biomaterials.* 27(13):2692-8. 2006.
- TORRE LA; BRAY F *et al.* **Global cancer statistics, 2012.** *CA Cancer J Clin.* 65(2):87-108. 2015.
- TURTZO LC; BUDDE MD *et al.* **Failure of intravenous or intracardiac delivery of mesenchymal stromal cells to improve outcomes after focal traumatic brain injury in the female rat.** *PLoS One.* 10(5):e0126551. 2015.
- VAN TELLINGEN O; YETKIN-ARIK B *et al.* **Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment.** *Drug Resist Updat.* 19:1-12. 2015.
- WALID M.S. **Prognostic factors for long-term survival after glioblastoma.** *Perm J.* 12(4):45-8. 2008.
- WATANABE H; TSUCHIYA T *et al.* **Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate rejection in a rat lung transplantation model.** *J Surg Res.* 227:17-27. 2018.
- WATKINS S. & SONTHEIMER H. **Unique biology of gliomas: challenges and opportunities.** *Trends Neurosci.* 35(9): 546–556. 2012.
- WEI J; WU A *et al.* **Hypoxia potentiates glioma mediated immunosuppression.** *PLoS ONE.* 6(1). 2011.
- WIERZBINSKI KR; SZYMANSKI T *et al.* **Potential use of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vitro and in vivo bioimaging of human myoblasts.** *Sci Rep.* 8:3682. 2018.
- WU X; HU J *et al.* **In vivo tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle–labeled mesenchymal stem cell tropism to malignant gliomas using magnetic resonance imaging.** *J Neurosurg.* 108:320–329. 2008.
- WUST P; HILDEBRANDT B *et al.* **Hyperthermia in combined treatment of cancer.** *Lancet Oncol.* 3(8):487-97. 2002.

- XI J; ZHANG Z & SI XA. **Improving intranasal delivery of neurological nanomedicine to the olfactory region using magnetophoretic guidance of microsphere carriers.** *Int J Nanomedicine*. 10:1211-22. 2015.
- XIE C; YANG Z *et al.* **Systemically Infused Mesenchymal Stem Cells Show Different Homing Profiles in Healthy and Tumor Mouse Models.** *Stem Cells Transl Med*. 6(4):1120–1131. 2017.
- YANG J; LI Y *et al.* **Development of bioactive materials for glioblastoma therapy.** *Bioact Mater*. 1(1):29-38. 2016.
- YANG C; LIU HZ *et al.* **PEG-liposomal oxaliplatin potentialization of antitumor efficiency in a nude mouse tumor-xenograft model of colorectal carcinoma.** *Oncol Rep*. 25(6):1621-8. 2011.
- YARAK S & OKAMOTO OK. **Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives.** *An Bras Dermatol*. 85(5):647-56. 2010.
- YIN Y; ZHOU X *et al.* **In vivo tracking of human adipose-derived stem cells labeled with ferumoxytol in rats with middle cerebral artery occlusion by magnetic resonance imaging.** *Neural Regen Res*. 10(6): 909–915. 2015.
- YONG RL; SHINOJIMA M *et al.* **Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Intravascular Delivery of Oncolytic Adenovirus Delta-24-RGD to Human Gliomas.** *Cancer Res*. 69(23): 8932–8940. 2009.
- YU D; LI G *et al.* **Intranasal Delivery of Therapeutic Stem Cells to Glioblastoma in a Mouse Model.** *J Vis Exp*. 124. 2017.
- ZHANG J; CUI J *et al.* **Multifunctional Poly(amine-co-ester-co-ortho ester) for Efficient and Safe Gene Delivery.** *ACS Biomater Sci Eng*. 2(11):2080-2089. 2016.
- ZHAO AD-L; ZENG AX-W *et al.* **Preparation and coercivity and saturation magnetization dependence of inductive heating property of Fe₃O₄ nanoparticles in an alternating current magnetic field for localized hyperthermia.** *Journal of Alloys and Compounds*. 469: 215–218. 2009.
- ZHAO Y; TANG S *et al.* **Targeted delivery of doxorubicin by nano-loaded mesenchymal stem cells for lung melanoma metastases therapy.** *Sci Rep*. 7:44758. 2017.