

**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

**Estudo da migração transendotelial de leucócitos em pulmão de camundongos
induzida por nanopartículas magnéticas funcionalizadas com DMSA.**

Caroline Rodrigues Alves Valois

2009

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese...

Aos meus queridos pais, Celso e Marília, meus maiores exemplos de vida, que sempre me amaram, incentivaram e proporcionaram tranqüilidade para que eu pudesse lutar por meus ideais com dignidade. A eles o meu eterno amor e gratidão.

Aos meus queridos irmãos, Igor e Leonardo, meus maiores amigos, dos quais sempre recebi apoio em todas as circunstâncias da minha vida.

Ao meu querido Anjinho Gleuton, meu porto seguro, com quem tenho compartilhado momentos valiosos de alegria e felicidade.

A todos aqueles que everedaram pelo caminho da atividade científica, ofereço a minha humilde contribuição.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, exemplo de orientador, agradeço pelos conhecimentos, oportunidades, confiança e carinho demonstrados ao longo de todos os anos que temos trabalhado juntos.

A mestranda Juliana Braz, minha querida pupila, pela cumplicidade demonstrada durante o desenvolvimento desta tese.

Aos meus companheiros de laboratório Cláudio Cavalcanti, Graziella Joanitti, João Paulo Longo, Larissa Naves, Luciana Pereira, Luis Muehlmann, Maitê Mijan, Mônica Garcia, Patrícia Cunha, Sacha Braun e Victoria Fuentes, obrigada por todas as informações e experiências compartilhadas.

Ao Prof. Dr. Wolfgang M. Kuebler, por toda a atenção e ensinamentos valiosíssimos para a elaboração desta tese.

A equipe do Prof. Dr. Wolfgang M. Kuebler, incluindo Arata Tabuchi, Esther Solymosi, Jun Yin e Liming Wang, obrigada pelo carinho com que me receberam e a amizade desenvolvida no curto período de convivência.

A Profa. Dra. Emília Lima e a aluna Eloiza Nunes, por terem cedido, gentilmente, o fluido magnético utilizado na parte experimental desta tese.

Ao Professor Dr. Rui Curi e ao aluno Marco Vinolo, pelo auxílio na execução de técnicas de biologia molecular e citometria de fluxo.

Ao Prof. Dra. Sônia Bão, pela confiança ao disponibilizar o uso dos equipamentos de microscopia.

Ao Prof. Dr. Jayme Santana e Prof. Dra. Anamélia Bocca, os quais constituíram a Banca Examinadora da Qualificação, pelas valiosas sugestões para o desenvolvimento da etapa final desta tese.

Aos técnicos Antônio Djalma Santos e José Felipe da Silva e a todos os demais funcionários da Universidade de Brasília, que sempre me compreenderam e nunca negaram esforços para auxiliar no meu desenvolvimento científico e profissional.

A Universidade de Brasília, que me acolheu como aluna e proporcionou a oportunidade de continuar os meus estudos.

A Capes, CNPq, FAP-DF e Finatec, pelo apoio financeiro.

Agradeço também a todos que de forma silenciosa contribuíram para a realização desta tese.

RESUMO

Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (NPMs-DMSA) consistem de uma nova e promissora estratégia para o carreamento de fármacos ao pulmão. A migração transendotelial de leucócitos no pulmão é um efeito adverso da administração endovenosa das NPMs-DMSA. Por meio da análise citológica e fenotípica de células do lavado bronco-alveolar de camundongos, nós identificamos que monócitos/macrófagos constituem a principal sub-população de leucócitos envolvida nesse processo. Além disso, a análise ultraestrutural revelou a presença de nanopartículas dentro de numerosos macrófagos provenientes do lavado bronco-alveolar. NPMs-DMSA na concentração tão alta quanto 1×10^{15} nanopartículas/mL não ocasionaram efeito tóxico em macrófagos, como evidenciado pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Notadamente, NPMs-DMSA aumentam os níveis de expressão do mRNA da E-, L- e P-selectina e do antígeno macrófágico-1 no pulmão de camundongos. O aumento dos níveis de expressão dessas moléculas de adesão foi associado com o aumento na concentração do fator de necrose tumoral- α . Finalmente, o papel crítico da via integrina- β 2 dependente na migração transendotelial induzida pelas NPMs-DMSA foi demonstrado por meio de animais nocaute. Nossos resultados caracterizam o mecanismo pró-inflamatório promovido pelas NPMs-DMSA no pulmão; e apontam intervenções alvejando a integrina- β 2 como uma promissora estratégia para prevenir ou atenuar a toxicidade das NPMs-DMSA no pulmão durante aplicações biomédicas.

ABSTRACT

Magnetic nanoparticles surface-functionalized with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (MNPs-DMSA) constitute an innovative and promising approach for delivery of therapeutic drugs in the lung. Transendothelial migration of leukocytes in the lung is a side effect of endovenous administration of MNPs-DMSA. Using cytologic and phenotypic analysis of murine bronchoalveolar lavage cells, we identified monocytes/macrophages as the main sub-population of leukocytes involved in this process. Moreover, ultrastructural analysis revealed the presence of nanoparticles inside of numerous macrophages from bronchoalveolar lavage. MNPs-DMSA at concentrations as high as 1×10^{15} nanoparticles/mL had no toxic effects on macrophages, as evidenced by 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Notably, MNPs-DMSA up-regulated the mRNA expression of E-, L- and P-selectin and macrophage-1 antigen in the murine lung. Upregulation of these cell adhesion molecules was associated with an increased concentration of tumor necrosis factor- α in lung. Finally, the critical relevance of the $\beta 2$ integrin-dependent pathway in leukocyte transmigration elicited by MNPs-DMSA was demonstrated by use of knockout mice. Our results characterize mechanisms of the pro-inflammatory effects of MNPs-DMSA in the lung, and identify $\beta 2$ integrin targeted interventions as promising strategies to prevent or attenuate pulmonary side effects of MNPs-DMSA during biomedical applications.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAMs	<i>Cell adhesion molecules</i> / Moléculas de adesão celular
CD	<i>Clusters of differentiation</i> / Antígeno de diferenciação
CSC	Componentes do sistema complemento
DMSA	<i>Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid</i> / Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> / Molécula de adesão intercelular
IL	<i>Interleukin</i> / Interleucina
LAD-1	<i>Leukocyte adhesion deficiency-1</i> / Deficiência de adesão leucocitária-1
LAM-1	<i>Leukocyte adhesion molecule-1</i> / Molécula de adesão leucocitária-1
LFA-1	<i>Leukocyte function associated antigen-1</i> / Antígeno associado à função leucocitária-1
LPA	Lesão pulmonar aguda
Mac-1	<i>Macrophage antigen-1</i> / Antígeno macrofágico-1
NPMs-DMSA	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com DMSA
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i> / Molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> / Fator de necrose tumoral
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> / Molécula de adesão celular vascular-1
VLA	<i>Very late antigen</i> / Antígeno muito tardio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Fluidos magnéticos	02
1.2 Fluido magnético contendo nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA	04
1.3 Migração transendotelial	05
1.4 Mecanismo geral da migração transendotelial	06
1.5 CAMs envolvidas na migração transendotelial	07
1.5.1 Família das selectinas	08
1.5.2 Família das integrinas	10
1.5.3 Superfamília das imunoglobulinas	12
1.6 CAMs e a migração transendotelial no pulmão induzida pelas NPMs-DMSA	13
2 OBJETIVO	15
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 ARTIGO	17
4 DISCUSSÃO	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fluidos magnéticos

Os fluidos magnéticos, também conhecidos como ferrofluidos, são suspensões constituídas de nanopartículas magnéticas dispersas em um solvente carreador orgânico ou inorgânico (GOETZE et al., 2002; MORAIS et al., 2006). As nanopartículas magnéticas podem ser sintetizadas a partir de várias ferritas cúbicas, cuja composição geral é $M^{+2}Fe_2O_4$, onde o M representa um metal que pode ser cobalto, magnetita, maguemita, manganês, níquel ou zinco, entre outros (SUN et al., 2004). Dentre esses, nanopartículas de maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), com tamanho entre 4 e 15 nm, são frequentemente utilizadas para a obtenção de suspensões coloidais estáveis em meio fisiológico (SUN et al., 2004; MORAIS et al., 2006; MCBAIN et al., 2008).

Além do tamanho das nanopartículas, a estabilidade dos fluidos magnéticos está relacionada com a presença de interações repulsivas entre as nanopartículas magnéticas que evitam a formação de aglomerações. Tais interações podem ser obtidas com o controle da carga elétrica presente na superfície das nanopartículas magnéticas e/ou cobertura das mesmas com longas cadeias de moléculas orgânicas (ODENBACH, 2004; PETTIBONE et al., 2008). Estas moléculas, conhecidas como surfactantes, evitam o contato entre as nanopartículas magnéticas, mantendo a suspensão recém sintetizada estável por anos (ODENBACH, 2004; MORAIS et al., 2006). São exemplos de surfactante: ácido cítrico, ácido poliaspártico, dextran e ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), entre outros.

Nos fluidos magnéticos, a interação da nanopartícula magnética com o líquido carreador é forte o bastante para que o comportamento magnético das nanopartículas seja transmitido à suspensão como um todo (MORAIS et al., 2006). Esta propriedade, juntamente com o fato da camada molecular estabilizante permitir que outros agentes, como, por exemplo, anticorpos ou quimioterápicos, sejam associados às nanopartículas magnéticas, tem despertado o interesse de vários centros de pesquisa no que se refere ao emprego de tais suspensões para o diagnóstico e tratamento de patologias (PANKHURST et al., 2003).

Nesse sentido, diversos estudos têm demonstrado a aplicabilidade dos fluidos magnéticos na condução de fármacos a alvos específicos no organismo, empregando-se magnetos externos (MAINARDES; SILVA, 2004). Já com a associação dos fluidos magnéticos à hipertermia, uma nova modalidade terapêutica está sendo desenvolvida, a magnetohipertermia. Nessa terapia um campo magnético é utilizado para induzir a vibração das nanopartículas magnéticas e, por conseguinte, o aumento da temperatura leva à lise e morte da célula alvo (ITO et al., 2004). Um outro emprego dos fluidos magnéticos é na magnetoforese, processo pelo qual ocorre a separação de células por meio de um campo magnético (CLEMENT et al., 2006). Os fluidos magnéticos estão sendo utilizados ainda como agentes de contraste em exames de imagem por ressonância magnética (CUNNINGHAM et al., 2005), e para detecção de células tumorais circulantes (GALANZHA et al., 2009).

1.2 Fluido magnético contendo nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA

Na diversidade de suspensões desenvolvidas até o momento, o fluido magnético contendo nanopartículas magnéticas funcionalizadas com DMSA (NPMs-DMSA) ganhou destaque devido ao seu comportamento biológico de caráter órgão-específico, conforme relatado por Chaves e colaboradores (2005) e Garcia e colaboradores (2005). Estes autores demonstraram, por meio de microscopia de luz e ressonância magnética, que as NPMs-DMSA se distribuem preferencialmente para o pulmão, no período de até 24 horas após a sua administração endovenosa, podendo, desta maneira, ser utilizada para diferentes aplicações biomédicas no órgão em questão (CHAVES et al., 2005; GARCIA et al., 2005).

No entanto, também tem sido relatado que a presença das NPMs-DMSA no pulmão desencadeia um quadro inflamatório leve caracterizado pela migração transendotelial de leucócitos dos vasos sanguíneos para o parênquima pulmonar (AZEVEDO et al., 2005; CHAVES et al., 2005). Aliado a isto, Garcia e colaboradores (2005), avaliando os efeitos subcrônicos e crônicos das NPMs-DMSA no período de até 90 dias após a sua administração endovenosa, relataram que a migração dos leucócitos pode se estender pelo parênquima pulmonar e alcançar o epitélio de alvéolos e brônquios.

É bem estabelecido na literatura que o acúmulo de leucócitos nos compartimentos extra-vasculares do pulmão pode causar lesão tecidual devido à liberação de substâncias tóxicas, tais como proteases e espécies reativas de oxigênio, resultando no desenvolvimento de quadros patológicos ou ainda contribuindo para o agravamento de doenças já estabelecidas (GUO; WARD, 2002).

No pulmão, a migração transendotelial está relacionada com a patogenia de doenças inflamatórias, como, por exemplo, a asma, a bronquite aguda e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (BLOEMEN et al., 1997; DOERSCHUK, 2000; HAMID et al., 2003). Outras condições, ainda menos favoráveis, apresentam um alto índice de mortalidade, não tendo sido desenvolvido, até o momento, um tratamento específico para as mesmas. Dentre estas últimas pode-se citar a lesão pulmonar aguda (LPA) e a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (O'BYRNE; POSTMA, 1999; SETHI; WAXMAN, 2001; GUO et al., 2002; ABRAHAM, 2003).

De particular interesse para o presente estudo, o acúmulo de leucócitos nos compartimentos extra-vasculares do pulmão reflete um efeito adverso causado pelas NPMs-DMSA a modelos animais (AZEVEDO et al., 2005; CHAVES et al., 2005; GARCIA et al., 2005), o que poderia contra-indicar a utilização de tais nanopartículas em seres humanos. Assim, embora as NPMs-DMSA forneça condições desejáveis para o seu emprego para o diagnóstico e tratamento de patologias no pulmão, investigações adicionais se fazem necessárias para o estabelecimento de estratégias que possam minimizar os efeitos tóxicos advindos de sua administração no organismo. Para tanto, é de fundamental importância conhecer os fatores endógenos envolvidos na migração transendotelial dos leucócitos no pulmão.

1.3 Migração transendotelial

Migração transendotelial é o termo utilizado para se referir ao conjunto de etapas que resultam na saída dos leucócitos circulantes dos vasos sanguíneos para o parênquima tissular (LIU et al., 2004; MARTIN; FREVERT, 2005; NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005). A migração transendotelial dos leucócitos pode ocorrer

tanto em condições fisiológicas normais quanto na presença de um estímulo inflamatório (BURNS et al., 2003); e embora existam diferentes tipos de células leucocitárias, as quais, por sua vez, são classificadas em 2 grupos: mononucleares (linfócitos e monócitos/macrófagos) e polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), todos os leucócitos migram dos vasos sanguíneos para o parênquima tissular por meio de um mecanismo semelhante (WAGNER; ROTH, 2000).

1.4 Mecanismo geral da migração transendotelial

O comportamento das células leucocitárias durante a migração transendotelial foi amplamente avaliado *in vivo*, em vênulas pós-capilares localizadas na circulação sistêmica, e em modelos experimentais *in vitro*, utilizando células endoteliais derivadas das grandes veias (LIU et al., 2004; MARTIN; FREVERT, 2005; NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005). A partir destes experimentos tornou-se possível estabelecer um mecanismo geral; o qual serve de base para o estudo da migração transendotelial dos leucócitos nas diferentes regiões do organismo (DOERSCHUK, 2000; WAGNER; ROTH, 2000; BURNS et al., 2003).

Quatro etapas distintas podem ser observadas durante a migração transendotelial dos leucócitos (Figura 1). São elas: (1) marginação, onde os leucócitos assumem uma posição periférica ao longo da superfície das células endoteliais; (2) captura e rolamento, onde ocorre a adesão transitória dos leucócitos ao endotélio; (3) adesão, onde ocorre a firme união dos leucócitos às células endoteliais; e (4) diapedese, onde ocorre a passagem dos leucócitos por entre as células endoteliais em direção ao parênquima tissular (LUSCINSKAS et al., 2002; BURNS et al., 2003; SIMON; GREEN, 2005).

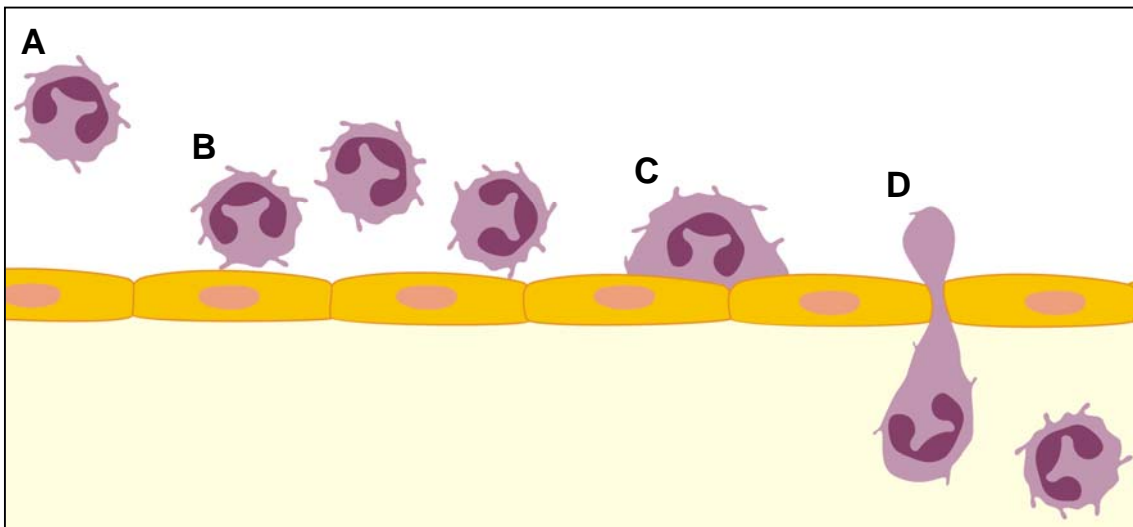


Figura 1. Representação esquemática das etapas observadas durante a migração transendotelial dos leucócitos. A) Marginação; B) Captura e rolamento; C) Adesão; D) Diapedese. Com exceção da marginação (A), todas as demais etapas da migração transendotelial (B-D) são ocasionadas a partir de sucessivas interações celulares mediadas pela expressão de CAMs localizadas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais.

Com exceção da marginação, que é originada a partir de mudanças nas condições hemodinâmicas da circulação sanguínea (DOERSCHUK, 2000; WAGNER; ROTH, 2000), todas as demais etapas da migração transendotelial, ou seja, captura e rolamento, adesão e diapedese, são ocasionadas a partir de sucessivas interações celulares, as quais, por sua vez, são mediadas pela expressão de moléculas de adesão celular (CAMs) localizadas na superfície dos leucócitos e/ou das células endoteliais, assim como de seus ligantes (LUSCINSKAS et al., 2002; BURNS et al., 2003; SIMON; GREEN, 2005).

1.5 CAMs envolvidas na migração transendotelial

As CAMs são moléculas expressas na superfície celular que atuam como mediadores da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (ALBERTS et al., 2002). Além disto, existem evidências de que, durante a migração transendotelial,

essas moléculas funcionam como co-estimuladores da ativação leucocitária (WAGNER; ROTH, 2000; SIMON; GREEN, 2005). As CAMs apresentam-se divididas, conforme a similaridade estrutural e funcional, em cinco grupos: caderinas, mucinas, família das selectinas, família das integrinas e superfamília das imunoglobulinas (ALBERTS et al., 2002; SIMON; GREEN, 2005). As principais CAMs envolvidas no processo de migração transendotelial dos leucócitos pertencem às famílias das selectinas e integrinas e à superfamília das imunoglobulinas; e seus níveis de expressão no pulmão podem ser regulados por citocinas, tais como a interleucina-10 (IL-10, anti-inflamatória) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α , pró-inflamatória) (LO et al., 1992; MULLIGAN et al., 1993; INOUE 2000; O'DEA et al., 2005).

1.5.1 Família das selectinas

As selectinas são proteínas transmembrana de cadeia única que contém um domínio extracelular amino-terminal (N-terminal) do tipo lectina (BARKHAUSEN et al., 2005; SIMON; GREEN, 2005). A família das selectinas é formada por três membros: E-, L- e P-selectina, denominados de acordo com a célula onde foram identificados pela primeira vez, ou seja, células endoteliais (E-selectina), linfócitos (L-selectina) ou plaquetas (P-selectina) (WAGNER; ROTH, 2000; BARKHAUSEN et al., 2005).

As selectinas são encontradas exclusivamente em células relacionadas com a fisiologia vascular:

a) E-selectina é sintetizada e expressa de forma transitória no endotélio vascular após a estimulação das células endoteliais (WAGNER; ROTH, 2000). O nível

máximo de expressão da E-selectina é atingido entre 4 e 6 horas após o estímulo, o qual é mantido por cerca de 48 horas e em seguida diminui progressivamente até desaparecer após 72 horas (AZUMA et al., 2000; BARKHAUSEN et al., 2005);

b) L-selectina é encontrada nas microvilosidades de todos os leucócitos, exceto na subpopulação de linfócitos T de memória; e é a única selectina expressa constitutivamente na superfície celular (BARKHAUSEN et al., 2005). Após a ativação leucocitária, a maior parte da L-selectina é liberada para o meio externo, por meio de clivagem proteolítica, dando origem a uma forma solúvel dessa molécula, a qual permanece livre no plasma sanguíneo (WAGNER; ROTH, 2000);

b) P-selectina é armazenada nos grânulos- α das plaquetas e em vesículas intracitoplasmáticas das células endoteliais, as quais são conhecidas como corpúsculos de Weibel-Palade; sendo transportada, em poucos minutos e de forma transitória, desde os grânulos secretores até a superfície celular, após a ativação do endotélio (WAGNER; ROTH, 2000).

As selectinas reconhecem e se unem, por meio do domínio lectina, a diversos carboidratos, os quais se encontram usualmente conjugados a proteínas transmembrana presentes na superfície das células endoteliais (L-selectina) ou leucocitárias (E- e P-selectina) (BARKHAUSEN et al., 2005). A interação das selectinas com os seus ligantes é de afinidade relativamente baixa (SIMON; GREEN, 2005). Isto ocasiona a união dos leucócitos à parede vascular (captura) e, ao mesmo tempo, permite que essas células rolem ao longo do endotélio (rolamento), impulsionadas pelo fluxo sanguíneo (WAGNER; ROTH, 2000; ALBERTS et al., 2002). Tais eventos compreendem uma das etapas iniciais da migração transendotelial dos leucócitos, a qual é chamada de captura e rolamento, como citado anteriormente. Nessa etapa, o íntimo contato com as células endoteliais

possibilita aos leucócitos encontrar fatores de ativação específicos, os quais, por sua vez, induzem sua firme união e posterior diapedese (BARKHAUSEN et al., 2005; SIMON; GREEN, 2005). Em caso da ausência desses fatores de ativação, os leucócitos perderão o contato com as células endoteliais e voltarão à corrente sanguínea (WAGNER; ROTH, 2000).

1.5.2 Família das integrinas

As integrinas compreendem um amplo grupo de moléculas heterodiméricas constituídas por duas subunidades polipeptídicas transmembrana denominadas como cadeias β e α (HYNES, 2002). A família se subdivide em diversas subfamílias dependendo da cadeia β que a constitui (HYNES, 2002; SIMON; GREEN, 2005). Ao todo 24 heterodímeros de integrinas, formados por 8 tipos de cadeia β e 18 tipos de cadeia α , já foram identificados e novos tipos estão ainda sendo descobertos (LUSCINSKAS; LAWLER, 1994; WAGNER; ROTH, 2000; SIMON; GREEN, 2005). De particular interesse para este estudo, a subfamília $\beta 1$ consiste de uma cadeia $\beta 1$ (integrina- $\beta 1$) ligada a uma das seguintes cadeias: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 11$ ou αV (LUSCINSKAS; LAWLER, 1994); enquanto que a subfamília $\beta 2$ consiste de uma cadeia $\beta 2$ (integrina- $\beta 2$) ligada à cadeia αL (LFA-1: antígeno associado à função leucocitária-1), αM (Mac-1: antígeno macrofágico-1), αX (gp 150,95: glicoproteína 150,95) ou αD ($\beta 2\alpha D$) (HYNES, 2002). Apesar da maior parte das cadeias β e α das integrinas corresponderem a antígenos de diferenciação leucocitária, somente as integrinas da subfamília $\beta 2$ são usualmente designadas com a nomenclatura correspondente a tais antígenos, assim temos: $\beta 2 = CD18$, $\alpha L =$

CD11a, α M= CD11b, α X= CD11c e α D= CD11d (LUSCINSKAS; LAWLER, 1994; SIMON; GREEN, 2005).

As integrinas da subfamília β 1 são encontradas na maioria das células do organismo (LUSCINSKAS; LAWLER, 1994; HYNES, 2002). No que se refere às células leucocitárias, as integrinas de β 1 α 1 a β 1 α 6 são encontradas nos linfócitos, onde aumentam os níveis de expressão dias após a sua ativação e, por esta razão, também são conhecidas como antígeno muito tardio (VLA), assim temos: β 1 α 1= VLA-1, β 1 α 2= VLA-2, β 1 α 3= VLA-3, β 1 α 4= VLA-4, β 1 α 5= VLA-5 e β 1 α 6= VLA-6 (LUSCINSKAS; LAWLER, 1994). A integrina VLA-4 também é encontrada em eosinófilos, monócitos e neutrófilos (TASAKA et al., 2002; YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002). Já as integrinas da subfamília β 2 são encontradas exclusivamente nas células leucocitárias; sendo que a integrina LFA-1 é encontrada principalmente em linfócitos, enquanto que as integrinas Mac-1, gp 150,95 e β 2 α D são encontradas em todos os tipos de leucócitos (WAGNER; ROTH, 2000; HYNES, 2002).

Embora sejam expressas constitutivamente na superfície celular, as integrinas da subfamília β 1 e β 2 precisam ser ativadas para interagir com seus ligantes (HYNES, 2002). Tal ativação é caracterizada por uma mudança na forma dessas integrinas, expondo os seus domínios de ligação localizados nas cadeias β e α , tornando-as capazes de interagir com seus ligantes (WAGNER; ROTH, 2000).

Ao contrário das selectinas, as integrinas das subfamílias β 1 e β 2 interagem fortemente com seus ligantes localizados nas células endoteliais (SIMON; GREEN, 2005). Este fato resulta na firme união dos leucócitos à parede vascular, dando origem a uma outra etapa do processo de migração transendotelial, a qual é chamada de adesão, como citado anteriormente (BURNS et al., 2003; SIMON; GREEN, 2005). As integrinas da subfamília β 2 têm sido descritas como as principais

moléculas que participam da adesão dos leucócitos ao endotélio durante a migração transendotelial. Talvez a maior evidência desse envolvimento seja uma síndrome conhecida como deficiência de adesão leucocitária-1 (LAD-1), onde a presença de uma variedade de mutações na cadeia $\beta 2$ das integrinas evita a formação de heterodímeros. Por conseguinte, as integrinas da subfamília $\beta 2$ estão ausentes ou em quantidades inferiores a 10% nos leucócitos. Tal síndrome está associada à inabilidade das células leucocitárias se aderirem firmemente à parede dos vasos sanguíneos e, desta maneira, o acúmulo de leucócitos nos sítios de migração reduz significativamente. Indivíduos portadores dessa condição sofrem repetidas infecções bacterianas, as quais podem levar até mesmo à morte (HAWKINS et al., 1992).

1.5.3 Superfamília das imunoglobulinas

A superfamília das imunoglobulinas compreende uma variedade de proteínas de membrana de cadeia única que contêm um ou mais domínios com características semelhantes às imunoglobulinas (BURNS et al., 2003; SIMON; GREEN, 2005). Fazem parte desta superfamília uma variedade de CAMs que participam da migração transendotelial dos leucócitos, as quais são conhecidas como molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, -2 e -3, molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão celular dirigida à mucosa-1 (Mad-CAM-1) e molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1 (PECAM-1). ICAM-1, -2 e -3, VCAM-1 e Mad-CAM-1 são ligantes para CAMs pertencentes às famílias das selectinas ou integrinas. Já a PECAM-1 funciona como seu próprio ligante, uma vez que é capaz de realizar interações de caráter homofílico expressas em outras células (WAGNER; ROTH, 2000).

No que se refere à distribuição, a ICAM-1 é expressa constitutivamente nos leucócitos e nas células endoteliais e epiteliais, incluindo a superfície apical dos pneumócitos que recobrem os alvéolos pulmonares (BURNS et al., 2003; ZEN; PARKOS, 2003). A VCAM-1 é encontrada, também de forma constitutiva, nas células endoteliais e em algumas células dendríticas (WAGNER; ROTH, 2000). Ambas ICAM-1 e VCAM-1 apresentam baixos níveis de expressão em condições fisiológicas normais, porém são sintetizadas após a estimulação (WAGNER; ROTH, 2000; BURNS et al., 2003). A ICAM-2 é expressa em alguns leucócitos, nas células endoteliais e nas plaquetas; e seus níveis de expressão não se alteram após a estimulação celular (SIMON; GREEN, 2005). A ICAM-3 é encontrada em todos os leucócitos e nas células endoteliais (SIMON; GREEN, 2005). A PECAM-1 é expressa constitutivamente nos leucócitos, nas células endoteliais e nas plaquetas. Nas células endoteliais, a PECAM-1 está localizada principalmente nas regiões próximas às junções celulares, onde atua mediando a passagem dos leucócitos por entre as células endoteliais (etapa de diapedese), durante o processo de migração transendotelial (WAGNER; ROTH, 2000; BURNS et al., 2003).

1.6 CAMs e a migração transendotelial no pulmão induzida pelas NPMs-DMSA

As CAMs envolvidas no processo de migração transendotelial dos leucócitos no pulmão sempre interessaram a comunidade científica, não apenas para o esclarecimento do evento em si, mas na esperança de utilizar tal informação na prevenção e tratamento de patologias. Neste sentido, em um recente estudo realizado por nosso grupo, onde foram avaliados o padrão de expressão de CAMs nos períodos de 4 e 12 horas após a administração endovenosa de NPMs-DMSA em

camundongos, observou-se que tais nanopartículas modularam o padrão de expressão de selectinas (E-selectina) e integrinas (Mac-1 e LFA-1) nos diferentes compartimentos da vascularização pulmonar (capilar, veia e vênula) (VALOIS et al., 2009). Estes resultados são fortes indícios de que um possível mecanismo pelo qual as NPMs-DMSA promove a atividade migratória de leucócitos no pulmão é baseado na sua habilidade de modular a expressão de CAMs nas células leucocitárias e/ou endoteliais. A confirmação dessa hipótese poderia resultar no desenvolvimento de novas estratégias para minimizar a potencial toxicidade das NPMs-DMSA no pulmão durante aplicações biomédicas.

2 OBJETIVO

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

Considerando a literatura pertinente, este trabalho tem como objetivo estudar a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão de camundongos tratados com NPMs-DMSA; e sua interrelação com as moléculas de adesão celular.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a cinética da atividade migratória induzida pelas NPMs-DMSA;
- b) Determinar a(s) sub-população(ões) de leucócitos que participam desse processo;
- c) Avaliar a citotoxicidade das NPMs-DMSA em leucócitos;
- d) Quantificar o nível de expressão do mRNA das CAMs: E-, L- e P-selectina, LFA-1, Mac-1, VLA-4 e VCAM-1, durante o transcurso da migração transendotelial no pulmão após a administração das NPMs-DMSA;
- e) Analisar o efeito das NPMs-DMSA na produção das citocinas IL-10 e TNF no pulmão;
- f) Estabelecer uma possível correlação entre a expressão de uma ou mais CAMs, com o intuito de identificar a via que leva a atividade migratória induzida pela administração das NPMs-DMSA.

3 ARTIGO



The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a β_2 integrin-dependent pathway

Caroline R.A. Valois^a, Juliana M. Braz^a, Eloiza S. Nunes^b, Marco A.R. Vinolo^c, Emilia C.D. Lima^b, Rui Curi^c, Wolfgang M. Kuebler^d, Ricardo B. Azevedo^{a,*}

^aDepartment of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

^bInstitute of Chemistry, University Federal of Goiás, Goiânia, GO 74001-970, Brazil

^cDepartment of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

^dThe Keenan Research Center, Li Ka Shing Knowledge Institute, St. Michael's Hospital, Toronto, ON M5B 1W8, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2009

Accepted 15 September 2009

Available online 12 October 2009

Keywords:

Cell adhesion

Integrin

Leukocyte

Lung

Nanoparticle

Selectin

ABSTRACT

Magnetic nanoparticles surface-functionalized with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (MNPs-DMSA) constitute an innovative and promising approach for tissue- and cell-targeted delivery of therapeutic drugs in the lung. Transendothelial migration of leukocytes in the lung is a side effect of endovenous administration of MNPs-DMSA. Using cytologic and phenotypic analysis of murine bronchoalveolar lavage cells, we identified monocytes/macrophages as the main subpopulation of leukocytes involved in this process. Moreover, ultrastructural analysis revealed the presence of nanoparticles inside of numerous macrophages from bronchoalveolar lavage. MNPs-DMSA at concentrations as high as 1×10^{15} nanoparticles/mL had no toxic effects on macrophages, as evidenced by 3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Notably, MNPs-DMSA up-regulated the mRNA expression of E-, L- and P-selectin and macrophage-1 antigen in the murine lung. Upregulation of these cell adhesion molecules was associated with an increased concentration of tumor necrosis factor- α in lung. Finally, the critical relevance of the β_2 integrin-dependent pathway in leukocyte transmigration elicited by MNPs-DMSA was demonstrated by use of knockout mice. Our results characterize mechanisms of the pro-inflammatory effects of MNPs-DMSA in the lung, and identify β_2 integrin-targeted interventions as promising strategies to reduce pulmonary side effects of MNPs-DMSA during biomedical applications.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, magnetic nanoparticles (MNPs) have gained growing importance as materials for drug delivery systems. MNPs consist of a superparamagnetic iron-oxide core embedded in a coat that allows the conjugating of MNPs surface with drug molecules [1]. The efficiency of clinical treatment based on MNPs depends upon the ability of these particles to accumulate at specific sites in the body. MNPs surface-functionalized with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (MNPs-DMSA) present preferential distribution for the lung from 5 min up to 24 h after intravenous administration [2]. This target specificity of MNPs-DMSA offers a unique property which may be successfully exploited for the treatment of lung diseases, in that comparably high doses of drugs can be delivered to the lung without increasing side effects in extrapulmonary organs

[3]. However, MNPs-DMSA cause transendothelial migration of leukocytes from blood vessels into the lung parenchyma or airspace [4–6]. Leukocyte accumulation in the extravascular compartments of the lung may cause tissue injury by excessive release of toxic substances, including proteases and reactive oxygen species [7,8], and thus constitutes a potentially harmful side effect of MNPs-DMSA in the lung during clinical applications.

The mechanisms underlying the transendothelial migration of leukocytes in the lung have previously been investigated in numerous studies. This process involves the interaction of different cell adhesion molecules, including selectins, integrins and members of the immunoglobulin superfamily [9–12]. Selectins (E-, L- and P-selectin) are a family of transmembrane molecules that mediate initial capture and rolling of leukocytes along the vascular wall [13,14]. The integrins are a large family of heterodimeric cell surface receptors consisting of an α - and a β -subunit, which are grouped in distinct subfamilies based on β -subunit utilization [15]. During transendothelial migration, members of the β_2 integrins subfamily, in particular $\alpha_L\beta_2$ integrin (leukocyte function associated antigen-1,

* Corresponding author. Tel./fax: +55 61 3349 6167.

E-mail address: razevedo@unb.br (R.B. Azevedo).

LFA-1) and $\alpha_M\beta_2$ integrin (macrophage-1 antigen, Mac-1), mediate firm adhesion of leukocytes to the endothelium as a prerequisite for subsequent leukocyte diapedesis into the parenchyma [9,13,14]. However, depending on the initial inflammatory stimulus, trans-endothelial migration of leukocytes into the lung may also occur by β_2 integrin-independent pathways, which in part depend upon members of the β_1 integrins subfamily, namely the interaction of $\alpha_4\beta_1$ (very late antigen-4, VLA-4) with its ligand vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) of the immunoglobulin superfamily [16–18]. By regulating the expression levels of various cell adhesion molecules, cytokines, such as interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) play pivotal roles in the regulation of transendothelial leukocyte migration [19–22].

In a recent study we proposed that a possible mechanism by which MNPs-DMSA induce transendothelial migration of leukocytes into the lung is based on their ability to modulate the expression of cell adhesion molecules on leukocytes and lung vascular endothelial cells [6]. In order to test this hypothesis in the present study, we first analyzed the time profile of leukocyte migration into the airspaces following MNPs-DMSA administration and the subpopulation of leukocytes involved in this process. Next, we determined the effect of MNPs-DMSA on the release of inflammatory cytokines and the expression of three classes of cell adhesion molecules. Based on these data, we finally identified the adhesion molecule pathway by which MNPs-DMSA elicit leukocyte transmigration by use of knockout mice.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All chemicals employed in the present study were of analytical grade, used without further purification and purchased from either Carlo Herba (Milan, Italy), Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA), Invitrogen (Rockville, USA), Merck (Rio de Janeiro, Brazil), Synth (Diadema, Brazil), Newprov (Pinhais, Brazil) or Sigma (St. Louis, USA). Flow cytometry antibodies were obtained from eBioscience (San Diego, USA). Elisa kits were obtained from BD Biosciences (San Diego, USA). Primers were synthesized by Integrated DNA Technologies (Coralville, USA).

2.2. Preparation of magnetic nanoparticles

MNPs-DMSA were prepared as previously described [23,24]. Briefly, magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles were synthesized by mixing ferric and ferrous chloride aqueous solutions (2:1 molar ratio) with concentrated ammonia aqueous solution under vigorous stirring. Five mL of DMSA aqueous solution (0.3 mol/L) was added to 25 mL of magnetic suspension in a molar ratio DMSA/Fe of 11%. NaCl was added to the suspension to reach final salinity concentration of 0.9% wt/v. The pH was adjusted to the range of 7.2–7.4.

2.3. Characterization of magnetic nanoparticles

Electron micrographs were obtained with a Jeol 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan). X-ray powder diffraction (XRD) data were collected by a XRD-6000 diffractometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The average diameter of the nanocrystalline domain (d) was estimated using the Scherrer's equation [25]. Atomic absorption spectrophotometry was conducted by a commercial Perkin-Elmer 5000 system (Perkin-Elmer, Norwalk, USA). Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) was recorded in the range of 400–4000 cm^{-1} with a Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrophotometer (Bomem MB Series, Quebec, Canada). Zeta potential was obtained from electrophoretic mobility (μe) measurements performed by phase analysis light scattering using ZetaSizer Nano ZS equipment (Malvern Instruments, Malvern, UK). The concentration of thiolale groups immobilized on the surface of MNPs was quantified by Ellman's reagent [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] [26].

2.4. Animals and cells

Animal experiments were carried out in 12-week-old male mice weighing 30–35 g from the following strains: Swiss (IQUEGO, Goiânia, Brazil), β_2 integrin knockout C57BL/6 (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil) and wild-type C57BL/6 (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil). The mice were randomly divided into 2 groups according to treatments. Mice of the experimental group (MNPs) received 100 μL of MNPs-DMSA suspension (dose of 7×10^{13}

nanoparticles/g weight body in saline) through the tail vein. Mice of the control group received 100 μL of saline. Alveolar macrophages were obtained by bronchoalveolar lavage performed on 6 untreated Swiss mice. The experimental protocols were approved by the animal care committee of the University of Brasília (Brasília, Brazil).

2.5. Migration activity

2.5.1. Number of leukocytes in the bronchoalveolar lavage fluid

Cells from the bronchoalveolar space of Swiss mice ($n = 5$ for each subgroup) were harvested by bronchoalveolar lavage immediately after vascular perfusion. Briefly, the trachea was exposed and a polyethylene catheter was inserted into the trachea through an incision while PBS (1 mL) was repeatedly infused intratracheally and withdrawn. Bronchoalveolar lavage fluid was centrifuged for 10 min at 500 g. The pellet was resuspended in 100 μL of PBS whereas 10 μL aliquot was used for cell counting in a Neubauer chamber (C. A. Hausser & Son, Philadelphia, USA).

2.5.2. Cytologic analyses

Smears from bronchoalveolar lavage cells of Swiss mice ($n = 5$ for each subgroup) were prepared on 1% BSA/PBS-coated slides. The cells were air-dried, fixed with methanol and stained with a rapid Instant Prov Stain kit. Differential cell counts were performed under oil immersion microscopy (Axioskop; Zeiss, Oberkochen, Germany). A total of 400 cells were counted and classified as lymphocytes, macrophages or polymorphonuclear cells (PMN) based on morphological criteria.

2.5.3. Phenotypic analysis of macrophages

Bronchoalveolar lavage cells of Swiss mice ($n = 5$ for each subgroup) were stained with rat anti-mouse F4/80-FITC antibody (clone BM8), that was gated over the leukocyte population (cells CD45-positive, clone 30-F11). Appropriate rat anti-mouse isotype antibodies were used to set the leukocyte gate. A total of 10,000 gated events were collected on a FACS Calibur (Becton Dickinson, San Juan, USA) and analyzed by using Cell Quest software (Becton Dickinson, San Juan, USA).

2.6. Macrophage uptake of MNPs-DMSA

2.6.1. Transmission electron microscopy

Bronchoalveolar lavage cells of Swiss mice ($n = 5$ for each subgroup) were fixed for 1 h at room temperature in a solution containing 2% (v/v) glutaraldehyde, 2% (wt/v) paraformaldehyde and 3% (wt/v) sucrose in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2). After fixation, the cells were rinsed in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) and postfixed for 1 h in a solution containing 1% (wt/v) osmium tetroxide, 0.8% (wt/v) potassium ferricyanide and 5 mM CaCl_2 in sodium cacodylate buffer (pH 7.2). The cells were dehydrated and embedded in Spurr resin. Ultra-thin sections were collected and examined with a Jeol 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

2.6.2. In vitro cytotoxicity

Macrophages from bronchoalveolar lavage of Swiss mice were incubated with culture medium [Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with NaHCO_3 (3.7 g/L), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 10% fetal calf serum] containing MNPs-DMSA in increasing concentrations (1×10^{12} – 1×10^{15} nanoparticles/mL of culture medium) and the control. Cell viability was determined by 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay [27]. The absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, USA). Cell growth was expressed as percentage of control using the absorbance values of 6 replicates from 3 independent experiments.

2.7. Cell adhesion/emigration pathway

2.7.1. Cell adhesion molecule expression

The lungs of Swiss mice ($n = 5$ for each subgroup) were homogenized in 1 mL of TRIzol, DNase treated and converted to cDNA. Expression of cell adhesion molecules was determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) using a Rotor Gene-3000 equipment (Corbett Research, Mortlake, Australia) and with Sybr Green (1000 \times diluted) as the fluorescent dye. Primer sequences, annealing temperature and products amplified are shown in Table 1. Quantification of gene expression was carried out as described by Liu and Saint [28], using the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) gene as internal control. Amplification efficiency was calculated as described by Ramakers and colleagues [29].

2.7.2. Cytokine levels

The concentrations of IL-10 and TNF- α in lung homogenate supernatants of Swiss mice ($n = 5$ for each subgroup) were determined using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits following the instructions of the manufacturer.

Table 1
Primer sequences used for quantitative real-time PCR.

Gene	Primer sense	Primer anti-sense	TM ^a (°C)	Amplicon size (bp)
E-selectin	gcacatctgggataacgagacgc	tgggaagacattctatgttgc	56	279
L-selectin	aaatgtggacatgggtgggaac	ccttggactcttctgttggg	56	90
P-selectin	acgggtgttctctaggaggcac	gttctggggctctgttctcg	59	205
LFA-1	tgctgaccaataccttctgtgc	tgaggcaaatatgtggagcgtc	57	227
Mac-1	gcagtcattctgaggaccgtg	catgtccacagagcaaggag	57	174
VLA-4	gctgttggctactcgggtgtg	tctcctccaggcatgtctccc	60	215
VCAM-1	cagtcctgtgaacctgactgc	ttccagcctctgtaaccttc	56	179
Reference gene				
GAPDH	cggtgctgagatgtctggag	cacagtctctgggtggcagtg	59	295

^a Melting temperature.

2.7.3. β_2 integrin-dependent leukocyte migration

The involvement of the β_2 integrin-dependent pathway in the migration of leukocytes into the airspaces following MNP-DMSA administration was assessed by quantitative analysis of the total number of leukocytes in the bronchoalveolar lavage fluid of wild-type and β_2 integrin knockout C57BL/6 mice ($n = 5$ for each subgroup) as described above.

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as means and standard errors of the mean where applicable. Statistical analysis was performed using Prism version 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Student's unpaired *t* test was used to compare 2 data sets. One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's posthoc test were

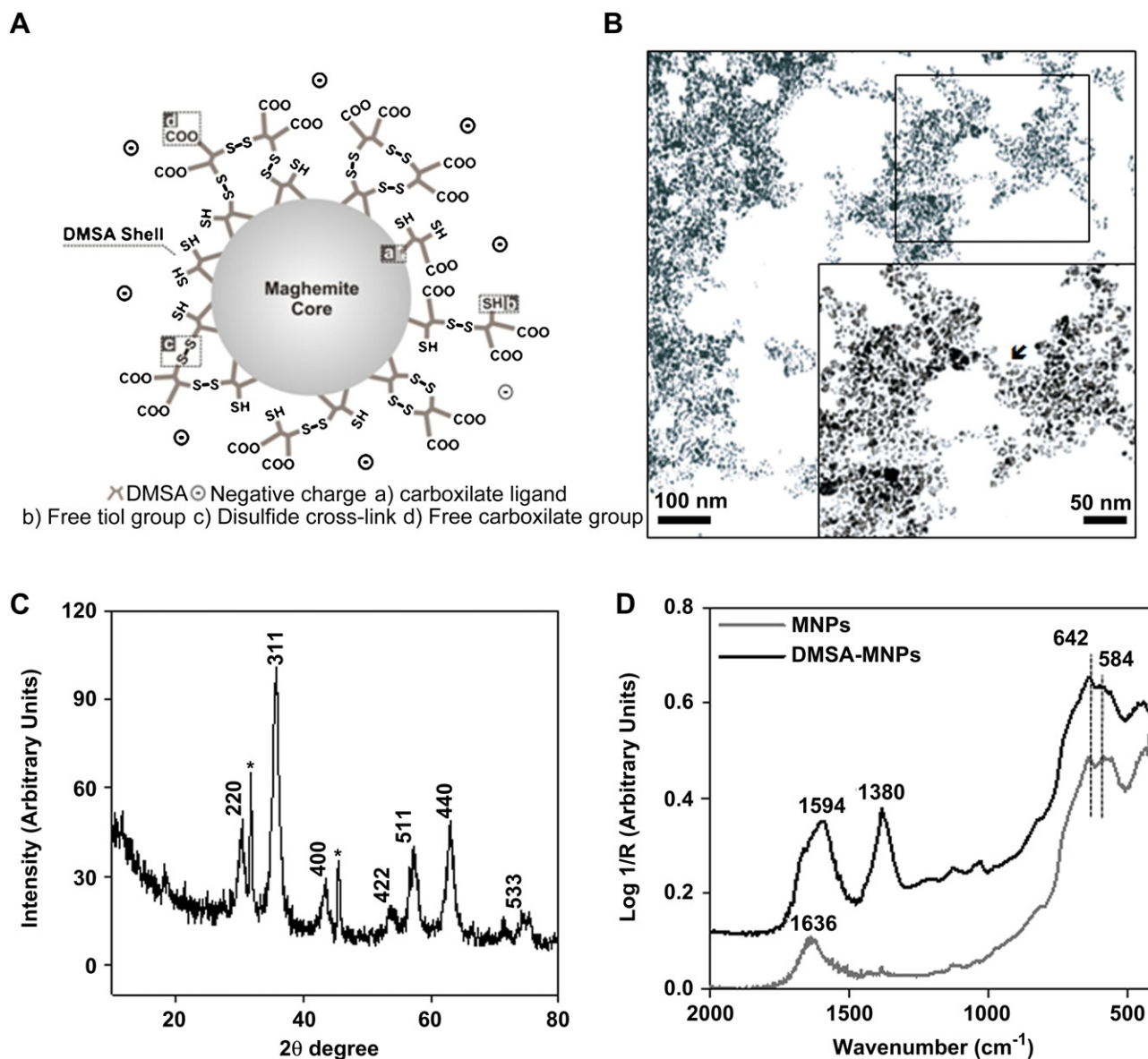


Fig. 1. (A) Schematic representation of DMSA-functionalized maghemite nanoparticles. (B) Typical transmission electron micrograph of maghemite nanoparticles (arrow). (C) XRD analysis of maghemite nanoparticles functionalized with DMSA. The picks marked with asterisks are attributable to the presence of NaCl in the suspension. (D) DRIFT of bare and DMSA-functionalized maghemite nanoparticles.

used to compare multiple data sets. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of magnetic nanoparticles

MNPs were synthesized by chemical co-precipitation and stable MNPs suspension was obtained via surface coating with DMSA. Fig. 1A shows a schematic representation of synthesized DMSA-functionalized maghemite nanoparticles. A typical electronmicrograph of the as-prepared MNPs sample given in Fig. 1B illustrates that particles are spherical in shape and have a narrow diameter range. These results suggest that particle synthesis resulted in adequate morphology and size distribution. The XRD pattern of the MNPs sample shown in Fig. 1C matches quite well with the reference pattern of maghemite according to International Center for Diffraction Data (ICDD; PDF No. 39-1346), revealing the cubic spinel ($Fd\bar{3}m$) structure. From the analysis of the 311 line the average nanoparticles diameter was estimated to be 8.1 nm, which is well within the required size boundaries to biomedical applications [30]. The peaks marked with asterisks are attributable to the presence of NaCl in the suspension, as identified according to ICDD; PDF No. 72-1668.

The elementary analysis of the molar ratio $Fe^{2+}/Fe^{3+} < 0.03$ by atomic absorption spectrophotometry revealed the efficient oxidation of nanoparticles from the magnetite phase to the maghemite phase. Moreover, in the DRIFT spectrum of both bare (MNPs) and DMSA-functionalized maghemite nanoparticles (DMSA-MNPs) shown in Fig. 1D the bands observed at 642 and 584 cm^{-1} are related to the vibrational stretching modes characteristic of the Fe–O bonding in tetrahedral and octahedral sites of maghemite, respectively [31]. The band appearing at 1636 cm^{-1} in the MNPs spectrum is due to the bending mode of water molecules, possibly due to molecules absorbed at the surface of the bare nanoparticles. In the DRIFT spectrum of DMSA-MNPs the bands observed at 1594 cm^{-1} and 1380 cm^{-1} are attributable to asymmetric and symmetric stretching vibration of carboxylate, respectively. The presence of such bands suggests that DMSA molecules were bound to Fe^{3+} ions located in the particle surface via COO^- groups [1]. As previously reported, this surface functionalization with DMSA provides the opportunity to target the accumulation of synthesized MNPs-DMSA specifically to the lung [2,5].

Zeta potential is an indicator of the colloidal stability of MNPs suspension. A higher electric charge on the surface of the MNPs-DMSA will prevent aggregation of MNPs in solution because of the strong repellent forces among particles [32]. In the present study, the zeta potential value of particles in the acidic precursor magnetic suspension was +40 mV. After functionalization with DMSA (and adjustment of pH to 7.2) the zeta potential of MNPs decreased to –47.7 mV. This negative charge was provided by the ionized carboxylate and/or thiolate groups of the DMSA molecule not bonded to MNPs surface. The high negative value of the zeta potential after functionalization of MNPs indicates that the synthesized MNPs-DMSA suspension has colloidal stability. From the Ellman's reaction the concentration of thiolate groups immobilized on the surface of MNPs was estimated to be 0.10 $\mu mol/mg$ of iron. The thiolate groups provide the opportunity for further functionalization of MNPs-DMSA with drug molecules [33].

3.2. Migration activity

While MNPs-DMSA has been shown to cause transendothelial migration of leukocytes into the lung [4–6], the time course of this process is still unclear. In the present study, we detected a time-

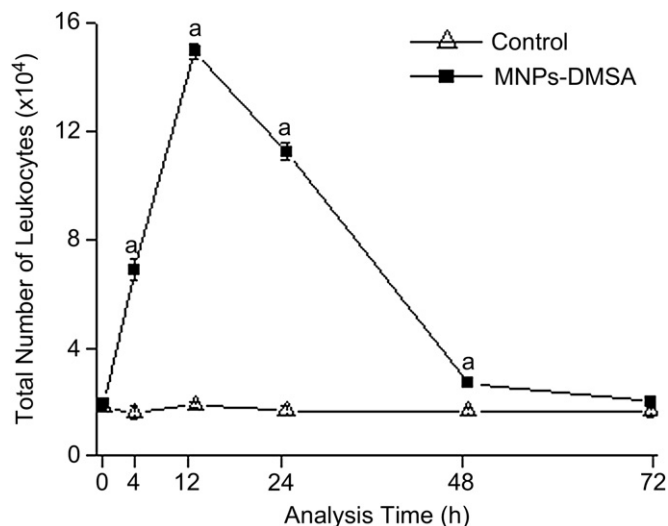


Fig. 2. Total number of leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid of mice. (a) $P < 0.05$ vs. time-matched control group and vs. all other time points within the MNPs-DMSA group.

dependent increase in the number of leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid within the first 12 h after administration of MNPs-DMSA as compared to controls ($P < 0.05$; Fig. 2). Thereafter, the number of leukocytes in the bronchoalveolar lavage decreased ($P < 0.05$), returning to baseline values at 72 h. This temporal profile of leukocyte emigration indicates that MNPs-DMSA administration constituted a transient inflammatory stimulus that abated over time e.g. by the redistribution of MNPs-DMSA's from the lung to other organs as liver and spleen over time as described previously [5,34].

Cytologic analysis of bronchoalveolar lavage cells shown in Table 2 revealed that, although there was a relative increase in the percentage of lymphocytes after MNPs-DMSA administration, macrophages were the predominant cellular component at all analyzed time points. Only a few PMN were observed between 4 and 24 h after MNPs-DMSA administration. The predominance of macrophages (over 80% at all time points investigated) was confirmed by phenotypic analyses shown in Fig. 3A. Since macrophages are derived mainly from blood monocytes [35], our results indicate that monocytes constitute the major subpopulation of leukocytes which are recruited into the airspace following administration of MNPs-DMSA. Importantly, the presence of increased numbers of monocytes/macrophages in the lung can cause excessive tissue injury via release of inflammatory cytokines, proteolytic enzymes and oxygen radicals [7,8]. Therefore, the increased transendothelial migration of such cells, although transient, may contribute to toxicity of MNPs-DMSA during biomedical applications in the lung.

Table 2
Cytologic analysis of bronchoalveolar lavage cells from mice treated with MNPs-DMSA.

Analysis time (h)	Number of cells ($\times 10^4$)			
	Total	Lymphocyte	Macrophage	PMN
0	1.95 \pm 0.11	0.07 \pm 0.01	1.89 \pm 0.11	^a
4	6.89 \pm 0.37	0.61 \pm 0.08	6.16 \pm 0.29	0.04 \pm 0.02
12	14.98 \pm 0.31	2.41 \pm 0.37	12.49 \pm 0.26	0.12 \pm 0.02
24	11.25 \pm 0.33	1.17 \pm 0.11	10.02 \pm 0.39	0.08 \pm 0.04
48	2.71 \pm 0.15	0.17 \pm 0.02	2.53 \pm 0.17	0.06 \pm 0.06
72	2.01 \pm 0.23	0.10 \pm 0.01	1.91 \pm 0.24	^a

^a Not observed.

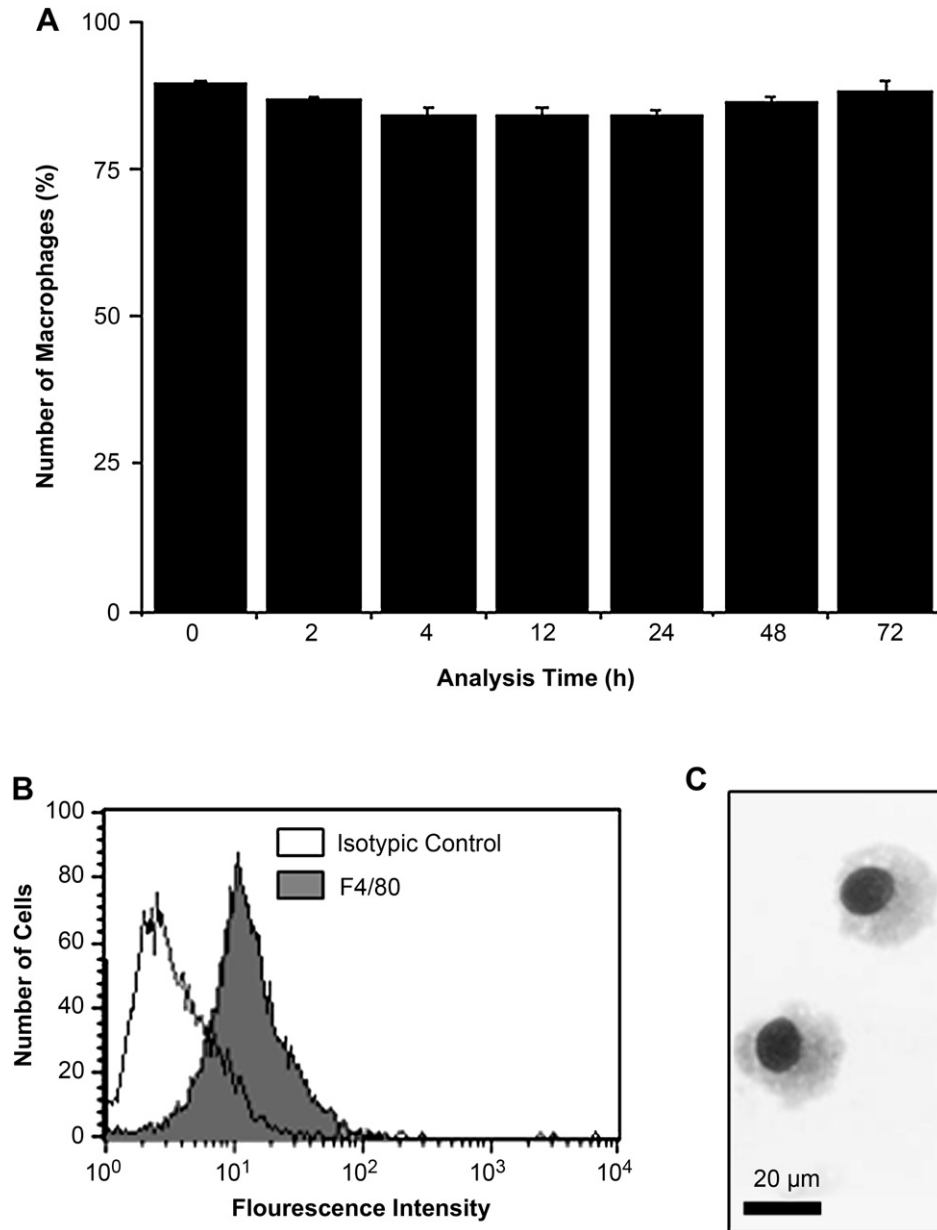


Fig. 3. (A) Flow cytometric analysis of bronchoalveolar lavage cells from mice treated with MNPs-DMSA. (B) Macrophage cells were identified by the expression of F4/80 within the leukocyte gate. (C) Representative photomicrograph of F4/80-positive cells sorted by flow cytometry.

3.3. Macrophage uptake of MNPs-DMSA

The adsorption of plasma proteins (opsonins) renders intravenously administered MNPs recognizable by monocytes/macrophages which contribute to the elimination of such nanoparticles from the bloodstream [30,36]. This fact raises the question whether the observed increase in transendothelial migration of monocytes/macrophages might be related to the clearance of intravascular MNPs-DMSA in the lung. The ultrastructural analysis of cells obtained from bronchoalveolar fluid after MNPs-DMSA administration shown in Fig. 4A–C revealed the presence of nanoparticles inside of numerous macrophages at all analyzed time points (4 and 12 h). Nanoparticles were mainly found packed within intracellular membrane-bound compartments resembling lysosomes, suggesting that MNPs-DMSA uptake occurred by endocytosis [37].

It is worth to note that macrophages with internalized nanoparticles did not show any signs of cell damage, such as disruption

of the cell membrane or organelles [38,39]; and were similar in ultrastructural appearance to macrophages from control mice (Fig. 4A–C), suggesting that MNPs were not toxic to macrophages after their uptake. This notion is further substantiated by data from MTT assays shown in Fig. 4D, which demonstrate that MNPs-DMSA at the concentrations tested did not induce any toxic effects on macrophages from bronchoalveolar lavage fluid and that cell viability remained more than 95% of control at concentration as high as 1×10^{15} nanoparticles/mL. This finding contrasts with the report of Sestier and colleagues [40] who found that MNPs-DMSA exhibit toxic effects on macrophages; and may be explained by the fact that these investigators used cell lines that were not derived from the lung, which differ functionally and phenotypically from macrophages isolated from the bronchoalveolar lavage fluid [41] may be more susceptible to MNPs-DMSA.

The mechanism by which MNPs-DMSA induce the extravasation of monocytes in the lung was not addressed in the present study.

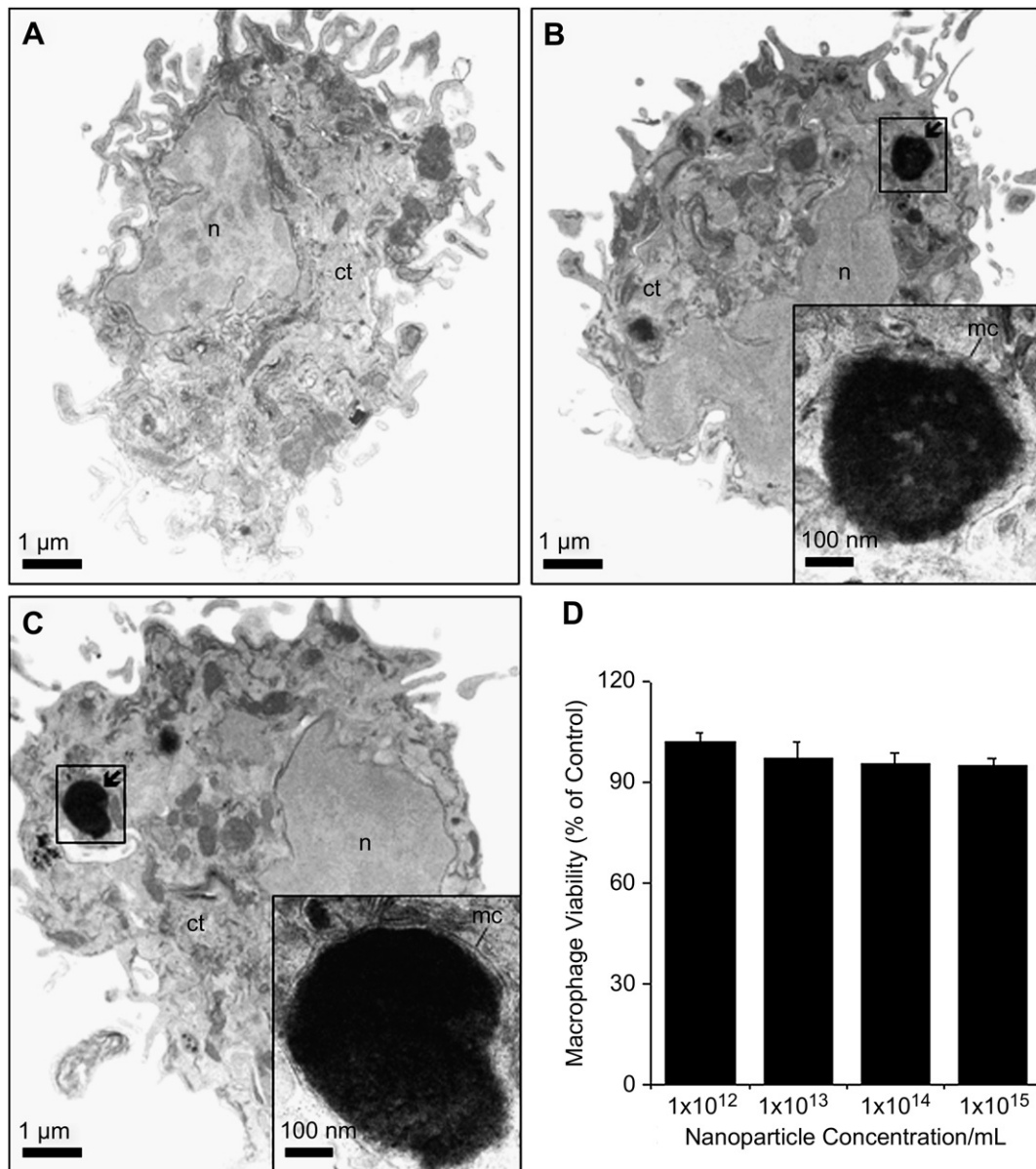


Fig. 4. Transmission electron micrographs of bronchoalveolar lavage macrophages obtained from control mice (A), and from mice 4 h (B) and 12 h (C) after treatment with MNPs-DMSA. ct = cytoplasm; mc = membrane-bound compartment; n = nucleus. (D) Dose-dependent effect of MNPs-DMSA on *in vitro* viability of macrophages. No significant differences between groups.

Nevertheless, some hypotheses can be proposed. As previously demonstrated in histological analyses [5], MNPs-DMSA may cross the endothelial barrier and reach the extravascular compartment of the lung. The influx of MNPs-DMSA into the lung could lead to the release of inflammatory cytokines which may attract blood monocytes into the lung parenchyma and airspace. This perspective is in agreement with the notion that a chemotactic gradient is required for the rapid recruitment of monocytes out of the lung vascular compartment [8]. An alternative possibility is that the emigration of monocytes from the bloodstream could be induced by serum-derived inflammatory factors, e.g. component of the complement system (CCS) [36,42–44], bound to the surface of intravenously administered MNPs-DMSA. In the latter case, the MNPs-DMSA-CCS could induce the activation and/or synthesis of cell adhesion molecules by blood monocytes, rendering them prone to transendothelial migration. This perspective does not exclude the possibility of a simultaneous chemotactic gradient, since the incorporation of

MNPs-DMSA-CCS complex may stimulate the release of inflammatory cytokines by translocated blood monocytes. Further experiments are necessary to clarify this important issue.

3.4. Cell adhesion/emigration pathway

Transendothelial migration of leukocytes into the lung may be mediated by different classes of cell adhesion molecules. These include E-, L- and P-selectin, the β_2 integrins LFA-1 and Mac-1, the β_1 integrin VLA-4 and the immunoglobulin-like adhesion molecule VCAM-1 [9–12]. In the present study, we used real-time PCR to assess the effect of MNPs-DMSA on mRNA expression of cell adhesion molecules in the murine lung. As shown in Fig. 5A, we found that MNPs-DMSA up-regulated the mRNA expression of E-, L- and P-selectin and Mac-1 ($P < 0.05$), which suggest that these cell adhesion molecules may be involved in the process of transendothelial migration of leukocytes induced by MNPs-DMSA in the lung.

Interestingly, we note that mRNA expression of E-, L- and P-selectin and Mac-1 reaches a peak at 4 h ($P < 0.05$, Fig. 5A), returning to almost control values at 12 h. This is intriguing because it indicates that the kinetics of mRNA expression for these cell adhesion molecules precedes those of transendothelial migration (Fig. 2), which peaks only after 12 h. An explanation for this apparent contradiction is that the number of leukocytes in the bronchoalveolar lavage fluid reflects the number of cells that has already crossed the endothelial barrier; and thus it is likely that the peak of transendothelial migration in fact occurs before the period of 12 h.

Upregulation of cell adhesion molecules in the lung is frequently associated with increased levels of the pro-inflammatory cytokine TNF- α [20,22]. In the present study we analyzed the effect of MNPs-DMSA on TNF- α levels in the lung by ELISA as shown in Fig. 5C. TNF- α levels were increased at 4 and 12 h after MNPs-DMSA administration compared to control group ($P < 0.05$). In addition, TNF- α level at 4 h was higher than at 12 h ($P < 0.05$). Increased pro-

inflammatory activity following administration of MNPs-DMSA was also evident as increased ratio of TNF- α over IL-10 at 4 h ($P < 0.05$; Fig. 5E). Taken together, these findings are compatible with our observation that MNPs-DMSA up-regulate the mRNA expression of cell adhesion molecules mainly within the first 4 h after their administration. Moreover, the increased level of IL-10 at 12 h ($P < 0.05$; Fig. 5D) may contribute to the relative downregulation of cell adhesion molecules at 12 h as compared to 4 h ($P < 0.05$, Fig. 5A). This notion is in agreement with previous reports [19,21] showing that IL-10 is able to limit the induction of cell adhesion molecules in the lung.

Integrins are cell adhesion molecules constitutively expressed on the cell surface and also stored within intracellular vesicles [15,45]. *De novo* synthesis of the integrins requires the transcription of mRNA. In the present study, no significant change in the mRNA levels of VLA-4 and LFA-1 as compared to control was detected at any time point (Fig. 5A), suggesting that MNPs-DMSA

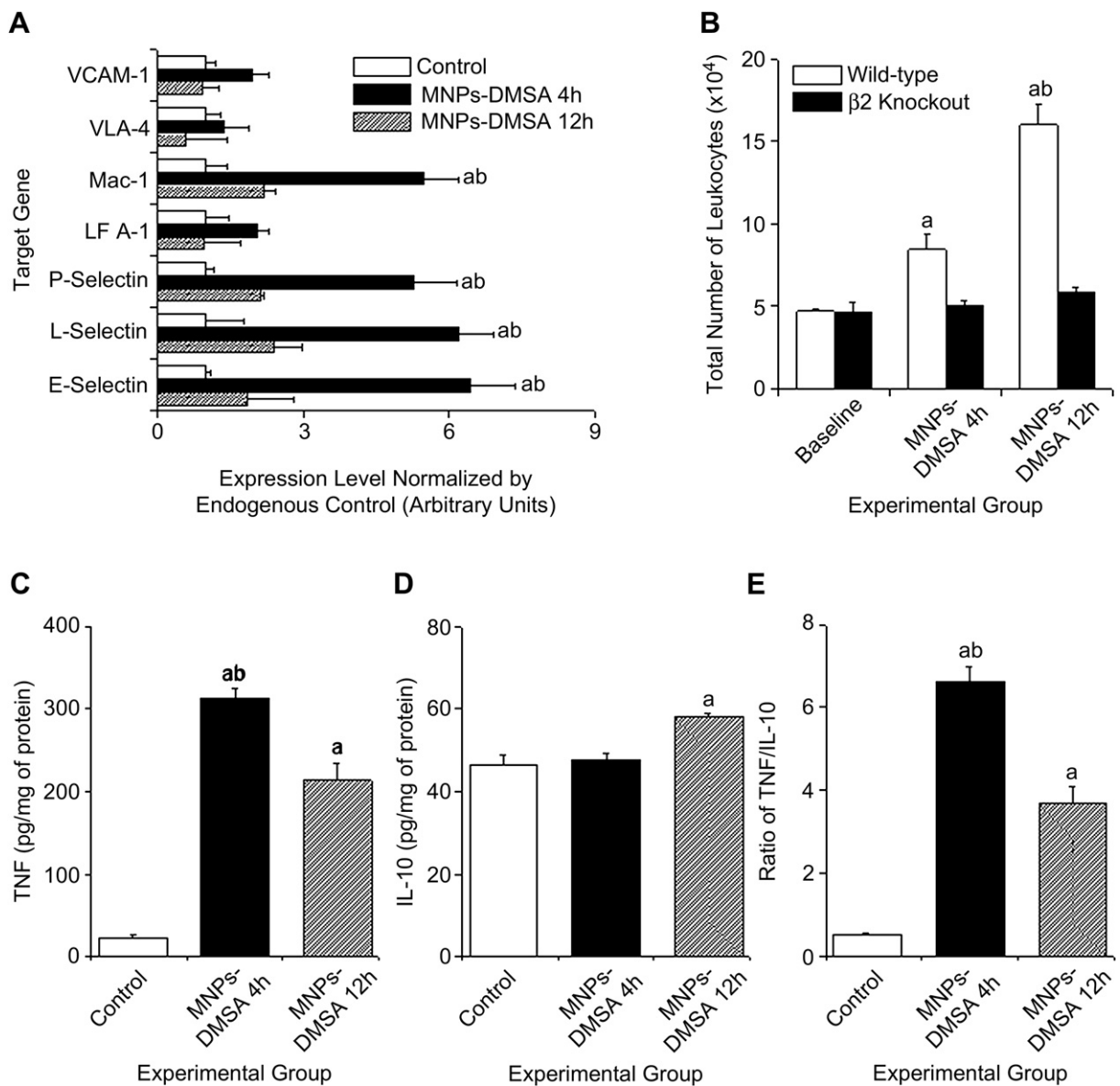


Fig. 5. (A) mRNA expression of cell adhesion molecules in lungs of control mice and 4 and 12 h after treatment with MNPs-DMSA. (a) $P < 0.05$ vs. control, (b) $P < 0.05$ vs. MNPs-DMSA 12 h. (B) Total number of leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid of $\beta 2$ integrin knockout and wild-type mice. (a) $P < 0.05$ vs. wild-type control, (b) $P < 0.05$ vs. MNPs-DMSA 4 h in wild-type mice. (C–E) Cytokine levels in lungs of control mice and 4 and 12 h after treatment with MNPs-DMSA. (a) $P < 0.05$ vs. control, (b) $P < 0.05$ vs. MNPs-DMSA 12 h.

did not induce the synthesis of such cell adhesion molecules in the lung. Transendothelial migration of leukocytes depends not only on the number of integrins on the cell surface, but also on the conformational state of these molecules reflecting their activation [45]. Therefore, our results do not exclude the possibility that MNPs-DMSA induce the activation of LFA-1 and VLA-4 constitutively located on the surface of leukocytes or the translocation of these integrins from intracellular vesicles to the plasma membrane. In this case, both LFA-1 and VLA-4 could play a functional role in the process of transendothelial migration of monocytes induced by MNPs-DMSA. Supporting this perspective, we have previously shown that MNPs-DMSA modulate the expression pattern of LFA-1 on leukocytes located in the vascular compartment of the lung [6]. Conversely, the absence of a significant change in the mRNA expression of VCAM-1 (Fig. 5A), which is the major endothelial cell ligand for VLA-4 [46,47], can be regarded as an indirect indicator that VLA-4 is not involved in this process. However, this notion does not take into account that VLA-4 may mediate the translocation of monocytes from the bloodstream by interacting with other ligands that were not addressed in the present study, such as fibronectin [46,47]. This possibility should be addressed in further investigations.

Importantly, we identified that MNPs-DMSA up-regulated the mRNA expression of the β_2 integrin Mac-1, whereas no effect was observed on the mRNA levels of the β_1 integrin VLA-4 (Fig. 5A). This finding raises the possibility that the transendothelial migration of monocytes induced by MNPs-DMSA is mediated via the β_2 integrin-dependent pathway. To directly address this issue, we evaluated the effect of MNPs-DMSA on the migration of leukocytes into the bronchoalveolar space of β_2 integrin knockout mice (deficient for the β_2 subunit common to all β_2 integrins), and wild-type controls (Fig. 5B). As compared to wild-type mice, the recruitment of leukocytes to the airspace following administration of MNPs-DMSA was completely blocked in β_2 integrin knockout mice ($P < 0.05$). This finding identifies a crucial role of the β_2 integrin pathway in the process of transendothelial migration of leukocytes induced by MNPs-DMSA in the lung. Since blockade of integrins by antibodies and/or receptor-based antagonists can interfere with the ability of leukocytes to extravasate *in vivo* [48], the above results identify β_2 integrin-inhibitors as a promising therapeutic strategy to prevent or minimize the pro-inflammatory effects of MNPs-DMSA during biomedical applications in the lung. Indeed, the evident pro-inflammatory effects of MNPs-DMSA [4–6] raise concern as to their use in humans. However, we consider the diagnostic and therapeutic potential of MNPs-DMSA so promising and broad in application that it outweighs by far this disadvantage, provided that tools can be developed to reduce the pro-inflammatory side effects to a minimum. For the development of these tools, a detailed understanding of the molecular and cellular pathomechanisms underlying the inflammatory response is indispensable. In the present manuscript, we identify a critical role for the β_2 integrin-dependent pathway in this scenario and propose accordingly that β_2 integrin-targeted interventions may present a promising strategy to reduce pulmonary side effects of MNPs-DMSA.

4. Conclusion

In this study we show that MNPs-DMSA induce a transient increase in transendothelial migration of leukocytes into the lung. Monocytes/macrophages constitute the main subpopulation of leukocytes involved in this process. The appearance of monocytes/macrophages in the airspace coincided with the ingestion of MNPs-DMSA, suggesting a functional relationship between the clearance of

MNPs-DMSA and the lung inflammatory response. MNPs-DMSA at concentration as high as 1×10^{15} nanoparticles/mL does not display toxic effects on macrophage cells from bronchoalveolar lavage fluid. Real-time PCR analyses indicated upregulation of cell adhesion molecules of the selectin family (E-, L- and P-selectin) and the β_2 -integrin Mac-1 in lungs following the administration of MNPs-DMSA, which was associated with increased levels of the pro-inflammatory cytokine TNF- α . Leukocyte emigration following MNPs-DMSA was absent in β_2 integrin knockout mice, indicating that inhibitors of this integrin may have potential to prevent pro-inflammatory side effects in the lung during MNPs-DMSA medical applications.

Acknowledgements

We thank the Brazilian agencies MCT/CNPq, FINATEC, FAP-DF, FINEP and FUNAPE for financial support.

Appendix

Figures with essential color discrimination. Fig. 1 of this article is difficult to interpret in black and white. The full color images can be found in the on-line version, at doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.053.

References

- [1] Morais PC, Santos RL, Pimenta ACM, Azevedo RB, Lima ECD. Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles. *Thin Solid Films* 2006;1:266–70.
- [2] Chaves SB, Lacava LM, Lacava ZGM, Silva O, Pelegrini F, Buske N, et al. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. *IEEE Trans Magn* 2002;38:3231–3.
- [3] Weissleder R, Kelly K, Sun EY, Shtatland T, Josephson L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nat Biotechnol* 2005;23:1418–23.
- [4] Azevedo RB, Garcia MP, Chaves SB, Veloso VN, Parca RM, Lacava ZG, et al. Lung leukocyte transepithelial migration induced by DMSA-coated magnetic nanoparticles. *Mol Biol Cell* 2004;15:109A–10A.
- [5] Garcia MP, Parca RM, Chaves SB, Silva LP, Santos AD, Lacava ZGM, et al. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. *J Appl Phys* 2005;293:277–82.
- [6] Valois CRA, Nunes ES, Jaeger RG, Lima ECD, Morais PC, Azevedo RB. Expression patterns of cell adhesion molecules in mice's lung after administration of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid-coated maghemite nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2009;9:2846–55.
- [7] Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:707–34.
- [8] Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Walmrath H, Schütte H, Grimminger F, et al. Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L25–35.
- [9] Liu Y, Shaw SK, Ma S, Yang L, Luscinskas FW, Parkos CA. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. *J Immunol* 2004;172:7–13.
- [10] Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:403–11.
- [11] Maus U, Huwe J, Ermert L, Ermert M, Seeger W, Lohmeyer J. Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:95–100.
- [12] Nourshargh S, Marelli-berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol* 2005;26:157–65.
- [13] Simon SI, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* 2005;7:151–85.
- [14] Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* 2000;52:349–74.
- [15] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673–87.
- [16] Burns AR, Smith CW, Walker DC. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev* 2003;83:309–36.
- [17] Doerschuk CM, Tasaka S, Wang Q. CD11/CD18-dependent and -independent neutrophil emigration in the lungs: how do neutrophils know which route to take? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:133–6.
- [18] Ridger VC, Wagner BE, Wallace WA, Hellewell PG. Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. *J Immunol* 2001;166:3484–90.
- [19] Inoue G. Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS-induced acute lung injury. *J Infect Chemother* 2000;6:51–60.

- [20] Lo SK, Everitt J, Gu J, Malik AB. Tumor necrosis factor mediates experimental pulmonary edema by ICAM-1 and CD18-dependent mechanisms. *J Clin Invest* 1992;89:981–8.
- [21] Mulligan MS, Jones ML, Vaporciyan AA, Howard MC, Ward PA. Protective effects of IL-4 and IL-10 against immune complex-induced lung injury. *J Immunol* 1993;151:5666–74.
- [22] O'Dea KP, Young AJ, Yamamoto H, Robotham JL, Brennan FM, Takata M. Lung-marginated monocytes modulate pulmonary microvascular injury during early endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1119–27.
- [23] Fauconnier N, Pons JN, Roger J, Bee A. Thiolation of maghemite nanoparticles by dimercaptosuccinic acid. *Colloid Interface Sci* 1997;194:427–33.
- [24] Van Ewijk GA, Vroege GJ, Philipse AP. Convenient preparation methods for magnetic colloids. *Magn Magn Mater* 1999;201:31–3.
- [25] Cullity BD. Elements of X-ray diffraction. 2nd ed. Canada: Addison-Wesley; 1978.
- [26] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
- [27] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [28] Liu W, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 2002;32:52–9.
- [29] Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 2003;339:62–6.
- [30] Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 2005;26:3995–4021.
- [31] Tartaj P, Morales MP, Veitemilhas-Verdaguer S, González-Carreño T, Serna CJ. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D Appl Phys* 2003;36:R182–97.
- [32] Mu L, Feng SS. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol (R)). *J Control Release* 2002;80:129–44.
- [33] Jun YW, Huh YM, Choi JS, Lee JH, Song HT, Kim S, et al. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *J Am Chem Soc* 2005;127:5732–3.
- [34] Fahlvik AK, Klaveness J, Stark DD. Iron oxides as MR imaging contrast agents. *J Magn Reson Imaging* 1993;3:187–94.
- [35] Landsman L, Jung S. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 2007;179:3488–94.
- [36] Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Duguet E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J Mater Chem* 2004;14:2161–75.
- [37] Lorenz MR, Holzappel V, Musyanovych A, Nothelfer K, Walther P, Frank H, et al. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials* 2006;27:2820–8.
- [38] Gupta AK, Curtis AS. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:493–6.
- [39] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008;4:26–49.
- [40] Sestier C, Lacava ZGM, Lacava LM, Da Silva MF, Azevedo RB, Buske N, et al. In vitro toxicity of magnetic fluids evaluated for macrophage cell lines. *J Magn Magn Mater* 2002;252:403–5.
- [41] Caignard A, Martin MS, Hammann A, Marlin F. Heterogeneity of the rat macrophage: antigenic specificity of resident peritoneal and pleural macrophages. *Cell Mol Biol* 1995;31:41–7.
- [42] Discipio RG, Daffern PJ, Jagels MA, Broide DH, Sriramarao P. A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999;162:1127–36.
- [43] Foreman KE, Glovsky MM, Warner RL, Horvath SJ, Ward PA. Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. *Inflammation* 1996;20:1–9.
- [44] Jagels MA, Daffern PJ, Hugli TE. C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. *Immunopharmacology* 2000;46:209–22.
- [45] Diamond MS, Springer TA. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol* 1994;4:506–17.
- [46] Chan P, Aruffo A. VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin. *J Biol Chem* 1993;268:24655–64.
- [47] Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/Fibronectin binding site. *Cell* 1990;60:577–84.
- [48] Gao X, Xu N, Sekosan M, Mehta D, Ma SY, Rahman A, et al. Differential role of CD18 integrins in mediating lung neutrophil sequestration and increased microvascular permeability induced by *Escherichia coli* in mice. *J Immunol* 2001;167:2895–901.

4 DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Embora as NPMs-DMSA tenham demonstrado estimular a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão (CHAVES et al., 2002; AZEVEDO et al., 2004; GARCIA et al., 2005; VALOIS et al. 2009), o curso temporal desse processo ainda não foi determinado. No presente estudo nós encontramos que as NPMs-DMSA ocasionaram um aumento progressivo no número de leucócitos no lavado bronco-alveolar dentro das primeiras 12 h. Em seguida, o número de leucócitos no lavado bronco-alveolar diminui significativamente até alcançar valores basais no período de 72 h após o tratamento. Esse perfil temporal de migração leucocitária indica que a administração das NPMs-DMSA constitui um estímulo inflamatório temporário que diminui com o tempo. Embora a natureza deste processo não tenha ficado clara, o mesmo pode ser decorrente da redistribuição das NPMs-DMSA do pulmão para outros órgãos, tais como o baço e o fígado, conforme descrito previamente (FAHLVIK et al., 1993; GARCIA et al., 2005).

No que se refere as subpopulações de leucócitos que participam do processo de migração transendotelial induzida pelas NPMs-DMSA, análise citológica do lavado bronco-alveolar revelou que, embora tenha sido observado um aumento relativo na porcentagem de linfócitos, os macrófagos - células derivadas dos monócitos localizados na circulação sanguínea (LANDSMAN; JUNG, 2007) - constituem a principal subpopulação de leucócitos recrutada para as vias aéreas respiratórias após a administração das NPMs-DMSA. Tem sido relatado que o número aumentado de monócitos/macrófagos no pulmão pode causar lesão tecidual devido a liberação excessiva de citocinas inflamatórias, enzimas proteolíticas e radicais livres de oxigênio (LASKIN; PENDINO, 1995; ROSSEAU et al., 2000).

Sendo assim, ainda que temporário, o aumento da migração transendotelial dos monócitos/macrófagos no pulmão pode contribuir para a toxicidade das NPMs-DMSA durante aplicações biomédicas no órgão em questão.

A adsorção de proteínas plasmáticas à superfície das NPMs (opsonização) permite que as mesmas sejam reconhecidas pelos monócitos/macrófagos, os quais, por sua vez, atuam na remoção das NPMs da circulação sanguínea (MORNET et al., 2004; GUPTA; GUPTA, 2005). Tal fato nos conduziu a hipótese de que o aumento da migração transendotelial dos monócitos/macrófagos pode estar relacionado ao processo de remoção das NPMs-DMSA da vascularização pulmonar. De fato, análise ultraestrutural de macrófagos obtidos do lavado bronco-alveolar revelou inúmeras células contendo NPMs no seu citoplasma. Adicionalmente, o fato das NPMs estarem localizadas em compartimentos intracitoplasmáticos semelhantes a lisossomos, indica que a captura desse material nanoestruturado ocorre por meio de endocitose (LORENZ et al., 2006). É interessante notar ainda que os macrófagos contendo NPMs intracitoplasmáticas não mostraram sinais de danos celulares, tais como rompimento de membrana plasmática ou organelas (GUPTA; CURTIS, 2004; LEWINSKI et al., 2008); e apresentaram ultraestrutura similar às células dos animais controle. Conjuntamente esses resultados sugerem que as NPMs-DMSA não são tóxicas aos monócitos/macrófagos após internalização. Tal fato foi confirmado pelos dados obtidos por meio do ensaio de MTT, onde NPMs-DMSA na concentração tão alta quanto 1×10^{15} nanopartículas/mL não ocasionaram efeito tóxico na viabilidade de macrófagos obtidos do lavado bronco-alveolar. Por outro lado, esses achados contrariam aqueles reportados por Sestier e colaboradores (2002); e pode ser explicado pelo fato desses autores terem utilizado linhagens celulares que diferem funcionalmente e fenotipicamente dos macrófagos encontrados nas vias aéreas

respiratórias (CAIGNARD et al., 1985), podendo ser mais suscetíveis às NPMs-DMSA.

O mecanismo pelo qual as NPMs-DMSA induzem a migração transendotelial dos monócitos no pulmão não foi avaliado no presente estudo. No entanto, algumas hipóteses podem ser propostas. Conforme demonstrado por GARCIA e colaboradores (2005), as NPMs-DMSA são capazes de atravessar a barreira endotelial e alcançar os compartimentos extravasculares do pulmão. O influxo de NPMs-DMSA para o pulmão ocasionaria, então, a liberação de citocinas inflamatórias que atrairiam os monócitos do sangue para o parênquima pulmonar e vias aéreas respiratórias. Esta perspectiva está em concordância com a noção de que um gradiente quimiotático é necessário para o rápido recrutamento de monócitos para os compartimentos extravasculares do pulmão (ROSSEAU et al., 2000). Uma outra possibilidade é que a migração transendotelial dos monócitos seria induzida por fatores inflamatórios derivados do soro, como, por exemplo, os componentes do sistema complemento (CSC, FOREMAN et al., 1996; DISCIPIO et al., 1999; JAGELS et al., 2000; MORNET et al., 2004), unidos à superfície das NPMs-DMSA. Neste último caso, o complexo NPMs-DMSA-CSC poderia induzir a ativação e/ou síntese de moléculas de adesão celular nos monócitos, tornando os mesmos aptos à emigração. Esta perspectiva não exclui a possibilidade de que o gradiente quimiotático ocorra simultaneamente, desde que a incorporação do complexo NPMs-DMSA-CSC também pode estimular a liberação de citocinas inflamatórias pelos monócitos translocados. Futuros experimentos são necessários para clarificar esta questão.

A migração transepitelial de leucócitos no pulmão pode ser mediada por diferentes classes de moléculas de adesão celular, incluindo E-, L- e P- selectina, as

integrinas- β 2 LFA-1 e Mac-1, a integrina- β 1 VLA-4 e a imunoglobulina VCAM-1 (MAUS et al., 2002; LIU et al., 2004; MARTIN et al., 2005; NOURSHARGH et al., 2005). No presente estudo, nós utilizamos o PCR em tempo real para investigar o efeito das NPMs-DMSA sobre a expressão do mRNA dessas moléculas de adesão celular no pulmão de camundongos. Os resultados mostraram que as NPMs-DMSA aumentaram a expressão de transcritos da E-, L- e P-selectina e da integrina Mac-1. Esses resultados são fortes indicativos de que tais moléculas de adesão estão envolvidas no processo de migração transendotelial dos leucócitos induzida pelas NPMs-DMSA no pulmão.

A expressão de moléculas de adesão celular no pulmão é frequentemente associada com o aumento nos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α (LO et al., 1992; O'DEA et al., 2005). No presente estudo, nós encontramos que essa citocina apresentava níveis elevados no período de 4 h quando comparado ao de 12 h. O predomínio da atividade pró-inflamatória no período de 4 h após a administração das NPMs-DMSA também ficou evidente pelo aumento da razão dos níveis de TNF- α versus IL-10. Em conjunto, esses resultados são compatíveis com a nossa prévia observação de que as NPMs-DMSA aumentam a expressão de transcritos das moléculas de adesão celular dentro das primeiras 4 h após o tratamento. Além disso, o nível aumentado da citocina anti-inflamatória IL-10 no período de 12 h após a administração das NPMs-DMSA pode ter contribuído para a diminuição da expressão das moléculas de adesão celular observada nesse mesmo período de análise. Esta afirmativa está de acordo com outros estudos (MULLIGAN et al., 1993; INOUE, 2000) que mostraram que a IL-10 é capaz de limitar a indução de moléculas de adesão celular no pulmão.

As integrinas são moléculas de adesão expressas constitutivamente na superfície celular, bem como armazenadas dentro de vesículas intracitoplasmáticas (DIAMOND; SPRINGER, 1994; HYNES 2002). A síntese de novo das integrinas requer a transcrição de mRNA. No presente estudo, não foram observadas mudanças nos níveis de transcritos das integrinas VLA-4 e LFA-1, o que sugere que as NPMs-DMSA não induzem a síntese de tais moléculas de adesão celular no pulmão. Por outro lado, tem sido relatado que a migração transendotelial de leucócitos não depende apenas do número de integrinas localizadas na superfície celular, mas também do estado conformacional, ou seja, do grau de ativação das mesmas (DIAMOND; SPRINGER, 1994). Assim, os resultados obtidos no presente estudo não excluem a possibilidade das NPMs-DMSA induzirem a translocação das integrinas LFA-1 e VLA-4 armazenadas em vesículas intracitoplasmáticas para a membrana plasmática e/ou ativação dessas integrinas constitutivamente expressas na superfície dos leucócitos. Neste caso, ambas as integrinas LFA-1 e VLA-4 poderiam desempenhar um papel funcional no processo de migração transendotelial induzida pelas NPMs-DMSA. Suportando esta perspectiva, nós mostramos em um estudo recente (VALOIS et al., 2009) que as NPMs-DMSA são capazes de modular o padrão de expressão da integrina LFA-1 em leucócitos localizados nos compartimentos vasculares do pulmão. Por outro lado, a ausência de mudanças significativas nos níveis de expressão do mRNA da imunoglobulina VCAM-1 - principal ligante da integrina VLA-4 (ELICES et al., 1990; CHAN; ARUFFO, 1993) - pode ser considerado como um indicador indireto de que essa integrina não está envolvida no processo de migração transendotelial induzido pelas NPMs-DMSA. No entanto, essa noção não considera o fato de que a integrina VLA-4 pode mediar a emigração dos leucócitos por meio da interação com outros ligantes que não foram

avaliados no presente estudo, tais como a fibronectina (ELICES et al., 1990; CHAN; ARUFFO, 1993). Esta possibilidade deve ser alvo de futuras investigações.

Um achado importante do presente estudo foi o fato das NPMs-DMSA aumentarem a expressão de transcritos da integrina Mac-1. Este fato levanta a possibilidade de que a migração transendotelial dos leucócitos induzida pelas NPMs-DMSA no pulmão seja mediada por uma via dependente da integrina- β 2. Esta hipótese foi confirmada ao avaliarmos o efeito da administração das NPMs-DMSA sobre o número de leucócitos no lavado bronco-alveolar de animais nocaute para integrina- β 2. Desde que tem sido demonstrado que o bloqueio de integrinas com anticorpos e/ou receptores antagonistas interfere na habilidade de migração dos leucócitos *in vivo* (GAO et al., 2001), o resultados do presente estudo indentifica intervenções alvejando a integrina- β 2 como uma promissora estratégia terapêutica para prevenir ou atenuar os efeitos adversos das NPMs-DMSA durante aplicações biomédicas no pulmão.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A migração transendotelial de leucócitos no pulmão após a administração endovenosa de NPMs-DMSA é de caráter transitório;
- Monócitos/macrófagos são a principal sub-população de leucócitos envolvida no processo de migração transendotelial induzida pelas NPMs-DMSA. A atividade migratória de tais células parece está relacionada com o processo de limpeza das NPMs-DMSA do pulmão;
- NPMs-DMSA não induz efeito tóxico aos macrófagos do lavado bronco-alveolar;
- Administração endovenosa de NPMs-DMSA aumenta os níveis de expressão de transcritos das moléculas de adesão E-, L- e P-selectina e Mac-1 no pulmão, bem como da citocina pró-inflamatória TNF- α ;
- A migração transendotelial de leucócitos no pulmão após a administração de NPMs-DMSA é ausente em animais nocaute para integrina- β 2, mostrando que esta é a principal via da migração leucocitária induzida por aquelas nanopartículas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Critical Care Medicine**, United States, v. 31, n. 4, p. S195-S199, 2003.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. 1463p.

AZEVEDO, R. B.; GARCIA, M. P.; CHAVES, S. B.; VELOSO, V. N.; PARCA, R. M.; LACAVAL, Z. G.; MORAIS, P. C. Lung leukocyte transepithelial migration induced by DMSA-coated magnetic nanoparticles. **Molecular Biology of the Cell**, United States, v. 15, Suppl., p.109A-110A, 2004.

AZUMA, A.; TAKAHASHI, S.; NOSE, M.; ARAKI, K.; ARAKI, M.; TAKAHASHI, T.; HIROSE, M.; KAWASHIMA, H.; MIYASAKA, M.; KUDOH, S. Role of E-selectin in bleomycin induced lung fibrosis in mice. **Thorax**, England, v. 55, n. 2, p. 147-152, 2000.

BARKHAUSEN, T.; KRETTEK, C.; VAN GRIENSVEN, M. L-selectin: adhesion, signalling and its importance in pathologic posttraumatic endotoxemia and non-septic inflammation. **Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, Germany, v. 57, n. 1, p. 39-52, 2005.

BLOEMEN, P. G.; HENRICKS, P. A.; NIJKAMP, F. P. Cell adhesion molecules and asthma. Clinical and experimental allergy. **Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, England, v. 27, n. 2, p. 128-141, 1997.

BURNS, A. R.; SMITH, C. W.; WALKER, D. C. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. **Physiological Reviews**, United States, v. 83, n. 2, p. 309-336, 2003.

CAIGNARD, A.; MARTIN, M. S.; HAMMANN, A.; MARLIN, F. Heterogeneity of the rat macrophage: antigenic specificity of resident peritoneal and pleural macrophages. **Cellular and Molecular Biology**, England, v. 31, n.1, p. 41-47, 1985.

CHAN, P.; ARUFFO, A. VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell Ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 268, n. 33, p. 24655-24664, 1993.

CHAVES, S. B.; SILVA, L. P.; LACAVAL, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B. Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lungs induced by 2, 3 meso-dimercaptosuccinic-coated magnetic nanoparticles. **Journal of Applied Physics**, United States, v. 97, n. 10, p. 915/1-915/3, 2005.

CLEMENT, J. H.; SCHWALBE, M.; BUSKE, N.; WAGNER, K.; SCHNABELRAUCH, M.; GÖRNERT, P.; Kliche, K. O.; PACHMANN, K.; WEITSCHIES, W.; HÖFFKEN, K. Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Germany, v. 132, n. 5, p. 287-292, 2006.

CUNNINGHAM, C. H.; ARAI, T.; YANG, P. C.; MCCONNELL, M. V.; PAULY, J. M.; CONOLLY, S. M. Positive contrast magnetic resonance imaging of cells labeled with magnetic nanoparticles. **Magnetic Resonance in Medicine**, United States, v. 53, n. 5, p. 999-1005, 2005.

DIAMOND, M. S.; SPRINGER, T. A. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. **Current Biology**, England, v. 4, n. 6, p. 506-17, 1994.

DISCIPIO, R. G.; DAFFERN, P. J.; JAGELS, M. A.; BROIDE, D. H.; SRIRAMARAO, P. A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. **Journal of Immunology**, United States, v. 162, n. 2, p. 1127-1136, 1999.

- DOERSCHUK, C. M. Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. **Respiratory Research**, England, v. 1, n. 3, p. 136-140, 2000.
- ELICES, M. J.; OSBORN, L.; TAKADA, Y.; CROUSE, C.; LUHOWSKYJ, S.; HEMLER, M. E.; LOBB, R. R. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/Fibronectin binding site. **Cell**, United States, v. 60, n. 4, p. 577-584, 1990.
- FAHLVIK, A. K.; KLAVENESS, J.; STARK, D. D. Iron oxides as MR imaging contrast agents. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, United States, v. 3, n. 1, p. 187-194, 1993.
- FOREMAN, K. E.; GLOVSKY, M. M.; WARNER, R. L.; HORVATH, S. J.; WARD, P. A. Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. **Inflammation**, United States, v. 20, n. 1, p. 1-9, 1996.
- GALANZHA, E. I.; SHASHKOV, E. V.; KELLY, T.; KIM, J. W.; YANG, L.; ZHAROV, V. P. In vivo magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells. **Nature Nanotechnology**, England, v. 4, n. 12, p. 855-860, 2009.
- GAO, X.; XU, N.; SEKOSAN, M.; MEHTA, D.; MA, S. Y.; RAHMAN, A.; MALIK, A. B. Differential role of CD18 integrins in mediating lung neutrophil sequestration and increased microvascular permeability induced by Escherichia coli in mice. **Journal of Immunology**, United States, p. 167, n. 5, p. 2895-2901, 2001.
- GARCIA, M. P.; PARCA, R. M.; CHAVES, S. B.; SILVA, L. P.; SANTOS, A. D.; LACAVALA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. **Journal of Applied Physics**, United States, v. 293, n. 1, p. 277-282, 2005.
- GOETZE, T.; GANSAU, C.; BUSKE, N.; ROEDER, M.; GÖRNERT, P.; BAHR, M. Biocompatible magnetic core/shell nanoparticles. **The Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, United States, v. 252, n. 1, p. 399-402, 2002.
- GUO, R.; WARD, P. A. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. **Free Radical Biology & Medicine**, United States, v. 33, n. 3, p. 303-310, 2002.
- GUPTA, A. K.; CURTIS, A. S. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, United States, v. 15, n. 4, p. 493-496, 2004.
- GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, England, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.
- HAMID, Q.; TULIC, M. K.; LIU, M. C.; MOQBEL, R. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, United States, v. 111, n. 1, p. S5-S12, 2003.
- HAWKINS H.K.; HEFFELFINGER S.C.; ANDERSON D.C. Leukocyte adhesion deficiency: clinical and postmortem observations. **Pediatric Pathology / Affiliated with the International Paediatric Pathology Association**, United States, v. 12, n. 1, p. 119-130, 1992.
- HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, United States, v. 110, n. 6, p. 673-687, 2002.
- INOUE, G. Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS-induced acute lung injury. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Japan, v. 6, n. 1, p. 51-60, 2000.
- ITO, A.; KUGA, Y.; HONDA, H.; KIKKAWA, H.; HORIUCHI, A.; WATANABE, Y.; KOBAYASHI, T. Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. **Cancer Letters**, Ireland, v. 212, n. 2, p. 167-175, 2004.

- JAGELS, M. A.; DAFFERN, P. J.; HUGLI, T. E. C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. **Immunopharmacology**, Netherlands, v. 46, n. 3, p. 209-222, 2000.
- LANDSMAN, L.; JUNG, S. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. **Journal of Immunology**, United States, v. 179, n. 6, p. 3488-3494, 2007.
- LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, United States, n. 35, v. 19, p. 655-677, 1995.
- LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, Germany, v. 4, n. 1, p. 26-49, 2008.
- LIU, Y.; SHAW, S. K.; MA, S.; YANG, L.; LUSCINSKAS, F. W.; PARKOS, C. A. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. **Journal of Immunology**, United States, v. 172, n. 1, p. 7-13, 2004.
- LO, S. K.; EVERITT, J.; GU, J.; MALIK, A. B. Tumor necrosis factor mediates experimental pulmonary edema by ICAM-1 and CD18-dependent mechanisms. **The Journal of Clinical Investigation**, United States, v. 89, n. 3, p. 981-988, 1992.
- LORENZ, M. R.; HOLZAPFEL, V.; MUSYANOVYCH, A.; NOTHELFER, K.; WALTHER, P.; FRANK, H.; LANDFESTER, K.; SCHREZENMEIER, H.; MAILÄNDER, V. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. **Biomaterials**, England, n. 27, v. 14, p. 2820-2828, 2006.
- LUSCINSKAS, F. W.; LAWLER, J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. **The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, United States, v. 8, n. 12, p. 929-938, 1994.
- LUSCINSKAS, F. W.; MA, S.; NUSRAT, A.; PARKOS, C. A.; SHAW, S. K. Leukocyte transendothelial migration: A junctional affair. **Seminars in Immunology**, England, v. 14, n. 2, p. 105-113, 2002.
- MAINARDES, R. M.; SILVA, L. P. Drug delivery systems: past, present, and future. **Current Drug Targets**, Netherlands, v. 5, n. 5, p. 449-455, 2004.
- MAUS, U.; HUWE, J.; ERMERT, L.; ERMERT, M.; SEEGER, W.; LOHMEYER, J. Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, United States, v. 165, n. 1, p. 95-100, 2002.
- MARTIN, T. R.; FREVERT, C. W. Innate immunity in the lungs. **Proceedings of the American Thoracic Society**, United States, v. 2, n. 5, p. 403-411, 2005.
- MCBAIN, S. C.; YIU, H. H. P.; DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, New Zealand, v. 3, n. 2, p. 169-180, 2008.
- MORAIS, P. C.; SANTOS, R. L.; PIMENTA, A. C. M.; AZEVEDO, R. B.; LIMA, E. C. D. Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles. **Thin Solid Films**, United States, v. 515, n. 1, p. 266-270, 2006.
- MORNET, S.; VASSEUR, S.; GRASSET, F.; DUGUET, E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. **Journal of Materials Chemistry**, England, v. 14, n. 14, p. 2161-2175, 2004.
- MULLIGAN, M. S.; JONES, M. L.; VAPORCIYAN, A. A.; HOWARD, M. C.; WARD, P. A. Protective effects of IL-4 and IL-10 against immune complex-induced lung injury. **Journal of Immunology**, United States, v. 151, n. 10, p. 5666-5674, 1993.
- NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends in Immunology**, England, v. 26, n. 3, p. 157-165, 2005.

- O'BYRNE, P. M.; POSTMA, D. S. The Many faces of airway inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, United States, v. 159, n. 5, p. S41-S63, 1999.
- O'DEA, K. P.; YOUNG, A. J.; YAMAMOTO, H.; ROBOTHAM, J. L.; BRENNAN, F. M.; TAKATA, M. Lungmarginated monocytes modulate pulmonary microvascular injury during early endotoxemia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, United States, v. 172, n. 9, p. 1119-1127, 2005.
- ODENBACH, S. Recent progress in magnetic fluid research. **Journal of Physics: Condensed Matter**, England, v. 16, n. 32, p. R1135-R1150, 2004.
- PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of physics D: Applied Physics**, England, v. 36, n. 13, p. R167-R181, 2003.
- PETTIBONE, J. M.; ADAMCAKOVA-DODD, A.; THORNE, P. S.; O'SHAUGHNESSY, P. T.; WEYDERT, J. A.; GRASSIAN, V. H. Inflammatory response of mice following inhalation exposure to iron and copper Nanoparticles. **Nanotoxicology**, England, v. 2, n. 4, p. 189-204, 2008.
- ROSSEAU, S.; SELHORST, J.; WIECHMANN, K.; LEISSNER, K.; MAUS, U.; MAYER, K.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W.; LOHMEYER, J. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. **Journal of Immunology**, United States, v. 164, n. 1, p. 427-435, 2000.
- SESTIER, C.; LACAVA, Z. G. M.; LACAVA, L. M.; DA SILVA, M. F.; AZEVEDO, R. B.; BUSKE, N.; GANSAUA, C.; MORAIS, P. C.; SILVA, O.; PELEGRINIA, F.; SABOLOVICA, D. In vitro toxicity of magnetic fluids evaluated for macrophage cell lines. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, Netherlands, v. 252, p. 403-405, 2002.
- SETHI, J. M.; WAXMAN, A. B. Mediators of acute lung injury: a review. **Clinical Pulmonary Medicine**, United States, n. 8, v. 4, p. 214-225, 2001.
- SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, United States, v. 7, n. 8, p. 151-185, 2005.
- SUN, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D. B.; RAOUX, S.; RICE, P. M.; WANG, S. X.; LI, G. Monodisperse MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn$) nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, United States, v. 126, n. 1, p. 273-279, 2004.
- TASAKA, S.; RICHER, S. E.; MIZGERD, J. P.; DOERSCHUK, C. M. Very late antigen-4 in CD18-independent neutrophil emigration during acute bacterial pneumonia in mice. **American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine**, United States, v. 166, n. 1, p. 53-60, 2002.
- VALOIS, C. R. A.; NUNES, E. S.; JAEGER, R. G.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B. Expression Patterns of cell adhesion molecules in mice's lung after administration of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid-coated maghemite nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, United States, v. 9, n. 5, p. 2846-2855, 2009.
- WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, United States, v. 52, n. 3, p. 349-374, 2000.
- YUSUF-MAKAGIANSAR, H.; ANDERSON, M. E.; YAKOVLEVA, T. V.; MURRAY, J. S.; SIAHAAN, T. J. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. **Medicinal Research Reviews**, United States, v. 22, n. 2, p. 146-167, 2002.
- ZEN, K.; PARKOS, C. A. Leukocyte-epithelial interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, United States, v. 15, n. 5, p. 557-564, 2003.