

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

**Efeitos das nanopartículas magnéticas a base de  
maguemita recobertas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico  
em macrófagos de camundongos.**

**Juliana Machado Braz**

**2011**

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

**Juliana Machado Braz**

**Efeitos das nanopartículas magnéticas a base de  
maguemita recobertas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico  
em macrófagos de camundongos.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para  
obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal  
pelo programa de Pós-Graduação em Biologia  
Animal da Universidade de Brasília.

**Orientador:** Ricardo Bentes de Azevedo

**Brasília**

**2011**

***Dedico esta dissertação:***

***Aos meus amados pais, Elmiro e Rhea, os grandes responsáveis pelas minhas vitórias, pois sempre se dedicaram, me apoiaram e me amaram incondicionalmente.***

***Aos meus queridos irmãos, Mila e Rafa, grandes companheiros e amigos eternos, com quem sempre compartilho as mais diversas emoções, angústias e alegrias.***

***Ao meu namorado, meu grande amigo, minha paixão, Lucas, quem eu escolhi para estar ao meu lado nesses oito anos e que sempre correspondeu às minhas expectativas, me apoiou, me suportou nos momentos em que nem eu mesma me suportava e que sempre fez de tudo para me ver feliz.***

***Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida!!!***

***Amo muito todos vocês!!!***

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar todos meus caminhos e por colocar pessoas tão especiais em minha vida.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Bentes de Azevedo que me concedeu a incrível oportunidade de trabalhar em seu laboratório e que sempre confiou em minha capacidade, me ensinou a ser independente e persistente. Muito obrigada por acreditar nas minhas idéias e no meu potencial.

À professora Dra. Emília Lima por ceder o fluido magnético utilizado nesta dissertação.

À professora Dra. Mônica Pereira Garcia, por encontrar um ótimo aluno de iniciação científica para acompanhar o meu mestrado e por contribuir no enriquecimento dos projetos propostos por nós.

Ao professor Dr. Wilson Peternele, que nos momentos finais me auxiliou na análise dos resultados, demonstrando sempre muita disposição e dedicação.

Ao professor Dr. Luciano Paulino por ser um grande exemplo de dedicação e de amor à ciência. Obrigada por ser tão atencioso e pelos inúmeros ensinamentos.

À Jaqueline Rodrigues pelas discussões enriquecedoras e por sempre estar disposta a ajudar e a compartilhar seus conhecimentos.

À Dona Zélia, por tornar tudo tão simples para nós no laboratório. Sua ajuda é essencial. Seu trabalho é muito importante para todos nós e seus e-mails nos alegam com duradouras risadas.

À Carol Valois, grande mestre e amiga, com quem aprendi absolutamente tudo o que eu precisava para seguir em frente. Obrigada pelos valiosos

ensinamentos, eles serão importantes durante toda a minha vida, em diferentes situações, pois aprendi com você muito mais do que o conhecimento científico.

Ao doutorando Luis Alexandre Muehlmann, pela paciência em solucionar minhas dúvidas de química, estatística, dentre muitas outras. E também por me fazer rir tantas vezes com suas incansáveis brincadeiras.

Ao meu namorado, Lucas, simplesmente por existir em minha vida.

À minha família, pais, irmãos, tios e primos, que compreenderam minha ausência e sempre torceram muito por mim.

Ao meu mais novo cunhadinho, Fernando, que em tão pouco tempo já trouxe muita alegria para minha casa.

À minha querida amiga Liana Blume que esteve comigo durante toda minha graduação e com quem, durante o mestrado, pude compartilhar angústias, inseguranças, desesperos e também felicidades.

Às minhas grandes amigas Lalá, Maitezinha e Pat, que tornaram minha vida mais feliz, mesmo quando tudo parecia desabar. Meninas, muito obrigada pelos encontros, pelas conversas, pelos conselhos, pelas fofocas, pelas viagens, pelos jantares, enfim, por trazerem tanta luz para a minha vida.

Ao aluno de iniciação científica Taynan Santos que me ajudou durante todo o mestrado, mesmo nos meus horários malucos de experimentos. Continue se esforçando, pois você tem um enorme potencial.

À Grazi e à Renatinha, companheiras de intermináveis horas dentro do laboratório, mas sempre com longas e animadas conversas. Obrigada também pela valiosa ajuda com o citômetro de fluxo e com o microscópio confocal.

À aluna Michelly Christine, do laboratório de química da Universidade de Goiás, que me auxiliou na obtenção dos diâmetros hidrodinâmicos das amostras com fluido magnético.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Victoria Monge Fuentes, Shéllida Braz, Camila Saldanha, João Paulo Longo, Luciana Oliveira, Natália Velloso, Luiza Fascineli, Ludmilla Souza, Khéllida Loiane, Diego Iocca, Mariana Campos, Raphael Peixoto, Vanessa Moreira, Cláudio Cavalcanti, Beatriz Ma, Leandro Bicalho, Vera Sovieiro e Marcela Carneiro. Obrigada pela ajuda, pelo carinho, pelos conselhos, pelas conversas e pelos agradáveis momentos que passei no laboratório.

À Vanessa Dias de Farias, fantástica cantora, atriz, professora de artes, coordenadora do centro de Ensino Médio 01 de Sobradinho. Obrigada por me ajudar a tornar mais fácil conciliar minhas atividades. Sempre que precisei você estava lá com um sorriso no rosto para me amparar.

Aos meus alunos do Centro de Ensino Médio 01 de Sobradinho e do Centro de Ensino Fundamental Carlos Ramos Mota, pois durante esses dois anos foram vocês que me ensinaram a perder a timidez, ter segurança para falar em público e a expressar minhas opiniões. Também foram vocês, mesmo sem saber, que me ajudaram a aliviar a cabeça e esquecer um pouco das dificuldades pelas quais passava durante o mestrado.

Ao INCT em Nanobiotecnologia, MCT-CNPq, pelo apoio financeiro.

E a todos que, de alguma forma, me auxiliaram na realização desta dissertação.

***"Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer  
outras maiores perguntas."***

***Guimarães Rosa (Grande Sertão Veredas)***

## RESUMO

Nanopartículas de maguemita recobertas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico (FM-DMSA) apresentam distribuição preferencial para o pulmão sendo internalizadas por macrófagos; processo que pode ocorrer pela opsonização por proteínas plasmáticas. A fim de determinar a estabilidade das nanopartículas, em diferentes meios de dispersão, o diâmetro hidrodinâmico foi obtido por espalhamento dinâmico de luz, em diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) e soro de camundongo (SC). Essas concentrações foram utilizadas para ensaios de sedimentação em espectrofotômetro, por 180 minutos. Nos ensaios de internalização, macrófagos alveolares e peritoneais foram tratados com 0,03 ou 0,06 mgFe/mL FM-DMSA na presença de 4,5% de SC ou 1,5% e 2,5% de BSA em meio de cultura, por 2h à temperatura ambiente (TA). Foi utilizado como controle positivo poli-L-lisina em meio de cultura e apenas meio de cultura como controle negativo. Na determinação intracelular de ferro utilizou-se o kit de Ferrozine da Labtest, com modificações. A produção das citocinas IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  foi analisada por ELISA. A avaliação da citotoxicidade foi verificada pelo ensaio com MTT, após 2h30 a TA ou 2h30 e 12h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico. Observou-se diâmetros hidrodinâmicos equivalentes e ausência de sedimentação para as concentrações de 4,5% para o SC nas duas concentrações de ferro testadas e de 1,5% e 2,5% para o BSA nas concentrações de 0,03 mgFe/mL e 0,06 mgFe/mL, respectivamente. A internalização de ferro foi significativamente menor para os grupos com FM-DMSA e SC em relação aos grupos incubados com FM-DMSA e BSA e em relação ao controle positivo, não havendo diferença em relação ao controle negativo. A baixa internalização observada para o FM-DMSA na presença de SC demonstra que a opsonização pode não ser a principal via de internalização. Mesmo com aumento da internalização para alguns grupos experimentais, não houve citotoxicidade do FM-DMSA. A dosagem das citocinas demonstrou que os macrófagos alveolares e peritoneais incubados com o FM-DMSA produzem IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em níveis basais, indicando a baixa atividade pró-inflamatória. Por outro lado, houve maior produção de TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-6 pelos macrófagos peritoneais que indica a ocorrência de uma resposta antiinflamatória para os macrófagos peritoneais.

## ABSTRACT

Maghemite nanoparticles coated with 2,3-dimercaptosuccinic acid (MNP-DMSA) showed preferential distribution to lungs, where they are uptaken by resident macrophages. Internalization can occur due to opsonization by serum proteins. This study evaluated the effects of MNP-DMSA on the viability, phagocyte activity, and cytokine production by murine macrophages. The hydrodynamic diameter of nanoparticles was obtained by dynamic light scattering in RPMI-1640 with bovine serum albumin (BSA) or mouse serum (MS) to determine the concentration of BSA and MS that have equivalent nanoparticle diameters. These concentrations were used for sedimentation assays in spectrophotometer for 180 minutes. For internalization analysis, peritoneal and pulmonary macrophages obtained from mice were treated with MNP-DMSA at concentrations of 0.03 and 0.06 mgFe/mL with 4.5% of MS or 1.5 % and 2.5% BSA in RPMI-1640 for 2 hours at room temperature (RT). Treatment with poly-L-lysine was used as positive control and medium without MNP-DMSA as negative control. For determination of intracellular iron, ferrozine kits from Labtest were used, with modifications. Production of IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  were analyzed by ELISA. Cytotoxicity with MTT assays was analyzed for 2h30 at RT or 2h30 and 12h at 37 °C and atmosphere with CO<sub>2</sub> at 5%. MS and BSA concentrations showed equivalent nanoparticle hydrodynamic diameter and no sedimentation for MS at 4.5%, in both iron concentrations used, and for BSA at 1.5% (for 0.03 mgFe/mL) and 2.5% (for 0.06 mgFe/mL). The internalization of iron was significantly lower for groups with MNP-DMSA incubated with MS than for those incubated with BSA and positive controls. There was no significant difference between the negative control group and the macrophages incubated with MNP-DMSA in MS. The low internalization of MNP-DMSA in the presence of MS demonstrates that opsonization of serum proteins may not be the main route of internalization. Cytokine levels showed that the pulmonary and peritoneal macrophages incubated with MNP-DMSA produced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  at baseline levels, indicating a low pro-inflammatory activity. On the other hand, there was an increase in TGF- $\beta$ , IL-10 and IL-6 by peritoneal macrophages, indicating that peritoneal macrophages have an anti-inflammatory activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas.....	<b>20</b>
<b>Figura 2.</b> Fórmula estrutural do FM-DMSA.....	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b> Reação de Fenton.....	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do FM-DMSA.....	<b>40</b>
<b>Figura 5.</b> Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas do FM-DMSA dispersas em RPMI-1640 com soro de camundongo.....	<b>60</b>
<b>Figura 6.</b> Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas do FM-DMSA dispersas em RPMI-1640 com albumina sérica bovina.....	<b>62</b>
<b>Figura 7.</b> Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de maguemitas do FM-DMSA semelhantes para a solução original e concentrações de soro de camundongo e albumina sérica bovina.....	<b>63</b>
<b>Figura 8.</b> Sedimentação das nanopartículas do FM-DMSA em RPMI-1640 na concentração de 0,03 mgFe/mL.....	<b>65</b>
<b>Figura 9.</b> Sedimentação das nanopartículas do FM-DMSA em RPMI-1640 na concentração de 0,06 mgFe/mL.....	<b>66</b>
<b>Figura 10.</b> Viabilidade de macrófagos peritoneais incubados com RPMI-1620 e soro de camundongo.....	<b>67</b>
<b>Figura 11.</b> Viabilidade de macrófagos peritoneais incubados com RPMI-1640 e albumina sérica bovina.....	<b>68</b>
<b>Figura 12.</b> Internalização de FM-DMSA por macrófagos peritoneais e alveolares.....	<b>69</b>
<b>Figura 13.</b> Internalização de FM-DMSA (0,03 e 0,06 mgFe/mL) por macrófagos peritoneais e alveolares incubados com poli-L-lisina.....	<b>70</b>
<b>Figura 14.</b> Internalização de FM-DMSA (0,03 mgFe/mL), previamente incubado com soro de camundongo, por macrófagos peritoneais e alveolares.....	<b>71</b>
<b>Figura 15.</b> Internalização de FM-DMSA (0,06 mgFe/mL), previamente incubado com soro de camundongo, por macrófagos peritoneais e alveolares.....	<b>72</b>

<b>Figura 16.</b> Produção de TGF- $\beta$ por macrófagos peritoneais e alveolares.....	<b>73</b>
<b>Figura 17.</b> Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais e alveolares.....	<b>74</b>
<b>Figura 18.</b> Produção de IL-1 $\beta$ por macrófagos peritoneais e alveolares.....	<b>75</b>
<b>Figura 19.</b> Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais e alveolares.....	<b>76</b>
<b>Figura 20.</b> Produção de IL-6 por macrófagos peritoneais e alveolares.....	<b>77</b>

## **TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Principais citocinas produzidas por macrófagos e suas ações.....	<b>29</b>
<b>Tabela 2.</b> Lista de reagentes.....	<b>41</b>
<b>Tabela 3.</b> Grupos experimentais.....	<b>50</b>
<b>Tabela 4.</b> Concentrações dos padrões utilizados nas dosagens de ferro.....	<b>54</b>
<b>Tabela 5.</b> Concentrações finais dos padrões utilizados nas dosagens de ferro....	<b>56</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i> /albumina Sérica Bovina
<b>C3</b>	Proteína/componente 3 do Sistema Complemento
<b>CR</b>	<i>Complement Receptor</i> / Receptor do complemento
<b>DMSA</b>	Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico
<b>DNA</b>	<i>Desoxiribinucleic acid</i> / Ácido desoxiribonucléico
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> / Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> / teste imunoenzimático
<b>FM</b>	Fluido Magnético
<b>FM-DMSA</b>	Fluido magnético contendo nanopartículas recobertas com DMSA
<b>HSA</b>	<i>Human Seric Albumin</i> / Albumina Sérica Humana
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon gamma</i> / Interferon gama
<b>IRM</b>	Imagem de ressonância magnética
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LFA-1</b>	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<b>Mac-1</b>	<i>Macrophage antigen-1</i> / Antígeno macrofágico-1
<b>MCP1</b>	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
<b>MCP5</b>	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
<b>MIP-2</b>	<i>Macrophage inflammatory protein 2</i>
<b>MSA</b>	<i>Murine Seric Albumin</i> / Albumina Sérica Murina
<b>MTT</b>	<i>3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> / Tampão salina fosfato
<b>PAF</b>	<i>Platelet-activating factor</i> / Fator ativador de plaquetas
<b>PEG</b>	<i>Polyethylene glycol</i> / Polietileno glicol
<b>PLL</b>	<i>Poly-L-lysine</i> / Poli-L-lisina
<b>PVA</b>	<i>Polyvinyl alcohol</i> / álcool polivinílico
<b>PVP</b>	<i>Polyvinyl pyrrolidone</i> / Poli-vinil pirrolidona
<b>RPMI</b>	Sigla de Roswell Park Memorial Institute
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> / Dodecil sulfato de sódio

<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor beta</i> / Fator transformante de crescimento beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> / Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	19
2.2 AGLOMERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS .....	22
2.3 SISTEMA IMUNITÁRIO .....	24
2.4 ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS .....	25
2.5 AÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS SOBRE O SISTEMA IMUNITÁRIO .....	30
2.6 AÇÃO DO FM-DMSA SOBRE O SISTEMA IMUNITÁRIO.....	35
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1 FLUIDO MAGNÉTICO.....	40
4.2 PROCEDÊNCIA, SELEÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS .....	41
4.3 REAGENTES.....	41
4.4 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS NANOPARTÍCULAS DE MAGUEMITA RECOBERTAS COM DMSA .....	42
4.5 ENSAIO DE SEDIMENTAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE MAGUEMITA RECOBERTAS COM DMSA.....	44
4.6 OBTENÇÃO DO SORO E DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES .....	45
4.6.1 <i>Anestesia Intraperitoneal</i> .....	45
4.6.2 <i>Punção cardíaca para obtenção do soro dos camundongos</i> .....	46
4.6.3 <i>Perfusão cardíaca</i> .....	46
4.6.4 <i>Lavagem bronco-alveolar</i> .....	46
4.7 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS .....	47
4.7.1 <i>Lavagem peritoneal</i> .....	47
4.8 CULTURA PRIMÁRIA DOS MACRÓFAGOS DOS LAVADOS BRONCO-ALVEOLAR E PERITONEAL.....	47
4.9 INTERNALIZAÇÃO DO FM-DMSA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS E ALVEOLARES .....	49
4.9.1 <i>Grupos Experimentais</i> .....	49
4.9.2 <i>Incubação dos macrófagos peritoneais com o FM-DMSA para avaliação da viabilidade celular</i> .....	51
4.9.3 <i>Viabilidade Celular</i> .....	52
4.9.4 <i>Incubação dos macrófagos alveolares e peritoneais com o FM-DMSA para a dosagem de ferro</i> .....	52
4.9.5 <i>Determinação da concentração de ferro do FM-DMSA</i> .....	53
4.9.5.1 <i>Preparo dos padrões de FM-DMSA</i> .....	53

4.9.5.2 Dosagem de ferro do FM-DMSA.....	54
4.10 PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	56
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
5.1 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO .....	59
5.2 SEDIMENTAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	64
5.3. VIABILIDADE CELULAR.....	67
5.4. INTERNALIZAÇÃO DO FM-DMSA POR MACRÓFAGOS ALVEOLARES E PERITONEAIS .....	68
5.5. PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	72
5.5.1 <i>Produção de TGF-<math>\beta</math></i> .....	73
5.5.2 <i>Produção de IL-10</i> .....	74
5.5.3 <i>Produção de IL-1<math>\beta</math></i> .....	74
5.5.4 <i>Produção de TNF-<math>\alpha</math></i> .....	75
5.5.5 <i>Produção de IL-6</i> .....	76
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas têm sido amplamente utilizadas para os mais diversos fins, inclusive para aplicações biomédicas. A utilização das mesmas permite, por exemplo, aumento na solubilidade de drogas pouco solúveis, o direcionamento dos fármacos de maneira célula ou tecido-específica, a passagem de drogas através das barreiras epiteliais e endoteliais, o direcionamento de grandes moléculas para os espaços intercelulares, o co-direcionamento de dois ou mais fármacos em uma terapia combinatória e o monitoramento dos locais de direcionamento dos fármacos por técnicas de visualização das nanopartículas (FAROKHZAD et al., 2009). Além disso, as nanopartículas melhoram a farmacocinética das drogas, reduzindo seus efeitos colaterais e tornando suas ações mais eficazes. Todas essas características podem vir acompanhadas, inclusive, por uma diminuição do custo nos tratamentos (DOBROVOLSKAIA et al., 2008; KARLSSON et al., 2008).

Embora as nanopartículas tenham se revelado importantes ferramentas tecnológicas, é preciso melhor avaliar as suas aplicações biológicas. Quando alcançam a circulação sanguínea, essas nanoestruturas encontram um ambiente complexo com proteínas plasmáticas e células imunitárias. O encontro com fagócitos, por exemplo, pode levar a um processo de internalização das mesmas. Essa internalização pode ocorrer por diversas vias; podendo, inclusive, ser facilitada pela opsonização das nanopartículas, ou seja, adsorção de proteínas plasmáticas em suas superfícies. Tal fagocitose impede que as partículas cheguem ao sítio de interesse ou permaneçam livres nos tecidos, reduzindo a eficácia dos tratamentos. Somando-se a essa questão, existem os efeitos adversos gerados pelo sistema imunitário que podem acarretar, por exemplo, reações de hipersensibilidade (DOBROVOLSKAIA et al., 2008). Por outro lado, no tratamento de algumas doenças e em diagnósticos por imagem a internalização das nanopartículas pode ser importante para direcioná-las a sítios específicos como fígado, baço, pulmão e tecidos linfóides (BEDUNEAU et al., 2009). Assim, é importante compreender a resposta do organismo às nanopartículas, incluindo caracterizar a ação do sistema imunitário inato para, posteriormente, utilizar estratégias que minimizem seus efeitos adversos; modificando, por exemplo, a superfície das nanopartículas para minimizar

a ação do sistema complemento, um dos componentes da imunidade inata, ou para torná-las mais eficazes (DOBROVOLSKAIA et al., 2008).

Dentre a grande variedade de nanopartículas que vêm sendo produzidas, merecem destaque as nanopartículas que constituem os fluidos magnéticos (FM). Os FM são sistemas coloidais estáveis formados por nanopartículas magnéticas dispersas em meios líquidos orgânicos ou inorgânicos (PAPELL, 1964).

Estudos demonstraram que o fluido magnético contendo nanopartículas magnéticas recobertas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico (FM-DMSA) apresenta distribuição preferencial para o pulmão após administração intravenosa em camundongos (CHAVES et al., 2002; GARCIA et al., 2005; VALOIS et al., 2009). No entanto, também tem sido demonstrado que as nanopartículas magnéticas do FM-DMSA induzem a migração transendotelial de monócitos para o parênquima pulmonar e parte dessas nanopartículas é internalizada pelos monócitos presentes na circulação sanguínea e por macrófagos no tecido. Além disso, a administração de FM-DMSA aumenta a produção de citocinas e a expressão de moléculas que atuam como receptores de proteínas de complemento em macrófagos no pulmão (VALOIS et al., 2009). Essas observações são indicativas da ativação do sistema imunitário inato pelo FM-DMSA.

Tendo em vista as possíveis aplicações do FM-DMSA em terapias com aplicação intravenosas, torna-se importante uma melhor compreensão da relação entre a resposta imune inata desencadeada pela administração dessas nanopartículas magnéticas.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas possuem dimensões nanométricas (1 a 100 nm) que conferem a elas propriedades magnéticas singulares (ASTM International Committee E56 on Nanotechnology, 2006; LAURENT et al., 2008). Na ausência de um campo magnético, as nanopartículas magnéticas possuem elétrons com spins desordenados; contudo a incidência de um campo magnético externo é capaz de orientar o momento magnético das partículas, tornando-as magnetizadas. Quanto mais forte o campo magnético, maior será a magnetização das nanopartículas. A propriedade de tornar-se magnetizada apenas na presença de um campo magnético é conhecida como paramagnética, sendo que partículas com elevada susceptibilidade magnética são denominadas superparamagnéticas (KACHKACHI, 2006; LIN et al., 2010).

As nanopartículas magnéticas podem ser empregadas em áreas da mineralogia, geologia, química e biomedicina (LIN et al., 2008). Nas aplicações biomédicas (figura 1), as nanopartículas magnéticas são muito utilizadas como agente de contraste para imagens de ressonância magnética, contudo diversos estudos são desenvolvidos para diversificar a funcionalidade dessas nanopartículas. Assim, dependendo da cobertura e moléculas associadas às nanopartículas, os FM podem ser utilizados na separação de células e biomoléculas, na engenharia tecidual, no tratamento de tumores por hipertemia e no carreamento de drogas e DNA a alvos específicos (ITO et al., 2005; LIN et al., 2008; MORAIS et al., 2005; MCBAIN et al., 2008). Diversos estudos com nanopartículas magnéticas para esses fins estão sendo desenvolvidos, principalmente com células e modelos animais. Os testes clínicos ainda são escassos, uma vez que é preciso maior compreensão e consolidação dos conceitos envolvidos na aplicação desse tipo de nanopartícula (LAURENT et al., 2008; LIN et al., 2008; LIN et al., 2010; MCBAIN et al., 2008).

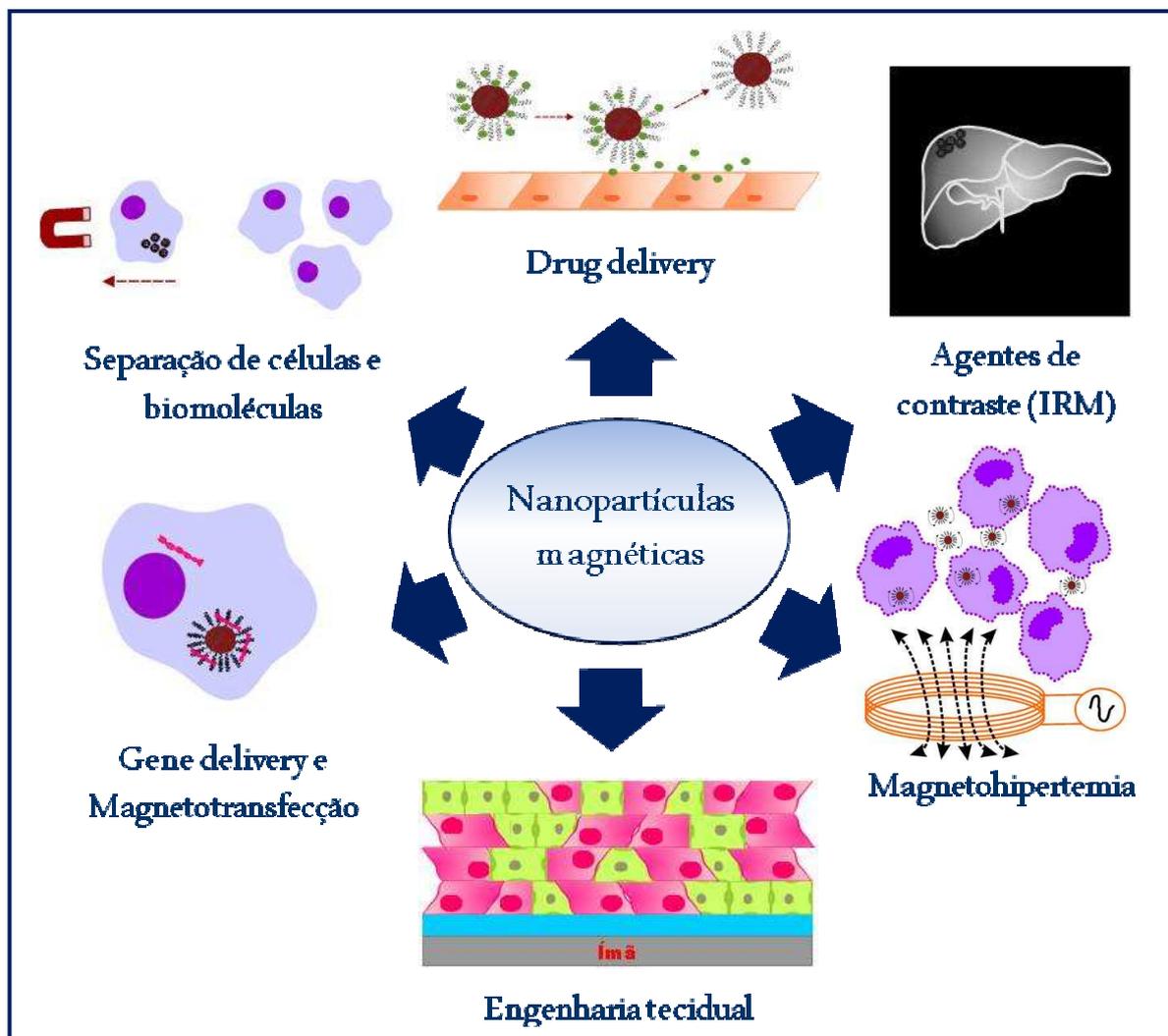


Figura 1. Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas.

Existem diversos materiais para a produção de nanopartículas magnéticas, como os óxidos de ferro e as ferritas. Contudo muito desses materiais são bastante tóxicos para aplicações *in vivo*. Os óxidos de ferro, tais como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e maguemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), são componentes mais seguros para a administração *in vivo*. As nanopartículas magnéticas de maguemita apresentam vantagem adicional em relação às de magnetita por possuírem ferro em um estado oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ), ocasionando menos danos ao organismo (MCBAIN et al., 2008). Embora as nanopartículas de óxido de ferro sejam menos tóxicas que aquelas produzidas a partir de outros metais, ainda há preocupações acerca de seus efeitos no organismo, pois elas podem ser internalizadas e afetar as atividades celulares. Assim, torna-se essencial a utilização de coberturas com substâncias biocompatíveis para uma menor citotoxicidade (LIN et al., 2010).

A cobertura das nanopartículas de óxido de ferro é essencial para torná-las biocompatíveis e estáveis em solução fisiológica. Essa cobertura pode ser feita utilizando-se de polímeros naturais, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos e coberturas com polímeros sintéticos, sílica, ouro, entre outros. É possível, ainda, acoplar biomoléculas ativas a essas coberturas como anticorpos e DNA, tornando-as específicas a determinados alvos (MCBAIN et al., 2008).

O ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) apresenta grandes vantagens quando utilizado como cobertura de nanopartículas de óxido de ferro. Ele é capaz de formar complexos fortes com a superfície das nanopartículas (WILHELM et al., 2003). Além disso, é possível imobilizar moléculas na superfície devido aos seus grupamentos químicos disponíveis (figura 2). As estratégias de imobilização de proteínas em nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA variam bastante. Grande parte dos estudos, busca imobilizar proteínas por meio dos grupos carboxílicos, embora a imobilização pelas sulfidrilas também possa ser utilizada para a formação de ligação covalente com ligantes biológicos. A ligação pelos grupos sulfidrilas pode ser alcançada sem a utilização de reagentes específicos, apenas incubando as proteínas de interesse com as nanopartículas (GAN, et al., 2007; LAURENT et al., 2008; LEE et al., 2008; LI et al., 2007; MACIEL, 2008; ZHANG et al., 2007).

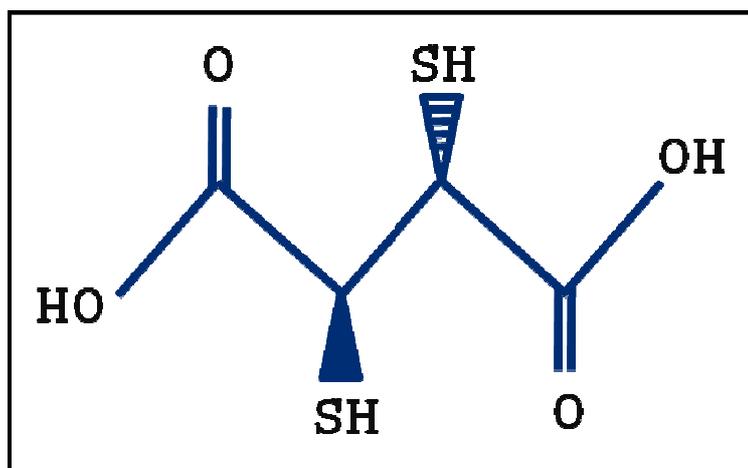


Figura 2. Fórmula estrutural do DMSA.

Como citado anteriormente, para as aplicações *in vivo* e *in vitro*, as nanopartículas devem estar dispersas em soluções fisiológicas; porém, com o passar dessas soluções, elas tendem a aglomerar. A estabilização das nanopartículas é, portanto, é essencial para obter FM que não agreguem em meio biológico. Vale ressaltar que, além da cobertura, o conteúdo do meio de dispersão também ajuda na estabilização das nanopartículas magnéticas (ALEXIS et al., 2008; ALLOUNI et al., 2009; BIHARI et al., 2008; BUFORD et al., 2007; CHEN et al., 2008; DENG et al., 2009; LIM et al., 2008; XU, 1998).

## 2.2 Aglomeração de nanopartículas

A toxicidade das nanopartículas está associada a diversas características físico-químicas das mesmas, tais como forma, tamanho, área de superfície, estado de aglomeração, potencial de superfície, e a química de sua superfície. Ainda, a aglomeração e subsequente sedimentação das nanopartículas dependem da forma, do tamanho, do tempo e da dose utilizada durante sua aplicação. Assim, essas propriedades devem ser consideradas ao se realizarem estudos de toxicidade *in vitro* (ALLOUNI et al., 2009; GUPTA et al., 2008; HAMILTON et al., 2008; MÜLLER et al., 2007; SUZUKI et al., 2008).

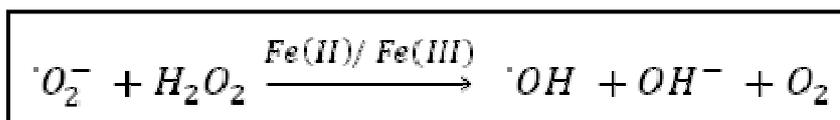
Aglomerados de nanopartículas são definidos como um grupo de partículas mantidas unidas por forças relativamente fracas, tais como as forças de van der Waals, que podem facilmente se romper, em fragmentos menores. O conceito de agregados difere-se do de aglomerados, pois nele os componentes individuais estão fortemente associados por ligações químicas (ASTM International Committee E56 on Nanotechnology, 2006).

O estado de aglomeração é essencial para determinar como as nanopartículas irão circular e ser eliminadas no organismo. A aglomeração também afeta a dissolução das nanopartículas. Assim, a caracterização do tamanho da partícula primária e dos aglomerados é essencial, pois pode afetar a deposição, a eliminação e as respostas celulares acarretando, por exemplo, o aumento da resposta inflamatória (GRASSIAN et al., 2007; PETTIBONE et al., 2008).

A investigação dos efeitos das nanopartículas em dispersões contendo aglomerados não é apropriada, pois as repostas celulares podem ser diferentes daquelas de nanopartículas não aglomeradas. Há diversas maneiras descritas para minimizar o efeito de aglomeração, tais como a utilização de surfactantes pulmonares, tween, fluido do lavado bronco-alveolar, albumina e soro como estabilizantes em soluções fisiológicas (ALLOUNI et al., 2009; BIHARI et al., 2008; BILITWISKI et al., 2008; GÓMEZ et al., 2006; GUPTA et al., 2008; LINGNAU et al., 2007).

Em um estudo utilizando diversas formas de estabilização de nanopartículas dos mais diferentes tipos de materiais (TiO<sub>2</sub>, prata, ZnO, SiO<sub>2</sub>, poliestireno, entre outras) BIHARI et al. (2008) determinaram que, independente do tipo de partícula, dispersões com albumina sérica humana (HSA), albumina sérica murina (MSA) ou albumina sérica bovina (BSA) levam a uma redução do diâmetro hidrodinâmico médio dos aglomerados, tanto em PBS quanto em meio de cultura RPMI-1640. Outros estudos também observaram o potencial do soro e da albumina em reduzir o estado de aglomeração das nanopartículas, determinando que as proteínas e os lipídeos possuem um efeito importante ao depositarem-se em suas superfícies (ALLOUNI et al., 2009; BUFORD et al., 2007; CHEN et al., 2008; DENG et al., 2009).

A aglomeração das nanopartículas também pode ser responsável por potencializar os seus efeitos tóxicos, principalmente por provocar o aumento da internalização celular. Os efeitos citotóxicos das nanopartículas de óxido de ferro incluem a transitória indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) que pode prejudicar a membrana plasmática, as mitocôndrias e o material genético das células. Isso porque no lisossomo a presença de ferro leva à reação de Fenton (figura 3), na qual os íons de ferro reagem com peróxido de hidrogênio, resultando na formação de radicais livres de oxigênio extremamente reativos que levam aos danos celulares (SOENEN; CUYPER, 2009; LIN et al., 2010).



**Figura 3.** Representação esquemática da Reação de Fenton.

### 2.3 Sistema Imunitário

O sistema imunitário é constituído por células e moléculas que podem desencadear dois tipos fundamentais de respostas imunes a partir do contato com patógenos. A resposta imune adaptativa é caracterizada pela ação antígeno-específica dos linfócitos T e B. Uma vez ativadas contra um determinado antígeno, essas células são capazes de reconhecê-lo em infecções subsequentes, combatendo-os prontamente. Por outro lado, a resposta imune inata não é específica e não possui memória. Nesse tipo de resposta estão envolvidas células fagocitárias tais como neutrófilos, macrófagos e monócitos; células responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios (mastócitos, eosinófilos e basófilos) e células NK (*Natural Killer*). O componente molecular desse tipo de resposta inclui o sistema complemento, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (DELVES; ROITT, 2000).

O sistema complemento contribui para as defesas do hospedeiro de várias maneiras, podendo auxiliar a fagocitose pela opsonização, recrutar e ativar várias células incluindo células polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos, participar na regulação de respostas de anticorpos e auxiliar na eliminação de complexos imunológicos e células apoptóticas. O complemento compreende mais de 20 proteínas séricas que são produzidas por uma variedade de células incluindo, hepatócitos e macrófagos. As proteínas do complemento ligam-se a imunoglobulinas ou a componentes de membrana das células. Outras proteínas são proenzimas que, quando ativadas, clivam outras proteínas do complemento. Com a clivagem, algumas das proteínas do complemento liberam fragmentos que podem ativar células, aumentar a permeabilidade vascular e promover a opsonização (MAYER, 2009).

De forma geral, existem três vias distintas para a ativação do complemento que dependem de diferentes moléculas para seu início. A via clássica que é ativada por complexos antígeno-anticorpo na superfície do patógeno (DELVES; ROITT, 2000); a via da lectina ligadora de manose que se inicia pela ligação de uma lectina sérica a carboidratos contendo manose presentes na superfície dos patógenos durante a fase aguda (GUPTA et al., 2008); e a via alternativa, resultante da ligação

espontânea do C3 ativado, presente no plasma, à superfície do patógeno (DELVES; ROITT, 2000).

Independentemente da fonte de ativação do complemento, o resultado é o mesmo: clivagem de C3 associado à membrana dos patógenos pelas convertases C3. A clivagem da proteína C3 gera o fragmento pequeno C3a (mediador inflamatório que age recrutando fagócitos) e o fragmento grande C3b que opsoniza o patógeno, depositando-se sobre a sua superfície, permitindo o reconhecimento por receptores de C3b para a fagocitose. Subseqüentes proteólises de C3b levam a produção dos fragmentos iC3b, C3c e C3dg, reconhecidos por diferentes receptores. Caso o C3b não seja clivado a iC3b, a cascata pode prosseguir resultando na formação de outros fragmentos envolvidos no recrutamento de mais células (C4a e C5a) e de fragmentos que serão responsáveis por formar o complexo de ataque à membrana em bactérias como C5b, C6, C7, C8 e C9 (DELVES; ROITT, 2000; SUZUKI et al., 2008).

A ativação do complemento pode resultar, portanto, em três maneiras distintas de ação para a proteção contra uma infecção: produção de grande quantidade de proteínas do complemento ativadas que se ligam ao patógeno, opsonizando-o, para que seja internalizado pelos fagócitos portadores de receptores para o complemento; quimioatração e ativação de mais células fagocitárias ao sítio de ação do complemento, e, por último, os danos às membranas celulares devido à formação de poros pelas proteínas do complemento (SUZUKI et al., 2008).

## **2.4 Ativação de macrófagos**

Monócitos e macrófagos são células especializadas na fagocitose de microrganismos e partículas estranhas (GORDON, 2008) e capazes de produzir uma grande variedade de citocinas. Quando ativadas, essas células mononucleares liberam, dentre outras citocinas, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  que desencadeiam processos essenciais da resposta imune, ativando células endoteliais e células de defesa, inclusive outras células mononucleadas (DALE et al., 2008). A ativação de monócitos e de macrófagos residentes resulta na fagocitose, sendo que a

capacidade fagocitária dos mesmos depende de uma precisa regulação das citocinas no organismo (DALE et al., 2008; LINGNAU et al., 2007).

Denomina-se fagocitose o processo de ligação e reconhecimento do patógeno (partículas, bactérias e células apoptóticas) por receptores de superfície celular das células fagocitárias e posterior internalização em vesículas seguida pela sua destruição (ADEREM; UNDERHILL, 1999; BILITWISKI, 2008; LINGNAU et al., 2007). Diferentes receptores são responsáveis pela fagocitose mediada pelos monócitos e macrófagos (DELVES; ROITT, 2000; LINGNAU et al., 2007). Existem receptores que reconhecem padrões de motivos estruturalmente semelhantes em diferentes moléculas, discriminando entre o próprio e o não-próprio. Estes receptores são as lectinas ligadoras de manose. Um segundo grupo de receptores de fagócitos abrange os receptores de varredura, que possuem uma grande variedade de ligantes (bactérias, partículas não opsonizadas e lipoproteínas modificadas) (HAMILTON et al., 2008). Receptores de monócitos e macrófagos que reconhecem moléculas do Complemento e a porção Fc dos anticorpos também são capazes de mediar a fagocitose (DELVES; ROITT, 2000)

Durante a resposta imune, os macrófagos são ativados para combater patógenos, partículas ou células apoptóticas. Nessas situações eles podem diferenciar-se de acordo com a ativação. A ativação clássica dos macrófagos resulta em células com capacidade de produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) para o combate de patógenos intracelulares e apresentação de antígenos. Macrófagos ativados pela via clássica são capazes de secretar uma variedade de citocinas pró-inflamatórias: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18. Na ativação alternativa dos macrófagos há grande produção de IL-10, TGF- $\beta$  e arginase-1 para combater patógenos extracelulares e para o reparo tecidual podendo agravar processos fibróticos (DALEY et al., 2009; FAIRWEATHER et al., 2009; FLAVELL et al., 2010; XU et al., 2006).

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular produzidas por vários tipos celulares e auxiliam na resposta imune recrutando e ativando células imunes, estimulando a produção de radicais livres e de outras proteínas inflamatórias. São essenciais para a integração na resposta imune. Dentre os diversos tipos de citocinas, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6 e TGF- $\beta$  são produzidas por macrófagos e desempenham papéis importantes na resposta imune (DELVES;

ROITT, 2000; SCHUH et al., 2003; SUZUKI et al., 2008). O resumo da produção e ação dessas citocinas pode ser observado na tabela 1.

Como citado anteriormente, uma importante habilidade dos macrófagos é produzir citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias. O balanço desses dois tipos de citocinas define a resposta imune que será gerada (CHUNG et al., 2006).

O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por monócitos, fibroblastos e células endoteliais. Macrófagos, linfócitos T e B, células musculares lisas, eosinófilos, condrócitos e osteoblastos também produzem essa citocina após estimulação. Devido a sua ação pró-inflamatória e pró-oxidativa, o TNF- $\alpha$  pode complicar diversas doenças tais como psoríase, artrite reumatóide e desordens pulmonares. O TNF- $\alpha$  é capaz de estimular a produção de EROs, *in vitro* e *in vivo*. Além disso, ele também é responsável pela produção de outras moléculas pró-inflamatórias (MUKHOPADHYAY et al., 2006).

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória importante na ativação de macrófagos e células T e no estímulo da produção de citocinas quimiotáticas para o recrutamento de células imunes. Atuando, por exemplo, na atração de neutrófilos pelo estímulo da produção de IL-8 e PAF (fator ativador de plaquetas) (DELVES e ROITT, 2000; GOODMAN et al., 2003; WAGNER; ROTH, 2000).

A IL-6 está envolvida na diferenciação de monócitos em macrófagos, aumento da expressão de MCP-1 para o recrutamento de monócitos e de IL-8 para o recrutamento de neutrófilos. Essa citocina também é responsável pela redução da produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (KAPLANSKI et al., 2003). A citocina TGF- $\beta$  é muito estudada devido às suas características de estimular a fagocitose de células em apoptose e inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, de óxido nítrico e de íon superóxido, reduzindo a inflamação e prevenindo o desenvolvimento de imunopatologias (LI et al., 2006).

Durante o processo de reparo tecidual, o TGF- $\beta$  é importante na inflamação, angiogênese e reepitelização. Ele também é responsável por facilitar o recrutamento de células inflamatórias, aumentar a ação de fagocitose de restos celulares pelos macrófagos e desativar a produção de EROs dessas células, protegendo os tecidos não afetados (BARRIENTOS et al., 2008).

Além de apresentar atividade antiinflamatória, o TGF- $\beta$  exerce uma ação pró-fibrótica, estando envolvido na produção de colágeno, por isso os macrófagos têm sido associados a processos de fibrose no pulmão, rim, fígado e em outros órgãos

(BARRIENTOS et al., 2008; NACU et al., 2008). Fibrose é o excesso de deposição de matriz extracelular, inclusive colágeno, resultante de reações inflamatórias crônicas induzidas por infecções persistentes, reações auto-imunes, respostas alérgicas, dentre outras (WYNN, 2008).

O TGF- $\beta$  é responsável pelo recrutamento de monócitos para o local da inflamação por múltiplos mecanismos: age como quimiotrativo, induz expressão de moléculas de adesão como a LFA-1 e o receptor de fibronectina nos monócitos e induz produção de metaloproteinasas da matriz para a dissolução de membranas vasculares, facilitando a transmigração. Os monócitos diferenciam-se em macrófagos com o auxílio do TGF- $\beta$ , aumentando a resposta inflamatória e retirada de restos celulares. O TGF- $\beta$  também pode estimular a IL-6 em monócitos, mas quando eles se diferenciam em macrófagos, ele atua fundamentalmente como inibidor dessa citocina (BARRIENTOS et al., 2008; LI et al., 2006).

A IL-10 é produzida por macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T dentre outras, geralmente atua como uma citocina antiinflamatória e imunossupressiva, diminuindo a inflamação crônica e inibindo a fibrose (WYNN, 2008). Ela é capaz de inibir as funções de células Th1, células NK, monócitos e macrófagos, inclusive a síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e TNF- $\alpha$ ), quimiocinas (MCP1, MCP5, IL-8, MIP-2) e a produção de óxido nítrico. Sendo assim, a IL-10 é capaz de restringir a resposta inflamatória (COUPER et al., 2008; ZHANG, et al., 2010). Embora a IL-10 seja uma citocina antiinflamatória e imunossupressiva, ela é responsável por aumentar a fagocitose mediada por anticorpos e complemento (LINGNAU et al., 2007).

**Tabela 1.** Principais citocinas produzidas por macrófagos e suas ações.

<b>Citocina</b>	<b>Fonte</b>	<b>Ação</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Macrófagos	Ativação de células T
	Células epiteliais	Ativação de macrófagos
		Promoção da inflamação
		Quimiotaxia de neutrófilos
<b>IL-6</b>	Macrófagos	Ativação de linfócitos
	Células Th2	Diferenciação de células B e de monócitos
	Células epiteliais	Aumento da queima oxidativa
		Redução da produção de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$
		Produção de proteínas de fase aguda
<b>IL-10</b>	Macrófagos	Imunossupressiva e antiinflamatória
	Células T	Inibição de células Th1, Células NK, monócitos e macrófagos
	Células B	Inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e de óxido nítrico.
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Monócitos	Promoção da inflamação e oxidação
	Macrófagos	Ativação do endotélio
	Células NK	Ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ $\beta$
	Células T	
	Células B	
	Mastócitos	
	Fibroblastos	
	Células endoteliais	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Monócitos	Atração de monócitos
	Macrófagos	Diferenciação de monócitos em macrófagos
	Mastócitos	Imunossupressão
	Células B	Produção de colágeno
	Células T	Estímulo da fagocitose de restos celulares
		Inibição da produção de EROs

## 2.5 Ação das nanopartículas sobre o Sistema imunitário

A atuação do complemento e a produção de citocinas são eventos da imunidade inata que auxiliam na compreensão dos fenômenos ocasionados pelas nanopartículas sobre o sistema imunitário, que podem ser induzidos por diferentes nanopartículas e coberturas (CHEN et al., 2006; GÓMEZ et al., 2006).

O sucesso da aplicação de nanopartículas de óxido de ferro depende da inexistência de graves efeitos imunológicos; uma vez que, ao serem administradas intravenosamente, as nanopartículas encontram um ambiente complexo com proteínas plasmáticas e células do sistema imunitário, podendo ser internalizadas por células fagocitárias (DOBROVOLSKAIA et al., 2008). Estudos demonstram que vários tipos de nanopartículas magnéticas não afetam de forma significativa o sistema imunitário. A marcação de macrófagos com nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas associadas a sulfato de protamina, por exemplo, não afeta a sua morfologia, a sua capacidade de diferenciação, a expressão de proteínas de superfície, a migração, a produção de citocinas e a modulação da atividade de outras células; mesmo exibindo alta internalização de nanopartículas por receptores de varredura (JANIC et al., 2008). Observa-se também que a ausência de citotoxicidade pode vir acompanhada de normalidade nas atividades dos monócitos, uma vez que não há produção de IL-1 e IL-6 ou alteração do padrão de migração na internalização de nanopartículas superparamagnéticas recobertas com dextran (ENGBERINK et al., 2007).

Em contrapartida, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro denominadas Ferucarbotran podem ser internalizadas por macrófagos sem causar morte celular, mas alterando algumas de suas funções com maior produção de citocinas (TNF- $\alpha$ ), mudança nos eventos de migração e com aumento da produção de óxido nítrico (HSIAO et al., 2008). Outras nanopartículas magnéticas de magnetita, em pequenas doses, levam a alterações no sistema imunitário, com aumento na produção de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e TGF- $\beta$  no sangue de animais tratados, induzindo uma resposta inflamatória que pode ser acompanhada da produção de proteínas de *heat shock* e metaloproteinases, com alto estresse oxidativo (CHEN et al., 2010; PARK et al., 2010a).

De modo geral, as nanopartículas magnéticas são bem toleradas pelo organismo, porém a administração intravenosa pode levar a efeitos biológicos que devem ser considerados. Ao atingirem a corrente sanguínea, as nanopartículas são recobertas por componentes do sangue, como proteínas plasmáticas, formando uma camada complexa e variável. Certos componentes dessa camada são denominados opsoninas, pois aumentam a internalização do material. A opsonização leva ao reconhecimento das partículas pelo sistema de defesa do corpo composto por células especializadas na fagocitose (AGGARWAL et al., 2009; BERRY; CURTIS, 2003).

A camada de proteínas que recobre as nanopartículas produz uma assinatura que é reconhecida pelo sistema imunitário determinando a internalização, a rota de distribuição nos órgãos e a remoção do organismo. Em geral, quanto maior a razão área superficial/volume, mais proteínas ligam-se às nanopartículas. Assim, partículas menores, proporcionalmente, apresentam maior interação com as proteínas plasmáticas. A caracterização das proteínas também é importante para entender a farmacocinética e farmacodinâmica das nanopartículas e depende não apenas do tipo de cobertura, mas também do tamanho, da forma, da carga e dos ligantes da superfície, da solubilidade e da via de administração (AGGARWAL et al., 2009; ALEXIS et al., 2008).

O mecanismo de adsorção das proteínas ainda é pouco compreendido, é provável que proteínas em altas concentrações no plasma inicialmente ocupem a superfície, porém posteriormente sejam substituídas por proteínas em menores concentrações e de maior afinidade em um processo denominado efeito de Vroman. Esse efeito é importante para determinar a biodistribuição das nanopartículas no organismo. De forma geral, inicialmente a albumina é a primeira a se ligar, seguida de fibrinogênio e de apolipoproteínas. Proteínas do complemento e IgG também se ligam em maior quantidade após períodos mais longos (AGGARWAL et al., 2009).

Algumas proteínas podem afetar diretamente a internalização das nanopartículas e sua biodistribuição, pois são reconhecidas pelos macrófagos e rapidamente removidas pelo sistema retículo endotelial, é o caso das proteínas do sistema complemento e o fibrinogênio (AGGARWAL et al., 2009).

A composição e a superfície química das nanopartículas alteram a identidade e quantidade de proteínas adsorvidas, assim a adsorção de proteínas do complemento depende das características da superfície das nanopartículas como o

tipo de polímero utilizado na cobertura, seu tamanho, densidade, configuração de superfície e acessibilidade dos grupos reativos. Sabe-se, por exemplo, que partículas com superfície carregada ativam o complemento mais eficientemente do que partículas neutras. (DOBROVOLSKAIA et al., 2008; HARASHIMA et al., 1998; MÜLLER et al., 2006). Partículas neutras apresentam menor opsonização que as carregadas e partículas hidrofóbicas são opsonizadas de forma mais eficiente e rapidamente internalizadas e removidas da circulação em comparação com as hidrofílicas, que resistem a esse processo e são removidas mais lentamente; além disso, a composição e quantidade de proteínas que ligam são diferentes. O tamanho e a forma influenciam principalmente na quantidade de proteínas que se ligam e não na identidade das mesmas (AGGARWAL et al., 2009; ALEXIS et al., 2009; BERRY; CURTIS, 2003).

O êxito da aplicação de nanopartículas depende da permanência na circulação sanguínea por um tempo suficiente para que elas alcancem o sítio de interesse, como tumores e tecidos inflamados. Entretanto, como podem ser prontamente removidas da circulação, estratégias que reduzam esse evento devem ser adotadas. A cobertura desses materiais com polímeros hidrofílicos aumenta sua meia-vida no sangue. Nanopartículas recobertas com polietilenoglicol (PEG) em alta densidade, por exemplo, exibem padrões de adsorção de proteínas diferenciados, proporcionando uma menor adsorção de opsoninas e, conseqüentemente, uma menor fagocitose pelas células do Sistema Imunitário, resultando em maior tempo de circulação das nanopartículas no sangue (GAUCHER et al., 2008). O PEG reduz a ativação do complemento, pois coberturas densas desse polímero ocasionam impedimento estérico que previne a opsonização e, portanto, a subsequente internalização por macrófagos (MOSQUEIRA et al., 2001). Além do PEG, outras coberturas evitam a opsonização: óxido de polietileno, poloxâmeros e dextran (AGGARWAL et al., 2009 BERRY; CURTIS, 2003).

Até mesmo nanopartículas recobertas com polímeros com características semelhantes podem resultar em respostas completamente distintas, como acontece com o *poli*-vinil pirrolidona (PVP). O PVP é um polímero hidrofílico assim como o PEG, contudo estudos demonstraram que, ao contrário do PEG, o PVP ativa a fagocitose pela grande adsorção de opsoninas do sistema complemento e IgG à superfície da nanopartícula (GAUCHER et al., 2008).

Reduzir o tamanho das partículas também ajuda a diminuir a opsonização e internalização das nanopartículas (AGGARWAL et al., 2009; BERRY; CURTIS, 2003). Observa-se que a internalização de partículas de óxido de ferro depende do tamanho. Em geral, após a administração, partículas com mais de 200 nm são captadas pelo baço e removidas por fagocitose, resultando em um tempo de circulação curto no sangue. Já partículas muito pequenas, menores que 10 nm, podem ser rapidamente removidas pelos rins. Assim, o tamanho ideal das nanopartículas de óxido de ferro para um tempo prolongado na circulação sanguínea seria de 10 -100 nm (LAURENT et al., 2008).

A maneira pela qual as nanopartículas ativam o complemento também pode ser dependente do modelo biológico utilizado. Nanopartículas lipídicas carregadas negativamente, por exemplo, ativam o complemento em humanos e porcos da Índia pela via clássica. Por outro lado, os carregados positivamente, ativam o Complemento pela via alternativa. Já em ratos, tanto os lipossomas carregados negativamente quanto os carregados positivamente ativam o Sistema Complemento pela via clássica (HARASHIMA et al., 1998).

O soro sanguíneo é bastante complexo e possui diversas proteínas que podem atuar como opsoninas, adsorvendo na parede das nanopartículas e tornando-as alvo da internalização por macrófagos; entretanto, ao mesmo tempo, ele pode atuar como inibidor ou atenuador da fagocitose. Estudos demonstraram que a albumina sérica pode reduzir esse processo ao tornar as nanopartículas mais hidrofílicas, uma vez que a adsorção de proteínas decorre principalmente das interações hidrofóbicas entre as nanopartículas e as opsoninas, embora interações eletrostáticas também possam contribuir (EHRENBERG et al., 2009; OGAWARA et al., 1999). A albumina é o principal componente protéico do soro, o que sugere que a atividade de inibição da fagocitose pode estar relacionada a ela ou a outras proteínas que atuem da mesma maneira (OGAWARA et al., 1999). Assim, a internalização de nanopartículas depende tanto das opsoninas quanto de proteínas que possuem o efeito contrário, como a albumina, denominadas desopsoninas. Ou seja, a internalização depende do balanço entre opsoninas e desopsoninas adsorvidas na superfície das nanopartículas (EHRENBERG et al., 2009; GAUCHER et al., 2008; OGAWARA et al., 1999).

Estudos acerca de certos tipos de nanopartículas superparamagnéticas demonstram que o reduzido tamanho e a cobertura densa previnem a opsonização

das mesmas. Além disso, nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIO) têm sua internalização aumentada pela adsorção de IgG do soro. Tendo em vista esse fato, esses estudos propuseram a ocorrência de uma ligação covalente de IgG às nanopartículas. Além disso, verificou-se que a ligação covalente de albumina também levava a um aumento na internalização. A ligação covalente do IgG e da albumina permite, portanto, utilizar os macrófagos como importantes veículos para agentes de contraste em diagnósticos e em terapias (BEDUNEAU et al., 2009; CHEN et al., 2008).

Ainda se discute os benefícios e desvantagens da ligação de proteínas, uma vez que elas podem direcionar as nanopartículas para determinadas áreas do corpo. Por exemplo, a ligação de certas apolipoproteínas distribui as nanopartículas através da barreira hematoencefálica. Em contrapartida, a ligação de outras proteínas acarreta rápida captura pelo baço e fígado diminuindo a circulação e retenção dentro do corpo (AGGARWAL et al., 2009).

Embora a internalização das nanopartículas possa beneficiar alguns tratamentos específicos, em outros casos é importante evitar essa ação para permitir que as nanopartículas permaneçam longos períodos no sangue, cheguem a seus sítios específicos e não causem reações inflamatórias (BEDUNEAU et al., 2009; EHRENBERG et al., 2009; GAUCHER et al., 2008). Buscando essas aplicações, MÜLLER et al. (2007) comprovaram a ausência de efeitos sobre o Sistema Imunitário, *in vitro*, de nanopartículas magnéticas compostas por magnetita monocristalina recoberta com dextran de baixa massa molecular.

Cada tipo de nanopartícula deve ser avaliada como um caso único. Embora muitos estudos mostrem que coberturas de maior massa molecular provoquem menor internalização (BEDUNEAU et al., 2009; CHEN et al., 2008; EHRENBERG et al., 2009; GAUCHER et al., 2008). MÜLLER et al. (2007) demonstraram que nanopartículas recobertas com dextran de baixa massa molecular ativam menos eficientemente o Sistema Imunitário. Já BEDUNEAU et al. (2009) demonstraram que nanopartículas ligadas covalentemente à albumina aumentam a internalização, embora muitos estudos demonstrem que a albumina atue como uma desopsonina, inibindo a internalização de nanopartículas e lipossomos (HARASHIMA et al., 1998; OGAWARA et al., 1999). Portanto, é preciso avaliar cuidadosamente as nanopartículas empregadas, sendo possível modificar a superfície das mesmas para torná-las mais eficientes ao tratamento ou diagnóstico pretendido.

## 2.6 Ação do FM-DMSA sobre o Sistema Imunitário

Inicialmente, estudos acerca do FM-DMSA (fluido magnético composto por nanopartículas magnéticas recobertas com ácido-2,3-dimercaptosuccínico), demonstraram por meio de microscopia de luz e ressonância magnética uma distribuição preferencial para o pulmão algumas horas após sua administração endovenosa em camundongos (CHAVES et al., 2002). Uma vez no pulmão, observou-se que o FM-DMSA provocou um processo inflamatório moderado, com migração transendotelial dos leucócitos para o parênquima pulmonar (AZEVEDO et al., 2004; CHAVES et al., 2002). Posteriormente, CHAVES et al. (2005) observaram, por imunocitoquímica, que este processo inflamatório era acompanhado por um aumento da citocina IL-1.

GARCIA et al. (2005) avaliaram os efeitos do FM-DMSA por um período de até 90 dias, em camundongos, após a sua administração endovenosa. Constatou-se que o fluido induz uma migração dos leucócitos, estes alcançam o parênquima pulmonar e o epitélio de brônquios e alvéolos.

VALOIS et al. (2009) observaram que essa migração ocorre no pulmão após 4 e 12 horas da administração intravenosa de FM-DMSA em camundongos, com poucos danos a esse órgão. Além disso, esse estudo demonstrou, por imunofluorescência, que o FM-DMSA induz o aumento da expressão de algumas moléculas de adesão tais como o antígeno macrófágico-1 (Mac-1), uma integrina  $\beta_2$  também denominada de CD11b/CD18, em sítios pós-capilares e na microvascularização pulmonar. Recentemente, estudos com o FM-DMSA constataram a presença do mesmo, após administração intravenosa em macacos *Cebus apella*, em diferentes sítios tais como o tecido pulmonar, hepático, renal e esplênico, revelando que a remoção do FM-DMSA pode ocorrer pelo sistema hepatobiliar, pelos rins e pelas vias aéreas superiores. Além disso, verificou-se a presença de nanopartículas no interior de alguns tipos celulares, inclusive macrófagos e monócitos (MONGE-FUENTES, 2009).

VALOIS et al. (2010), por meio de ensaios de citometria de fluxo, identificaram os macrófagos e monócitos como as principais células envolvidas na migração transendotelial no pulmão após a administração intravenosa, em camundongos, de FM-DMSA. Também se observou, por microscopia eletrônica de transmissão, a

presença de nanopartículas magnéticas nos macrófagos do lavado bronco-alveolar. Além disso, a ausência de citotoxicidade do FM-DMSA aos macrófagos foi constatada *in vitro* por meio de ensaios de viabilidade celular. Esse mesmo trabalho, mostrou o aumento da expressão de mRNA de moléculas de adesão envolvidas na migração de leucócitos no pulmão de camundongos, inclusive da Mac-1, confirmando estudos anteriores; sendo esses aumentos acompanhados pelo acréscimo da produção de TNF- $\alpha$  e IL-10. Somando-se a esses resultados, experimentos com animais *knockout* para integrina  $\beta_2$  confirmaram que a migração dos macrófagos induzida pelo FM-DMSA é dependente da expressão dessas moléculas de adesão, uma vez que a migração foi completamente suprimida nesses animais *knockout* (VALOIS et al., 2010).

Conforme vem sendo demonstrado por diversos estudos, o FM-DMSA é responsável por estimular eventos relacionados à resposta inflamatória; entretanto a maneira como ele atua sobre os componentes do sistema imunitário ainda é desconhecida, sendo importante essa caracterização para determinar as possíveis aplicações biomédicas do mesmo ou para alterar suas propriedades a fim de alcançar uma aplicabilidade específica para essas nanopartículas.

**3 OBJETIVOS**

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar os efeitos das nanopartículas magnéticas de maguema recobertas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico (FM-DMSA), na presença de BSA ou soro de camundongo, na atividade de macrófagos peritoneais e alveolares murinos, em cultura primária.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Determinar meios de dispersões nos quais as nanopartículas permaneçam estáveis para utilização em cultura de células;
- b) Avaliar a citotoxicidade do FM-DMSA em macrófagos peritoneais murinos;
- c) Quantificar a internalização das nanopartículas por macrófagos alveolares e peritoneais murinos;
- d) Avaliar a produção de citocinas por macrófagos alveolares e peritoneais murinos em resposta ao FM-DMSA;

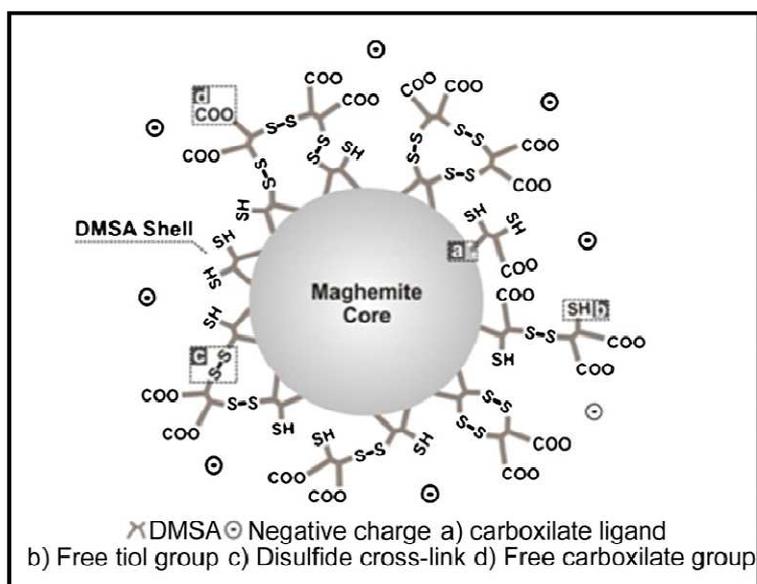
## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Fluido Magnético

Fluido magnético contendo nanopartículas magnéticas de maghemita recobertas com DMSA (figura 4), em meio aquoso com 0,9% de NaCl e pH fisiológico (7,2-7,4), foi produzido e cedido pela Profa. Dra. Emília Lima, do Laboratório de Química da Universidade de Goiás. O fluido magnético contém  $6,5 \times 10^{16}$  nanopartículas/mL com diâmetro médio de 5,3 nm (determinado por difração de raio-x) e uma concentração de ferro de 18,7 mg/mL.

Para a obtenção do FM-DMSA, soluções aquosas de cloreto férrico e cloreto ferroso foram misturadas em uma proporção molar de 2:1 com solução aquosa de amônia concentrada, em uma agitação vigorosa. Em seguida, adicionou-se uma solução de DMSA (0,3 mol/L) em uma razão molar DMSA/Fe de 11%. O NaCl foi adicionado à suspensão para alcançar uma concentração salina de 0,9% (p/v). O pH foi ajustado para 7,2-7,4.



**Figura 4.** Representação esquemática do FM-DMSA.

Fonte: VALOIS et al., 2009.

## 4.2 Procedência, seleção e manutenção dos animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando entre 30 e 40 g, e de aproximadamente 12 semanas de vida, com aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal, Instituto de Ciências Biológicas, UnB. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratórios (CEMIB) da Unicamp (Campinas, Brasil) e mantidos no biotério do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (UnB), em condições de temperatura, iluminação e higiene controladas e com o fornecimento de água e ração *ad libitum*.

## 4.3 Reagentes

**Tabela 2.** Lista de reagentes.

Reagentes	Fabricante
Acetato de amônio	Lafan Química Fina LTDA, BRA
Ácido ascórbico	Sigma-Aldrich Co., EUA
Ácido clorídrico	Vetec Química Fina Ltda., BRA
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich Co., EUA
Álcool anidro hidratado 99,3°	Zulu, BRA
Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Co., EUA
Cloreto de amônio (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Cloreto de sódio (NaCl)	Vetec Química Fina Ltda., BRA
Cloridrato de cetamina	Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., BRA

---

Dodecil sulfato de sódio (SDS)	ICN Biomedicals Inc., USA
DMSO	Mallinckrodt Chemical Inc., USA
EDTA dissódico (Na <sub>2</sub> EDTA)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Ferrozine	Labtest Diagnóstica SA, BRA
Kits de ELISA	EBioscience, EUA
MTT	Invitrogen, EUA
PBS	Laborclin Produtos para Laboratório Ltda., BRA
Penicilina/estreptomicina	GIBCO, EUA
Poli-L-lisina	Sigma-Aldrich Co., EUA
RPMI-1640	GIBCO, EUA
Rompum®	Bayer SA, BRA
Soro fetal bovino (SFB)	GIBCO, EUA
Tripsina/EDTA	GIBICO, EUA

---

#### **4.4 Determinação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de maguemita recobertas com DMSA**

A determinação do diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas recobertas com DMSA foi necessária a fim de alcançar uma estabilidade similar para as nanopartículas diluídas tanto em meio RPMI-1640 com BSA quanto em meio RPMI-1640 com soro de camundongo.

As nanopartículas da amostra de FM-DMSA estavam dispersas em solução aquosa com pH fisiológico. Nessas condições, elas são estáveis e assumem um diâmetro hidrodinâmico que representa essa estabilidade. Assim, para impedir a perda da estabilidade dessas nanopartículas quando adicionadas ao meio RPMI-1640 foi preciso avaliar em quais concentrações de soro de camundongo e BSA essas nanopartículas assumem um valor de diâmetro hidrodinâmico próximo ao das nanopartículas suspensas na solução aquosa original.

Soluções de RPMI-1640 com diferentes concentrações de BSA ou de soro de camundongo foram preparadas com pH 7,4. A adição do fluido magnético foi realizada imediatamente antes do início das análises. Ao adicionar-se o FM-DMSA, a solução foi agitada para garantir a homogeneidade da mistura do FM-DMSA com a solução de meio RPMI-1640.

As concentrações de BSA avaliadas no meio RPMI-1640 foram de 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5% e 3,0%. As concentrações de soro de camundongo foram de 2,5%; 3,0%; 3,5%; 4,5%; 5,0% e 6,0%. Elas foram escolhidas, pois concentrações muito abaixo delas não são suficientes para reduzir o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas. As medidas foram realizadas para concentrações de ferro do FM-DMSA de 0,03 mg/mL e 0,06 mg/mL, que correspondem a altas concentrações de ferro, testadas *in vitro* por outros estudos, mas que não apresentaram citotoxicidade para macrófagos em condições experimentais diferentes das nanopartículas do presente estudo (VALOIS et al., 2010). O diâmetro hidrodinâmico da amostra de FM-DMSA original contendo nanopartículas em suspensão aquosa também foi determinado. Foram preparadas duas amostras para cada solução, sendo a leituras de cada uma delas realizada em triplicata.

Para a determinação do diâmetro hidrodinâmico, um mililitro de cada uma das soluções foi transferido para uma cubeta de poliestireno e a determinação do tamanho das partículas foi realizada por espalhamento dinâmico de luz no aparelho ZetaSizer (Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK), no Laboratório de Química da Universidade de Goiânia. O *software* utilizado foi o DTS nano, versão 4.20, fornecido pelo fabricante Malvern. Os resultados foram expressos como o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas em suspensão para cada solução avaliada.

#### **4.5 Ensaio de sedimentação das nanopartículas magnéticas de maguemita recobertas com DMSA**

Para avaliar a estabilidade das nanopartículas, dispersas em diferentes soluções, realizou-se um ensaio de sedimentação que consistiu na determinação da absorbância a 450 nm, por 150min, das nanopartículas de maguemita recobertas com DMSA em meio RPMI-1640 puro ou em RPMI-1640 na presença de BSA ou soro de camundongo (ALLOUNI et. al., 2009; CHEN et al., 2008)

As concentrações de soro e BSA utilizadas para cada uma das concentrações de ferro foram escolhidas de acordo com a determinação do diâmetro hidrodinâmico realizada previamente. As concentrações escolhidas foram aquelas nas quais os diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas magnéticas não diferiam significativamente entre si e entre a suspensão aquosa original de nanopartículas. Assim, para a concentração de ferro de 0,03 mg/mL, as nanopartículas foram dispersas em meio RPMI-1640 com 2,5% de BSA ou com 4,5% de soro de camundongo. Já para a concentração de ferro de 0,06 mg/mL, as nanopartículas foram dispersas em meio RPMI-1640 com 1,5% de BSA ou com 4,5% de soro.

O ensaio de sedimentação foi realizado em diferentes tempos (30, 60, 90, 120 e 150 minutos), levando-se em consideração que o tempo de incubação das células com o FM-DMSA para avaliar a fagocitose das nanopartículas é de duas horas. O ensaio de sedimentação também foi realizado para as nanopartículas dispersas somente em RPMI-1640, pois é esperado que neste meio ocorra sedimentação das nanopartículas.

As soluções de meio RPMI-1640 com BSA ou soro de camundongo foram preparadas com pH 7,4 e antecedência de, no máximo, uma semana. Imediatamente após a adição do FM-DMSA às diferentes soluções de RPMI-1640, elas foram vigorosamente agitadas e as leituras da absorbância realizadas a 450 nm das amostras, em intervalos de 30 minutos, retirando-se amostras da superfície das soluções até completar a duração total de 2h30.

Foram realizados três ensaios, de forma independente, para confirmação dos resultados, sendo que a absorbância de cada uma das amostras avaliadas foi determinada em triplicata.

Com os resultados obtidos nesse ensaio não foi possível a comparação da sedimentação entre os grupos experimentais, pois as soluções possuem diferenças em suas composições que podem interferir nos valores de absorvância obtidos pelas interações com as nanopartículas presentes no meio. Assim, a comparação das diferenças de absorvância foi feita entre os tempos dentro de um mesmo grupo experimental.

#### **4.6 Obtenção do soro e de macrófagos alveolares**

Para a obtenção do soro de camundongo e dos macrófagos alveolares os animais foram anestesiados. Após a anestesia intraperitoneal, executou-se em um grupo de animais a punção cardíaca para retirada do sangue e em outro grupo a perfusão cardíaca seguida da coleta do lavado bronco-alveolar.

##### **4.6.1 Anestesia Intraperitoneal**

Os animais foram anestesiados com o anestésico geral cloridrato de cetamina a 10% (1 $\mu$ L/g de peso corporal) e com o sedativo, analgésico e relaxante muscular Rompum<sup>®</sup> a 2% (administrou-se o equivalente a 10% do volume de cetamina).

Os animais foram posicionados com o dorso voltado para cima, ligeiramente inclinados, ou seja, com a cabeça em uma posição inferior ao restante do corpo. Em seguida, desinfetou-se com álcool 70% o local da injeção, que foi administrada no quadrante posterior esquerdo da cavidade peritoneal em uma posição lateral à linha média do corpo do animal. Para tanto, utilizou-se uma seringa de 1 mL posicionada em um ângulo de 45°, até transpor a pele e a musculatura do camundongo. A cetamina e a Rompum<sup>®</sup> foram administrados lentamente, com a agulha sendo guiada de encontro à parede abdominal, para evitar a perfuração das vísceras e hemorragia. Primeiramente administrou-se o anestésico geral cetamina e, aos primeiros sinais da anestesia, administrou-se o relaxante muscular Rompum<sup>®</sup>.

#### **4.6.2 Punção cardíaca para obtenção do soro dos camundongos**

Imediatamente após a anestesia, com o animal em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, realizou-se a punção cardíaca para obtenção do sangue do animal. Assim, inseriu-se a agulha de 1 mL na parte mediana do animal exatamente abaixo do esterno. Ao encontrar o coração, iniciou-se a coleta do sangue. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram cuidadosamente depositadas em microtubos de polipropileno. Seguiu-se, então, a centrifugação dessas amostras a 1000xg, por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o soro foi coletado, esterilizado com filtro de 0,22 µm na câmara de fluxo laminar e armazenado a -80°C até o momento do uso.

#### **4.6.3 Perfusão cardíaca**

A perfusão cardíaca possibilita a lavagem do sistema circulatório pulmonar, para posterior aquisição do lavado bronco-alveolar com reduzida contaminação por células sanguíneas.

Após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica. Realizou-se incisão longitudinal mediana abdominal, seguida pela ruptura do diafragma e remoção do esterno e costelas. Em seguida, introduziu-se o escalpe no ventrículo direito do coração e iniciou-se a perfusão com solução de cloreto de sódio a 0,9%. Imediatamente após o início da perfusão, realizou-se incisão no átrio esquerdo do coração, permitindo a exsanguinação do animal, que foi realizada por 5 minutos, sob pressão constante de 3lbf/pol<sup>2</sup>.

#### **4.6.4 Lavagem bronco-alveolar**

A lavagem bronco-alveolar foi realizada para obtenção dos leucócitos presentes nas vias aéreas respiratórias. Imediatamente após a perfusão cardíaca, a

traquéia do animal foi exposta e realizou-se pequena incisão na região mediana da mesma. Em seguida, inseriu-se um cateter acoplado a uma seringa de 1 mL no orifício originado e realizou-se quatro lavagens consecutivas com 1 mL de PBS. As quatro lavagens do animal foram armazenadas no mesmo recipiente (tubo de polipropileno estéril) e mantidas a 4°C até o momento do uso.

#### **4.7 Obtenção de macrófagos peritoneais**

Para a obtenção dos macrófagos peritoneais, os camundongos foram mortos por deslocamento cervical e, em seguida, realizou-se a lavagem peritoneal.

##### **4.7.1 Lavagem peritoneal**

A lavagem peritoneal foi realizada para obtenção dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos. Imediatamente após o deslocamento cervical, realizou-se incisão longitudinal mediana abdominal na pele dos animais, sem perfurar o peritônio. Em seguida, com uma seringa de 1 mL inserida na cavidade peritoneal, evitando-se a perfuração das vísceras, foram administrados 4 mL de PBS estéril para a lavagem. Posteriormente, seguiu-se uma massagem na região abdominal do animal, por 1 minuto. Após esse período, foi realizada incisão longitudinal mediana abdominal no peritônio dos animais, por onde se inseriu uma pipeta Pasteur para remoção do lavado peritoneal. As lavagens provenientes de dois animais foram armazenadas no mesmo recipiente (tubo de polipropileno estéril) e mantidas a 4°C até o momento do uso.

#### **4.8 Cultura primária dos macrófagos dos lavados bronco-alveolar e peritoneal**

Após a realização da lavagem bronco-alveolar ou da lavagem peritoneal, a suspensão de células foi centrifugada a 400xg, por 5 minutos e a 4°C. Em seguida,

na câmara de fluxo laminar, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de solução de lise de hemácias com pH entre 7,2 e 7,4 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  150mM,  $\text{NaHCO}_3$  10mM e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1mM em água nanopura a 4°C) e centrifugado nas mesmas condições anteriores.

Posteriormente, o sobrenadante foi removido, as células ressuspensionadas em PBS (estéril e a 4°C) e realizou-se nova centrifugação nas condições previamente descritas. O sobrenadante foi, então, removido e o precipitado de células ressuspensionado em meio de cultura RPMI-1640 completo, ou seja, com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). Dez microlitros dessa suspensão de células foi diluída em Azul Tripán e aplicada no hemocitômetro de Neubauer (C. A. Hausser & Son, EUA) para a contagem de células. As células viáveis foram contadas em quatro quadrantes do hemocitômetro por meio do microscópio Axioskop (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) sob o aumento de 400x.

O número de leucócitos nas suspensões de células foi obtido por meio da seguinte equação:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de leucócitos}}{\text{mL}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de leucócitos contados} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados} (= 4)}$$

Em seguida,  $1,0 \times 10^5$  células por poço foram adicionadas às placas de 96 poços (Techno Plastic Products, CH). Para os experimentos realizados em placas de 12 poços (Techno Plastic Products, CH), adicionou-se  $3,0 \times 10^5$ . As células foram incubadas por 12 horas, a 37°C, em atmosfera umidificada e com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse período de incubação, apenas os macrófagos aderem à placa. Os demais leucócitos permanecem em suspensão e são removidos ao descartar-se o sobrenadante.

## **4.9 Internalização do FM-DMSA por macrófagos peritoneais e alveolares**

Nessa etapa, os ensaios foram realizados com o intuito de avaliar a viabilidade celular na presença do FM-DMSA e quantificar o ferro das nanopartículas magnéticas internalizadas pelos macrófagos nas diferentes condições experimentais.

### **4.9.1 Grupos Experimentais**

As células foram divididas, inicialmente, em três grupos. O grupo 1 (FM-1) corresponde às células que foram incubadas com o FM-DMSA em uma concentração de 0,03 mg/mL de ferro, já no grupo 2 (FM-2) as células foram incubadas com 0,06 mg/mL. Cada um desses grupos foi dividido em grupos experimentais com diferentes tratamentos associados ao FM-DMSA, conforme pode ser observado na tabela 2.

A escolha das concentrações de soro de camundongo e BSA, para cada uma das concentrações de FM-DMSA, foi realizada nos ensaios de determinação do diâmetro hidrodinâmico e de sedimentação das nanopartículas, previamente descritos.

O grupo 3 (Controle) corresponde às células que não receberam FM-DMSA, apenas albumina sérica bovina a 2,5% ou 1,5% (C-BSA) e soro de camundongo a 4,5% (C-SORO).

**Tabela 3.** Composição dos tratamentos dos grupos experimentais.

<b>Tratamento</b>	<b>Composição do meio de incubação das células *</b>
FM-1-BSA	Albumina sérica bovina a 2,5% FM-DMSA a 0,03 mg/mL de ferro
FM-1-SORO	Soro de camundongo a 4,5% FM-DMSA a 0,03 mg/mL de ferro
FM-1-PRÉ-SORO	Soro de camundongo a 4,5% FM-DMSA a 0,03 mg/mL de ferro incubado por 1h com o soro de camundongo para posterior adição ao RPMI-1640
FM-1-SORO-PLL	Soro de camundongo a 4,5% Poli-L-lisina a 3,0 µg/mL FM-DMSA a 0,03 mg/mL de ferro
FM-2-BSA	Albumina sérica bovina a 1,5% FM-DMSA a 0,06 mg/mL de ferro
FM-2-SORO	Soro de camundongo a 4,5% FM-DMSA a 0,06 mg/mL de ferro
FM-2-PRÉ-SORO	Soro de camundongo a 4,5% FM-DMSA a 0,06 mg/mL de ferro incubado por 1h com o soro de camundongo para posterior adição ao RPMI-1640
FM-2-SORO-PLL	Soro de camundongo a 4,5% Poli-L-lisina a 3,0 µg/mL FM-DMSA a 0,06 mg/mL de ferro

(\*) Todos os meios de incubação contêm RPMI-1640 e antibiótico a 1%.

O aumento da internalização das nanopartículas por macrófagos pode ser obtido pela prévia incubação das mesmas com poli-L-lisina (PLL), sendo comumente utilizada como um controle positivo da internalização (MÜLLER et al., 2007). A adição de PLL aos tratamentos foi realizada da seguinte maneira: ao meio de cultura

com o dobro da concentração de FM-DMSA, adicionou-se PLL para obter-se uma concentração de 6,0 µg/mL. Essa solução foi mantida sob agitação por 60 minutos e, em seguida, adicionou-se o mesmo volume de meio de cultura. Assim obteve-se concentração de FM-DMSA igual à metade da original e concentração de PLL de 3,0 µg/mL (MÜLLER et al., 2007).

Os grupos experimentais FM-1-PRÉ-SORO e FM-2-PRÉ-SORO correspondem à incubação das nanopartículas com soro de camundongo por 60 minutos para a posterior adição dessa mistura ao meio de cultura RPMI-1640, alcançando a mesma concentração final de partículas e de soro de camundongo dos demais grupos experimentais. A incubação prévia do FM-DMSA com soro de camundongo foi necessária para garantir a opsonização das nanopartículas magnéticas.

#### ***4.9.2 Incubação dos macrófagos peritoneais com o FM-DMSA para avaliação da viabilidade celular***

Após o período de incubação dos leucócitos obtidos nas lavagens peritoneais, removeu-se o sobrenadante dos poços. Assim, permaneceram aderidos ao fundo da placa apenas as células de interesse, os macrófagos. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e, imediatamente, seguiu-se a incubação das células com seus respectivos tratamentos, de acordo com os grupos experimentais estabelecidos.

Os macrófagos foram, então, incubados por 2h30 sob agitação constante a temperatura ambiente, ou por 2h30 na estufa (a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>), ou por 12h na estufa. Os experimentos realizados em temperatura ambiente e sob agitação foram necessários para evitar que as nanopartículas magnéticas do FM-DMSA sedimentassem prejudicando a avaliação da internalização celular.

#### **4.9.3 Viabilidade Celular**

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio do MTT (MOSMANN, 1983). O ensaio do MTT consiste na metabolização do substrato 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) que ocorre apenas em células viáveis. O produto desse metabolismo (cristal de formazan) é dissolvido e forma uma solução de cor azulada. A absorbância dessa solução em 595 nm está correlacionada à viabilidade celular.

Após a incubação dos macrófagos peritoneais com os diferentes tratamentos, removeu-se o sobrenadante da cultura e acrescentou-se 150 µL de solução de MTT (1mg/mL) em meio de cultura RPMI-1640 completo em cada poço. Seguiu-se a incubação das células com o MTT por três horas a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a solução de MTT foi removida e 50 µL DMSO adicionado em cada poço. A absorbância da solução resultante foi analisada em espectrofotômetro Spectramax (Molecular Devices, EUA) a 595 nm. O experimento foi realizado em triplicata. Além disso, cada ensaio foi realizado duas vezes de forma independente.

#### **4.9.4 Incubação dos macrófagos alveolares e peritoneais com o FM-DMSA para a dosagem de ferro**

Após o período de incubação dos leucócitos obtidos nas lavagens bronco-alveolar e peritoneal, removeu-se o sobrenadante dos poços. Assim, permaneceram aderidos ao fundo da placa apenas as células de interesse, os macrófagos. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS e uma vez com meio RPMI-1640 acrescido de 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Imediatamente, seguiu-se a incubação das células com seus respectivos tratamentos, de acordo com os grupos experimentais estabelecidos no tópico 4.9.1. Os macrófagos foram, então, incubados por 2h em temperatura

ambiente, sob agitação constante. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para análises posteriores. Os macrófagos foram lavados quatro vezes com PBS. Em seguida, adicionou-se tripsina/EDTA a 25% incubando as células por 5 minutos, a  $37^{\circ}\text{C}$  em atmosfera umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ , para que elas se soltassem da superfície dos poços. Em seguida, adicionou-se aos poços meio RPMI-1640 completo para neutralização da ação da tripsina e seguiu-se a centrifugação da suspensão de células a  $400\times g$ , por 5 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Após a centrifugação os macrófagos foram lavados com PBS, centrifugados novamente nas mesmas condições anteriores e, então, ressuspensos em PBS. Em seguida, realizou-se a contagem das células em hemocítmetro de Neubauer conforme descrito no tópico 4.8. Após a contagem as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### **4.9.5 Determinação da concentração de ferro do FM-DMSA**

##### **4.9.5.1 Preparo dos padrões de FM-DMSA**

A amostra inicial de FM-DMSA foi diluída, sequencialmente, com água nanopura visando obter quinze concentrações de ferro, conforme pode ser observado na tabela 4.

**Tabela 4.** Concentrações de ferro utilizadas como padrões.

Padrões	Concentração de ferro (mg/mL)
1	$9,4 \times 10^{-2}$
2	$3,7 \times 10^{-2}$
3	$1,9 \times 10^{-2}$
4	$9,4 \times 10^{-3}$
5	$4,7 \times 10^{-3}$
6	$2,3 \times 10^{-3}$
7	$1,2 \times 10^{-3}$
8	$5,8 \times 10^{-4}$
9	$2,9 \times 10^{-4}$
10	$1,4 \times 10^{-4}$
11	$7,3 \times 10^{-5}$
12	$3,6 \times 10^{-5}$
13	$1,8 \times 10^{-5}$
14	$9,1 \times 10^{-6}$
15	$4,6 \times 10^{-6}$

#### 4.9.5.2 Dosagem de ferro do FM-DMSA

Para o ensaio de dosagem de ferro do FM-DMSA utilizou-se um reagente proveniente do kit Ferrozine da Labtest. O Ferrozine é um quelante de ferro II, ou seja, ele associa-se ao  $\text{Fe}^{+2}$  formando um complexo magenta que possui absorvância máxima a 562 nm. Como o FM-DMSA é um composto formado por  $\text{Fe}^{+3}$ , faz-se necessária a utilização de um agente redutor tal como o ácido ascórbico. A constante da taxa de complexação do  $\text{Fe}^{+3}$  pelo Ferrozine não é dependente da concentração inicial de Ferrozine. O excesso de Ferrozine assegura uma completa complexação de  $\text{Fe}^{+2}$  e dificulta o decréscimo do complexo magenta formado, mas pode aumentar o ruído (SARRADIN et al., 2005). Assim, para

assegurar uma boa detecção o coeficiente de correlação da curva padrão ( $r^2$ ) deve ser maior do que 0,99. Levando esses fatos em consideração, foi necessário aperfeiçoar a dosagem de ferro para obter-se um alto coeficiente de correlação. Para tanto, inicialmente apenas os padrões foram dosados em triplicata, em três ensaios independentes. Após obtenção de um alto coeficiente de correlação, seguiu-se para os ensaios com as amostras de células (dados não mostrados). Para a realização dos ensaios, foram feitas algumas modificações no protocolo proposto pelo fabricante do kit de dosagem de ferro (Labtest Diagnóstica SA, BRA), com base em SARRADIN et al. (2005) e MÜLLER et al. (2007).

As amostras de células obtidas após os tratamentos foram diluídas até um volume final de 300  $\mu$ L com água nanopura. Em seguida, adicionou-se ácido clorídrico a 1,2 M, em 100  $\mu$ L de amostra, padrão e branco (apenas água nanopura), seguindo-se a incubação dos mesmos a 80°C, por 60 minutos. Após o período de incubação, adicionou-se acetato de amônio a 15%, ácido ascórbico a 4%, dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2,5% e ferrozine a 2,8 mM. Após a adição do quelante, as amostras, os padrões e o branco foram incubados a 37°C, por 10 minutos e seguiu-se uma centrifugação por cinco minutos a 1000xg. Após a centrifugação, 200  $\mu$ L foram adicionados à placa de 96 poços, em triplicata, e a absorbância medida em espectrofotômetro (Spectramax da Molecular Devices, EUA) a 560 nm.

A concentração final de ferro dosada para os padrões após o ensaio pode ser observada na tabela 5.

**Tabela 5.** Concentração final dos padrões de ferro.

<b>Padrões</b>	<b>Concentração de ferro (mg/mL)</b>
1	$9,4 \times 10^{-3}$
2	$3,7 \times 10^{-3}$
3	$1,9 \times 10^{-3}$
4	$9,4 \times 10^{-4}$
5	$4,7 \times 10^{-4}$
6	$2,3 \times 10^{-4}$
7	$1,2 \times 10^{-4}$
8	$5,8 \times 10^{-5}$
9	$2,9 \times 10^{-5}$
10	$1,4 \times 10^{-5}$
11	$7,3 \times 10^{-6}$
12	$3,6 \times 10^{-6}$
13	$1,8 \times 10^{-6}$
14	$9,1 \times 10^{-7}$
15	$4,6 \times 10^{-7}$

#### 4.10 Produção de citocinas

A produção de citocinas pelas células incubadas com o FM-DMSA foi avaliada para os grupos experimentais utilizando kits de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) da EBioscience. A dosagem foi realizada conforme o protocolo do fabricante para cada kit. As citocinas avaliadas foram IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . Para a realização da dosagem, utilizou-se o sobrenadante das células incubadas com FM-DMSA em soro de camundongo ou BSA na maior concentração de ferro (0,06 mg/mL) e seus respectivos controles. Para os ensaios, esse sobrenadante foi diluído três vezes com o diluente de ensaio fornecido nos kits.

#### 4.11 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância com o teste de Tukey a um nível de significância fixado de  $p < 0,05$  (5%) ou pelo teste t de Student não-pareado, para comparar a média entre dois grupos independentes, utilizando-se o programa estatístico *Graphpad Prism 5*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

## **5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

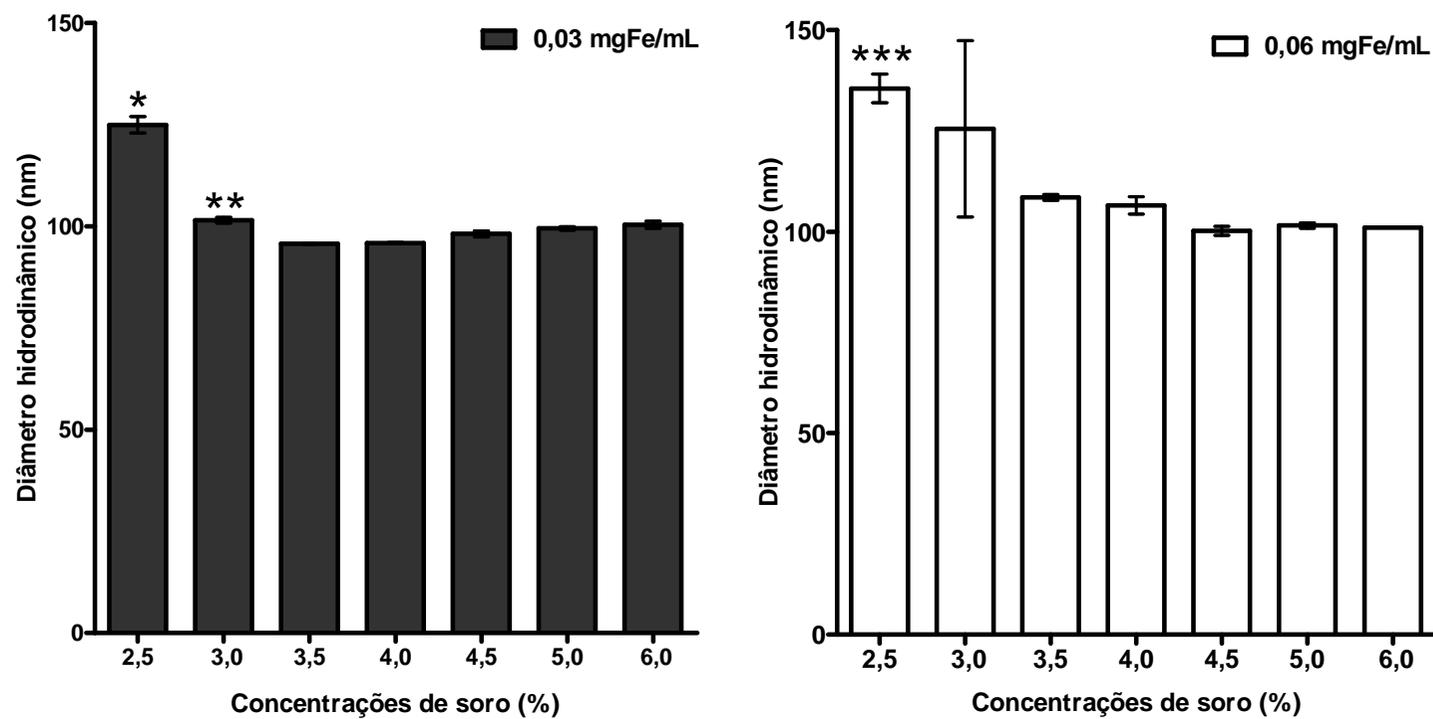
### 5.1 Diâmetro hidrodinâmico

A obtenção do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em diferentes concentrações de BSA ou soro de camundongo permitiu a determinação das concentrações em que o diâmetro hidrodinâmico mais se aproxima daquele da solução original de FM-DMSA, na qual as nanopartículas encontram-se dispersas em solução aquosa com NaCl a 0,9%. Inicialmente, analisou-se os diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas em soluções com soro de camundongo e com BSA (figura 5 e 6, respectivamente) e, em seguida, os diâmetros obtidos para essas soluções foram comparados com o diâmetro médio encontrado para a solução original de FM-DMSA (figura 7).

O padrão de diminuição do diâmetro hidrodinâmico com o aumento da concentração de proteínas pode ser observado tanto para as soluções com soro de camundongo (figura 5) quanto para aquelas com BSA (figura 6).

A figura 5 representa o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas do FM-DMSA nas soluções com soro de camundongo. A concentração de 2,5% apresenta um aumento no valor de diâmetro hidrodinâmico na concentração de ferro de 0,03 mg/mL de, no mínimo, 23% em relação às concentrações de soro de camundongo de 3,0% a 6,0%.

Para a solução de 0,03 mgFe/mL também há diferença significativa entre a concentração de soro de camundongo de 3,0% em relação às de 3,5% e 4,0%. Para a concentração de 0,06 mgFe/mL há diferença significativa entre a concentração de 2,5% em relação às concentrações de 4,5% a 6%.

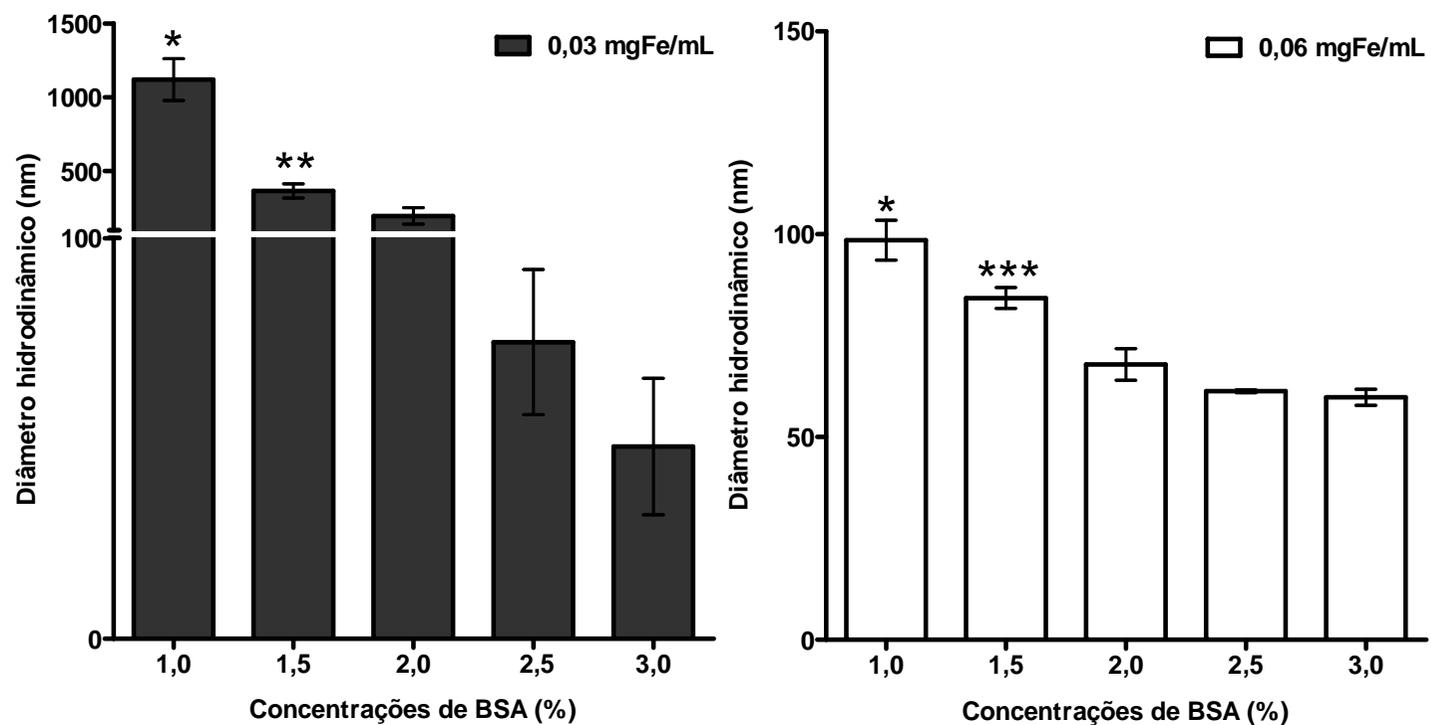


**Figura 5.** Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de maguemita dispersas em meio RPMI-1640 para concentrações crescentes de soro em concentrações de ferro de 0,03 mg/mL (barras cinzas) e 0,06 mg/mL (barras brancas). \* $p \leq 0,05$  em relação às concentrações de soro de 3,0% a 6,0%; \*\* $p \leq 0,05$  em relação às concentrações de 3,5% e 4,0% e \*\*\* $p \leq 0,05$  em relação às concentrações de 4,5% a 6%.

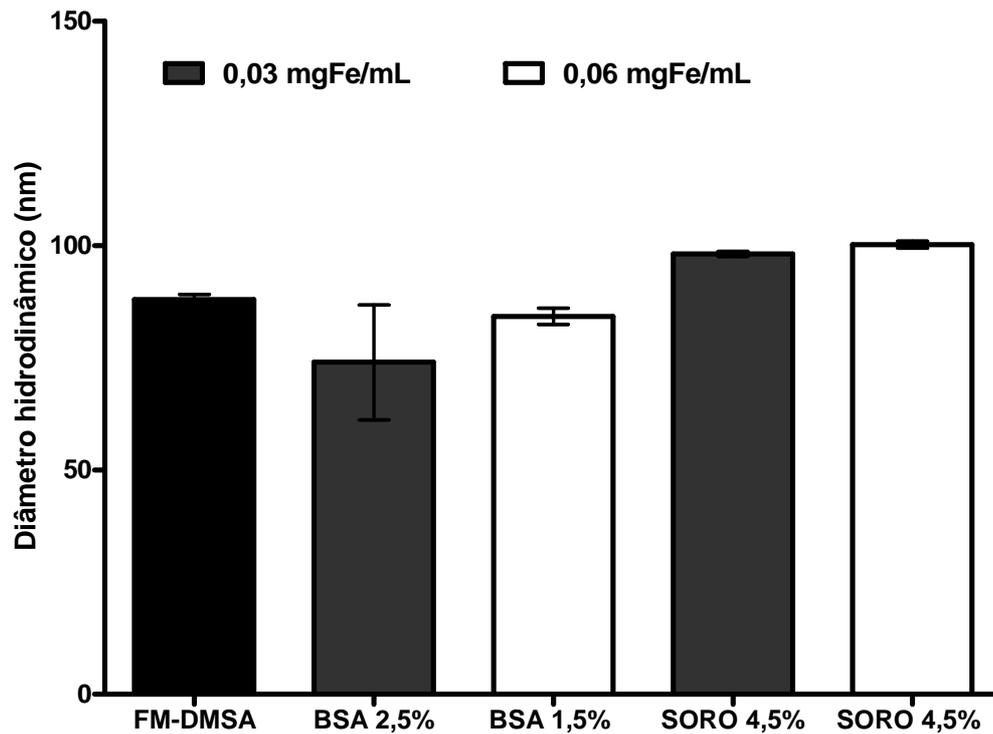
Na figura 6, correspondente ao diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas para as soluções com BSA, a concentração de 1,0% apresenta valor de diâmetro hidrodinâmico, pelo menos, 3 vezes maior dos que as demais concentrações de BSA para 0,03 mgFe/mL e apenas 1,2 vezes maior do que as demais concentrações de BSA para 0,06 mgFe/mL.

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas do FM-DMSA para a concentração de 1,5% de BSA também é significativamente maior em relação aos diâmetros hidrodinâmicos nas concentrações de 2,5% e 3,0% para a solução com 0,03 mgFe/mL. Já para a solução com 0,06 mgFe/mL o diâmetro hidrodinâmico na solução com 1,5% de BSA é significativamente maior em relação aos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas nas concentrações de 2,0% a 3,0%.

Com esses resultados do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas do FM-DMSA, foram selecionadas, para as duas concentrações de ferro, a concentração de soro de 4,5%, na qual o diâmetro hidrodinâmico não foi significativamente diferente do diâmetro das nanopartículas na solução original ( $88,0 \text{ nm} \pm 1,1$ ). As concentrações de BSA escolhidas foram de 2,5% e 1,5% para as concentrações de 0,03 mg/mL e 0,06 mg/mL, respectivamente (figura 7).



**Figura 6.** Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de maguemitas dispersas em meio RPMI-1640 para concentrações crescentes de albumina sérica bovina (BSA) em concentrações de ferro de 0,03 mg/mL (barras cinzas) e 0,06 mg/mL (barras brancas). \* $p \leq 0,05$  em relação às concentrações de BSA de 1,5% a 3,0%; \*\* $p \leq 0,05$  em relação às concentrações de 2,5% e 3,0% e \*\*\* $p \leq 0,05$  em relação às concentrações de 2,0% a 3,0%.



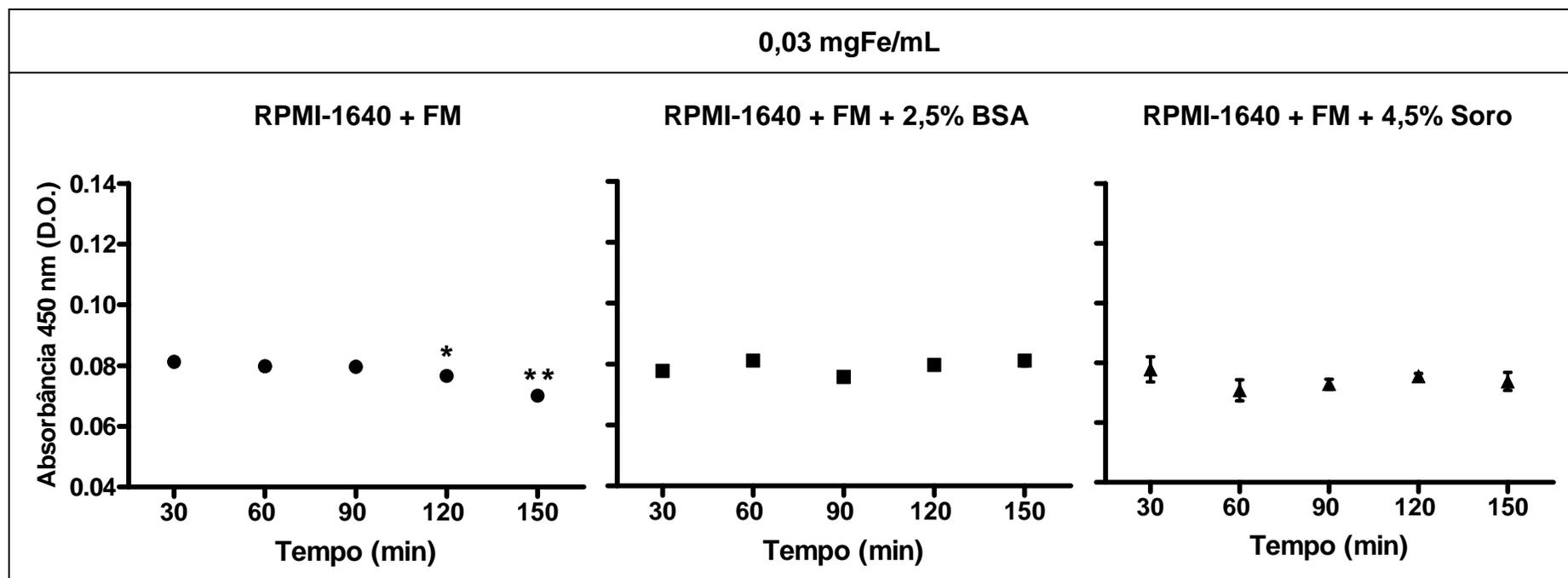
**Figura 7.** Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de magemita do FM-DMSA na solução original (barra preta), das nanopartículas em meio RPMI-1640 com 2,5% de BSA (BSA 2,5%), com 1,5% de BSA (BSA 1,5%) e das nanopartículas em meio RPMI com 4,5% de soro (SORO 4,5%). As barras cinza correspondem à concentração de ferro de 0,03 mg/mL e a barra branca à de 0,06 mg/mL.

## 5.2 Sedimentação das nanopartículas

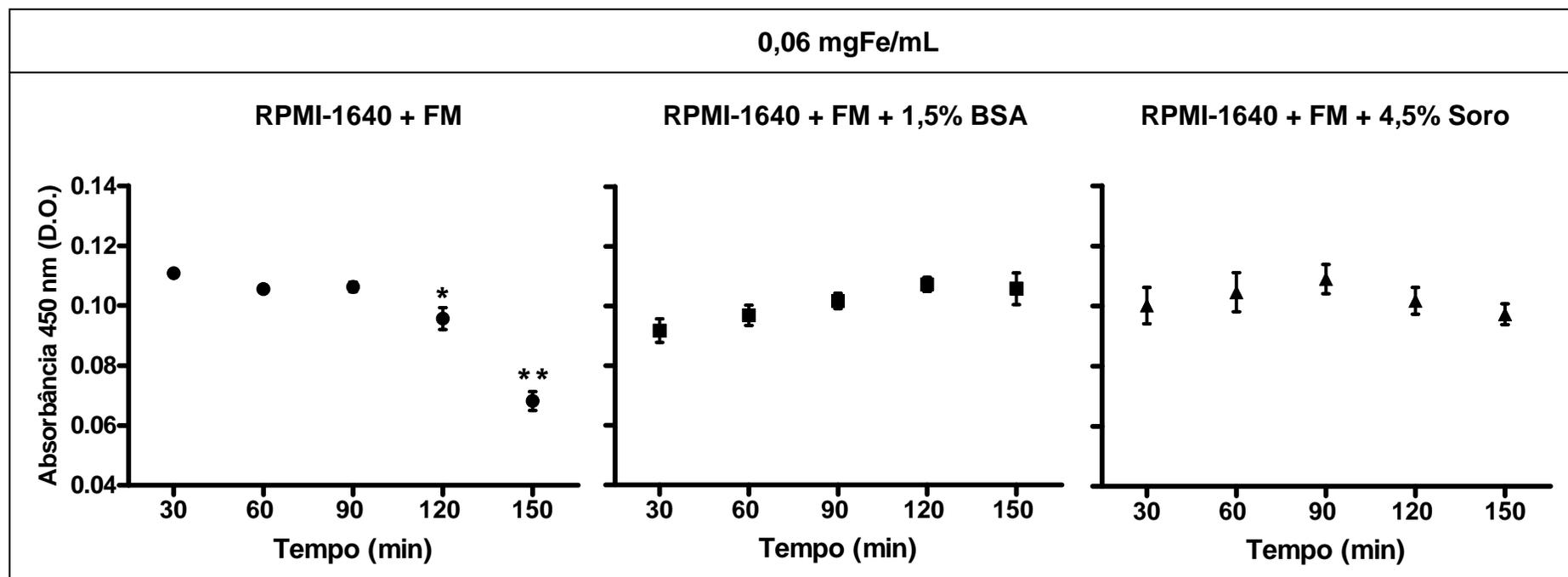
Neste ensaio observou-se que as nanopartículas permaneceram em suspensão durante todos os tempos de avaliação (30 min, 60 min, 90 min, 120 min e 150 min), para as concentrações com 1,5% e 2,5% de BSA e com 4,5% de soro do camundongo, em meio de cultura RPMI-1640. A ausência de sedimentação é representada pela absorbância constante, sem diferença significativa entre os tempos avaliados, para as concentrações de 0,03 mgFe/mL e 0,06 mgFe/mL (figura 8 e 9, respectivamente). Por outro lado, as nanopartículas em meio RPMI-1640 puro sedimentaram, ao longo dos tempos avaliados, para as duas concentrações de ferro.

Na figura 8, que representa a sedimentação das nanopartículas do FM-DMSA na concentração de 0,03 mgFe/mL, a absorbância da solução com RPMI-1640 puro é significativamente maior nos tempos de 30 a 120 min, quando comparados ao tempo de 150 min, ocorrendo uma redução de 9%.

Na figura 9, que representa a sedimentação das nanopartículas do FM-DMSA na concentração de 0,06 mgFe/mL, a absorbância da solução com RPMI-1640 puro é significativamente maior nos tempos de 30 a 120 min, quando comparados ao tempo de 150 min, ocorrendo uma redução de 40% a 62%.



**Figura 8.** Ensaio de sedimentação das nanopartículas do FM-DMSA dispersas em RPMI-1640 puro (círculo), RPMI-1640 com 2,5% de BSA (quadrado) e RPMI-1640 com 4,5% de soro de camundongo (triângulo), para a concentração de ferro de 0,03 mg/mL. \* $p < 0,05$  em relação aos tempos de 30 a 90 min, \*\* $p < 0,05$  em relação ao tempo de 30 a 120 min.

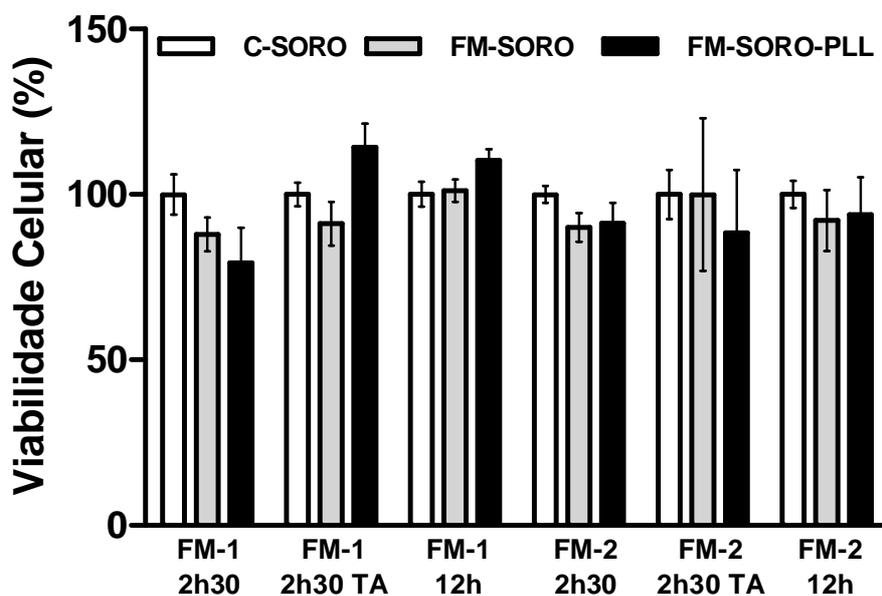


**Figura 9.** Ensaio de sedimentação das nanopartículas do FM-DMSA dispersas em RPMI-1640 puro (círculo), RPMI-1640 com 1,5% de BSA (quadrado) e RPMI-1640 com 4,5% de soro de camundongo (triângulo), para a concentração de ferro de 0,06 mg/mL. \* $p < 0,05$  em relação aos tempos de 30 a 90 min, \*\* $p < 0,05$  em relação ao tempo de 30 a 120 min.

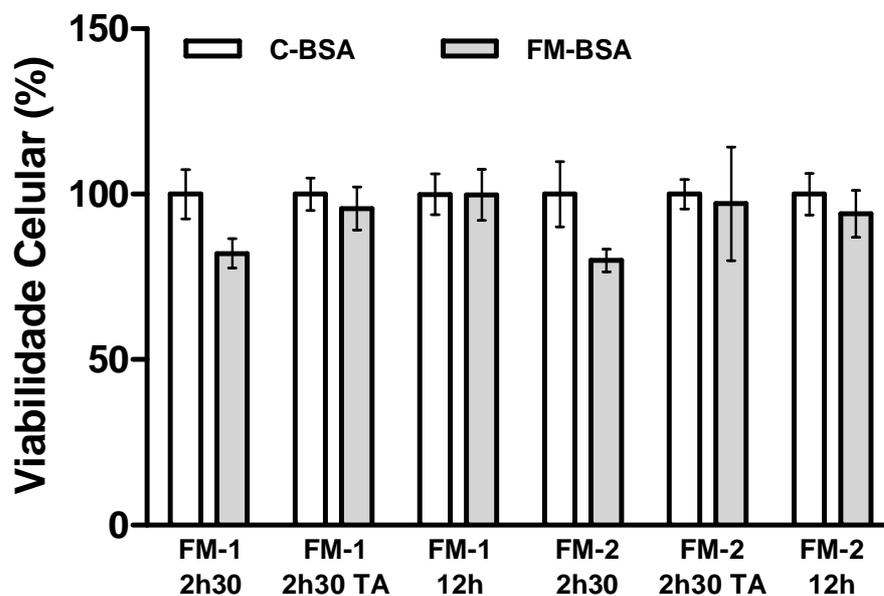
### 5.3. Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular, em macrófagos peritoneais, utilizando o reagente MTT proporcionou a determinação da citotoxicidade do FM-DMSA nos grupos experimentais avaliados, nos intervalos de 2h30min em temperatura ambiente sob agitação constante, de 2h30min e 12h em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Os valores obtidos podem ser observados na figura 10 e 11 para as células incubadas com soro de camundongo e BSA, respectivamente.

Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados tanto nas soluções com soro de camundongo quanto nas soluções com BSA, com todos os grupos experimentais apresentando viabilidades superiores a 79,3 ± 10,6% (menor viabilidade observada para o grupo FM-SORO-PLL, na concentração de 0,03 mgFe/mL e incubação de 2h30).



**Figura 10.** Porcentagem, em relação ao respectivo controle, de macrófagos peritoneais viáveis, em meio RPMI-1640 suplementado com 4,5% de soro de camundongo, na concentração de ferro de 0,03mg/mL (FM-1) e 0,06mg/mL (FM-2), por 2h30 a temperatura ambiente (TA), sob agitação e por 2h30 e 12h em atmosférica umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. C-SORO corresponde ao grupo controle, no qual as células não foram incubadas com FM-DMSA; FM-SORO corresponde ao grupo em que os macrófagos peritoneais foram incubados, na presença de soro, com o FM-DMSA; FM-SORO-PLL corresponde ao grupo em que as nanopartículas do FM-DMSA foram previamente incubadas com poli-L-lisina.

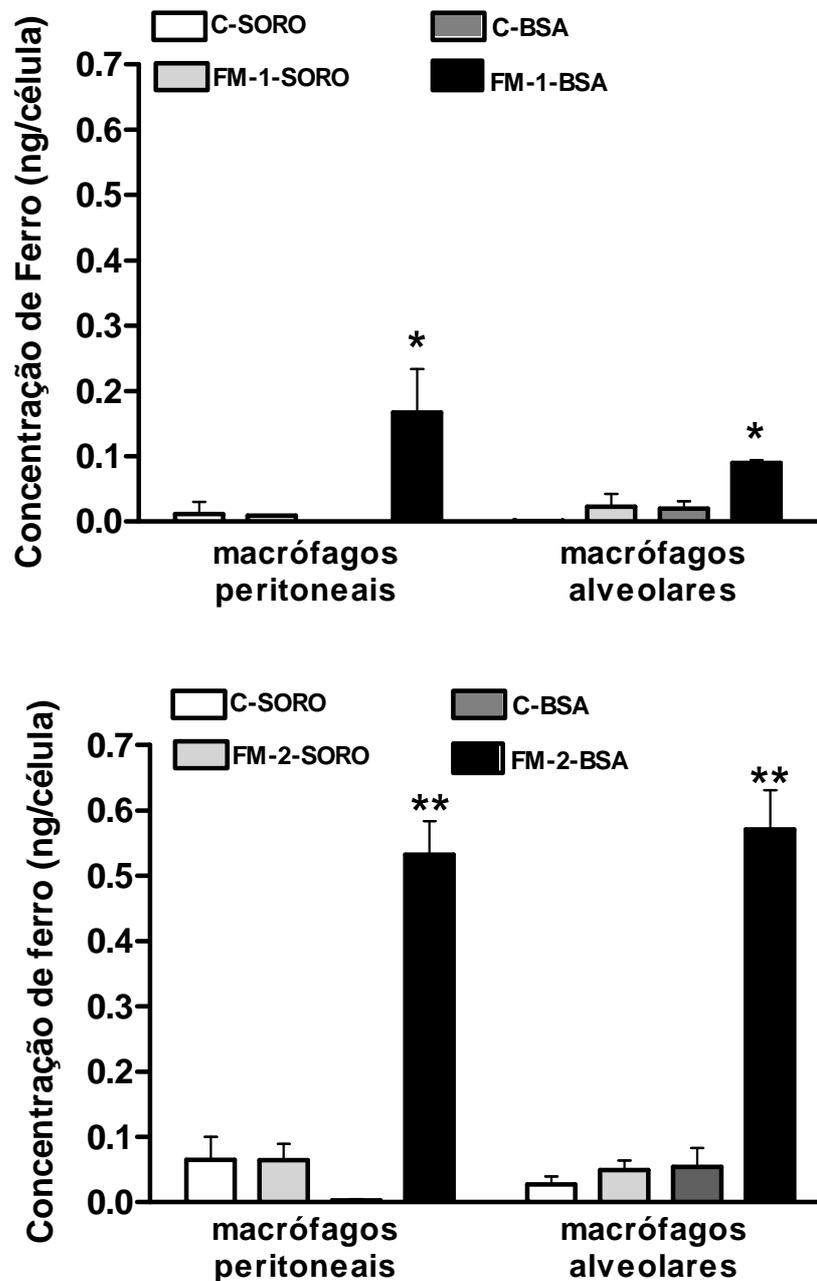


**Figura 11.** Porcentagem, em relação ao respectivo controle, de macrófagos peritoneais viáveis, em meio RPMI-1640 suplementado com 1,5% ou 2,5% de albumina sérica bovina (BSA), na concentração de ferro de 0,03 mg/mL (FM-1) e 0,06mg/mL (FM-2), por 2h30 a temperatura ambiente (TA), sob agitação e por 2h30 e 12h em atmosférica umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. C-BSA corresponde ao grupo controle, no qual as células não foram incubadas com FM-DMSA; FM-BSA corresponde ao grupo em que os macrófagos peritoneais foram incubados, na presença de BSA, com o FM-DMSA.

#### 5.4. Internalização do FM-DMSA por macrófagos alveolares e peritoneais

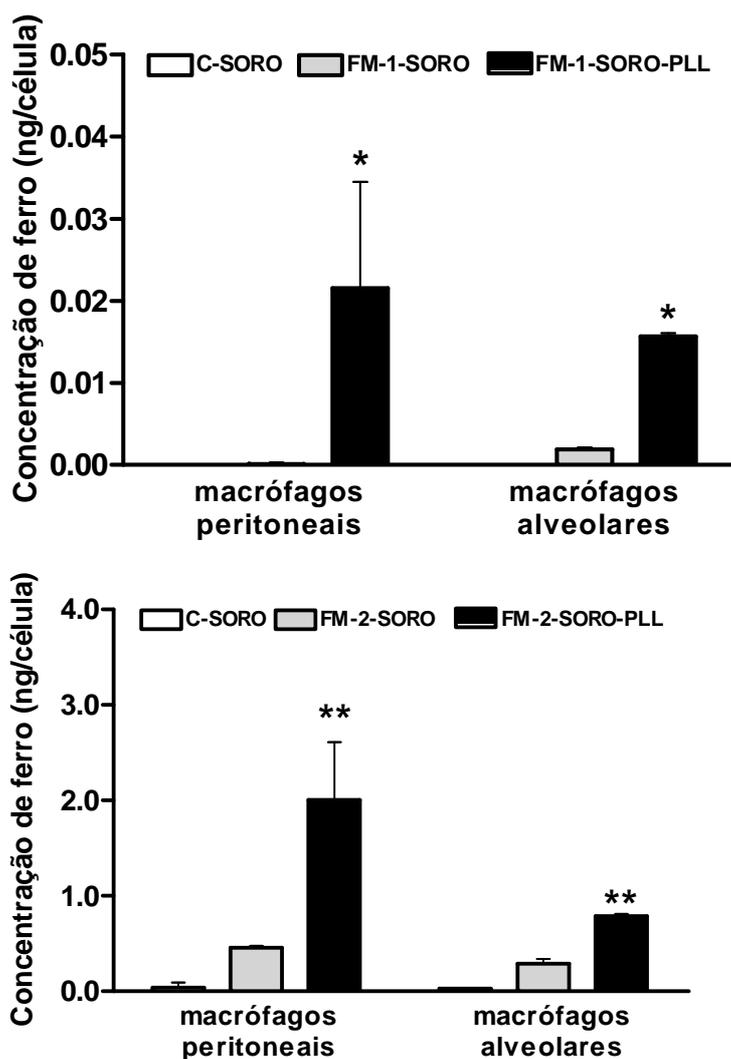
A incubação dos macrófagos alveolares e peritoneais com FM-DMSA, seguida pela dosagem do ferro nas células permitiu a avaliação da internalização das nanopartículas magnéticas por esses dois tipos celulares. Conforme pode ser observado na figura 12, para os dois tipos celulares avaliados, na presença de soro de camundongo, tanto para a concentração de 0,03 mgFe/mL quanto para a de 0,06 mgFe/mL, não houve diferença significativa na concentração de ferro (ng/célula).

Embora a incubação com soro não tenha aumentado a internalização do FM-DMSA, observou-se que na presença de BSA ela foi significativamente maior quando comparada ao controle de BSA para macrófagos alveolares e peritoneais para as duas concentrações de ferro avaliadas (figura 12).



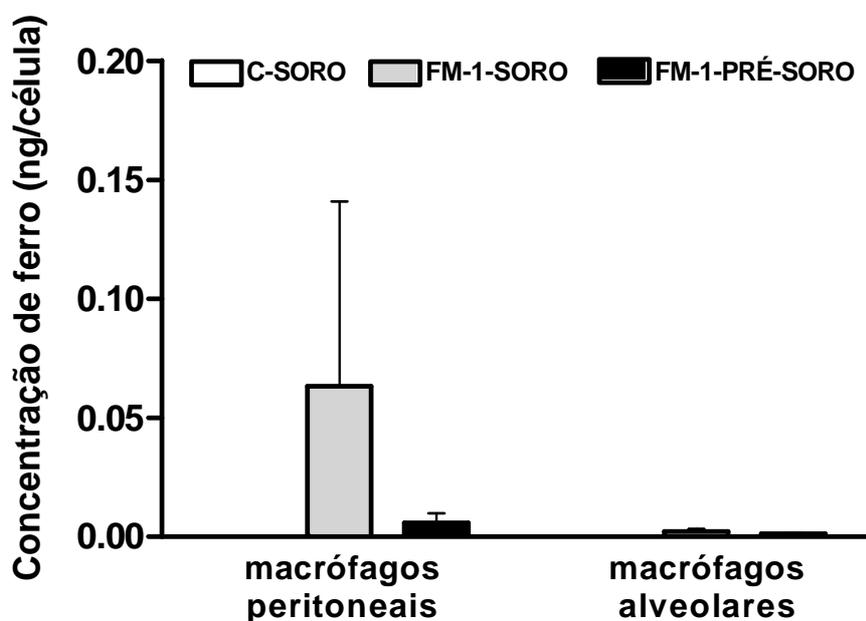
**Figura 12.** Concentração intracelular de ferro em macrófagos peritoneais e alveolares incubados com nanopartículas magnéticas para os diferentes grupos experimentais avaliados: C-BSA (controle com meio RPMI-1640 e BSA), FM-1-BSA (meio RPMI-1640, BSA e FM-DMSA na concentração de 0,03 mgFe/mL), FM-2-BSA (meio RPMI-1640, BSA e FM-DMSA na concentração de 0,06 mgFe/mL), C-SORO (controle com meio RPMI-1640 e soro de camundongo), FM-1-SORO (meio RPMI-1640, soro de camundongo e FM-DMSA na concentração de 0,03 mgFe/mL), FM-2-SORO (meio RPMI-1640, soro de camundongo e FM-DMSA na concentração de 0,06 mgFe/mL). \* $p < 0,05$  em relação a SORO, FM-1-SORO e BSA. \*\* $p < 0,05$  em relação a C-SORO, FM-2-SORO e C-BSA.

Como esperado, ocorreu maior internalização das nanopartículas para os macrófagos incubados com soro de camundongo e poli-L-lisina (PLL) em relação aos controles e grupos com FM-DMSA sem PLL, nas duas concentrações de ferro avaliadas, uma vez que a PLL é descrita como um estimulador da internalização de nanopartículas por macrófagos (figura 13).

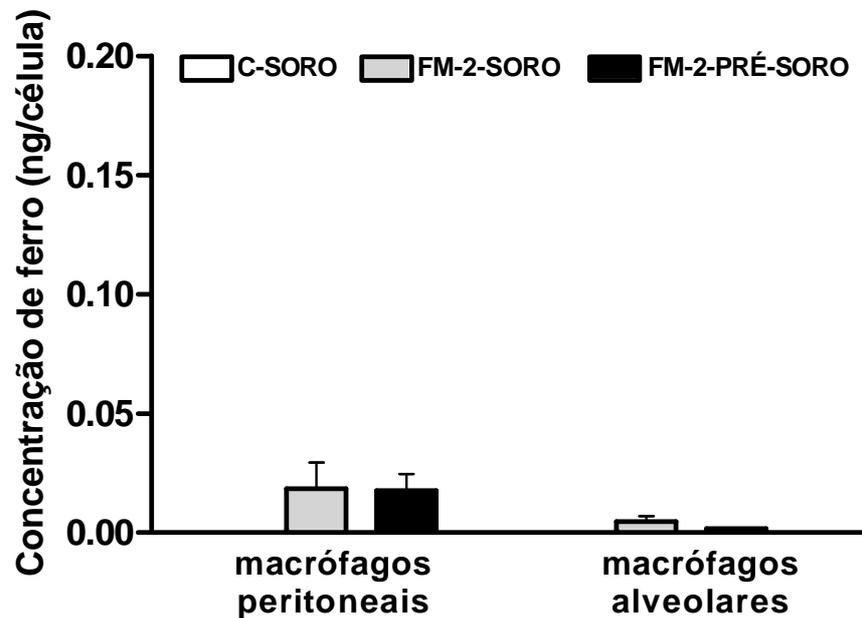


**Figura 13.** Concentração intracelular de ferro em macrófagos peritoneais e alveolares incubados com nanopartículas magnéticas para os diferentes grupos experimentais avaliados: C-SORO (controle com meio RPMI-1640 e soro de camundongo), FM-1-SORO (meio RPMI-1640, soro de camundongo e FM-DMSA a 0,03 mgFe/mL), FM-2-SORO (meio RPMI-1640, soro de camundongo e FM-DMSA a 0,06 mgFe/mL de ferro), FM-1-SORO-PLL (meio RPMI-1640, soro de camundongo e FM-DMSA a 0,03 mgFe/mL com PLL), FM-2-SORO-PLL (meio RPMI-1640, soro de camundongo e FM-DMSA a 0,06 mgFe/mL com PLL). \* $p < 0,05$  em relação a C-SORO e FM-1-SORO e \*\* $p < 0,05$  em relação a C-SORO e FM-2-SORO.

O efeito das nanopartículas incubadas com soro por 60 min antes da adição ao meio de cultura também foi avaliado. Conforme pode ser observado nas figuras 14 e 15, para esses ensaios de internalização não foi possível observar diferenças significativas na concentração intracelular de ferro entre os grupos com FM-DMSA incubado previamente com soro de camundongo (FM-2-PRÉ-SORO) em relação ao grupo controle (C-SORO) e ao grupo em que as nanopartículas e o soro de camundongo foram imediatamente incubados com os macrófagos (FM-2-SORO).



**Figura 14.** Concentração intracelular de ferro em macrófagos peritoneais e alveolares incubados com nanopartículas magnéticas para os diferentes grupos experimentais avaliados: C-SORO (controle com meio RPMI-1640 e soro de camundongo), FM-1-SORO (meio RPMI-1640, soro de camundongo e FM-DMSA na concentração de 0,03 mg/mL de ferro), FM-1-PRÉ-SORO (meio RPMI-1640, FM-DMSA na concentração de 0,03 mg/mL de ferro previamente incubadas com soro de camundongo).



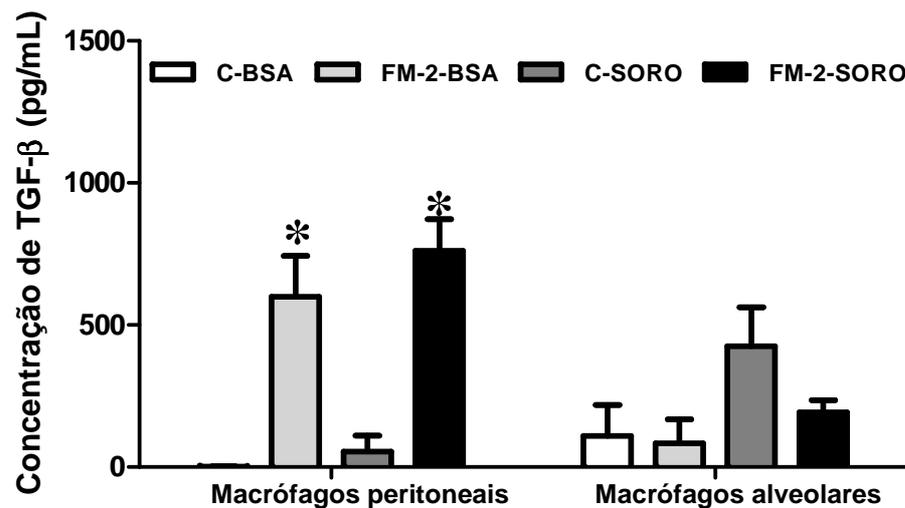
**Figura 15.** Concentração intracelular de ferro em macrófagos peritoneais e alveolares incubados com nanopartículas magnéticas para os diferentes grupos experimentais avaliados: C-SORO (controle com meio RPMI-1640 e soro de camundongo), FM-2-SORO (meio RPMI-1640, soro de camundongo e FM-DMSA na concentração de 0,06 mg/mL de ferro), FM-2-PRÉ-SORO (meio RPMI-1640, FM-DMSA na concentração de 0,06 mg/mL de ferro previamente incubadas com soro de camundongo).

### 5.5. Produção de citocinas

A produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  pelos macrófagos alveolares e peritoneais foi avaliada apenas para os grupos incubados com soro de camundongo ou BSA na concentração de ferro de 0,06 mg/mL por 2h. O padrão de produção das citocinas indicou, principalmente, uma maior expressão de IL-10 e TGF- $\beta$ .

### 5.5.1 Produção de TGF- $\beta$

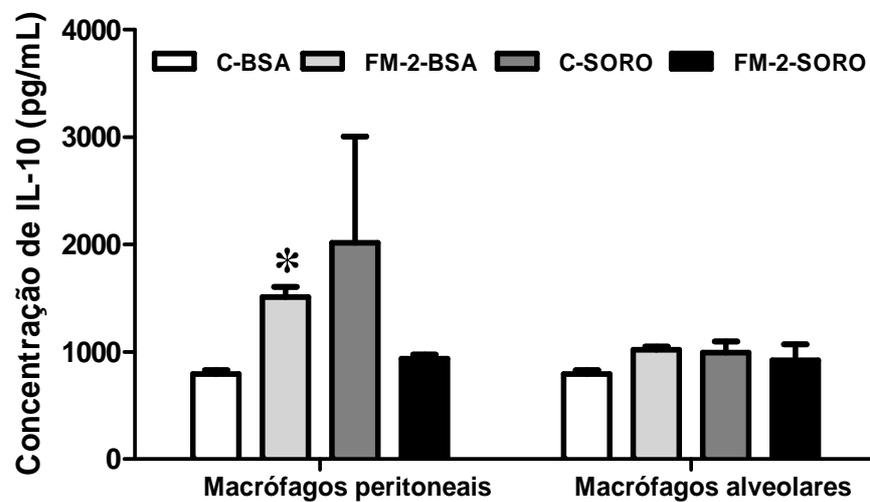
A figura 16 mostra a produção de TGF- $\beta$ , que aumenta de forma significativa com a presença das nanopartículas, tanto para os macrófagos peritoneais incubados com BSA e FM-DMSA (aumento de 400 vezes) como para os incubados com soro de camundongo e FM-DMSA (aumento de 14 vezes), quando comparados aos seus respectivos controles. Para os macrófagos alveolares não se observou diferença significativa entre os grupos avaliados.



**Figura 16.** Produção de TGF- $\beta$  por macrófagos alveolares e peritoneais incubados com FM-DMSA na concentração de 0,06 mg/mL (FM-2), na presença de soro de camundongo (SORO) ou albumina sérica bovina (BSA) e por seus respectivos controles (C-SORO e C-BSA). \* $p < 0,05$  em relação a C-SORO e C-BSA.

### 5.5.2 Produção de IL-10

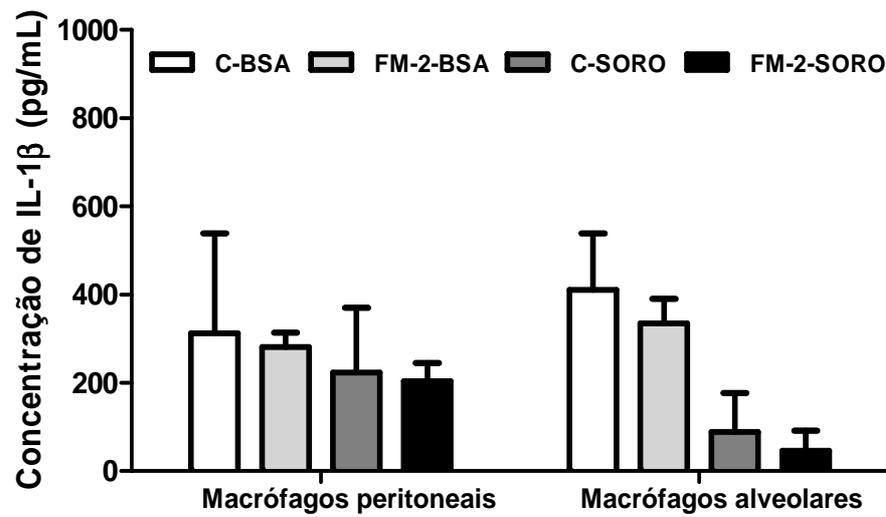
Na figura 17 observa-se o aumento significativo da produção de IL-10 para os macrófagos peritoneais incubados com FM-DMSA na presença de BSA (aumento de 2 vezes) em relação ao grupo controle C-BSA. Para os macrófagos alveolares não houve diferença significativa entre os grupos avaliados.



**Figura 17.** Produção de IL-10 por macrófagos alveolares e peritoneais incubados com FM-DMSA na concentração de 0,06mg/mL (FM-2), na presença de soro de camundongo (SORO) ou albumina sérica bovina (BSA) e por seus respectivos controles (C-SORO e C-BSA). \* $p < 0,05$  em relação a C-BSA.

### 5.5.3 Produção de IL-1 $\beta$

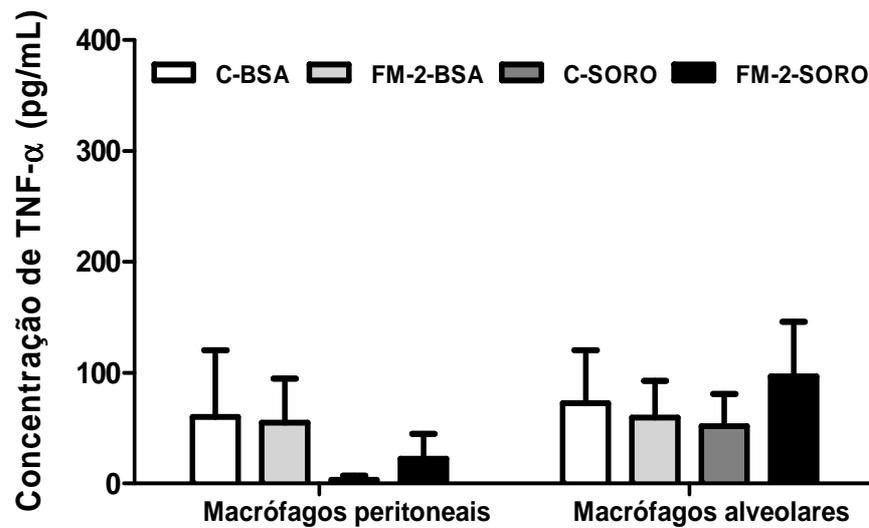
Na figura 18, não há diferença significativa na produção de IL-1 $\beta$  entre os grupos experimentais avaliados.



**Figura 18.** Produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos alveolares e peritoneais incubados com FM-DMSA na concentração de 0,06mg/mL (FM-2), na presença de soro de camundongo (SORO) ou albumina sérica bovina (BSA) e por seus respectivos controles (C-SORO e C-BSA).

#### 5.5.4 Produção de TNF- $\alpha$

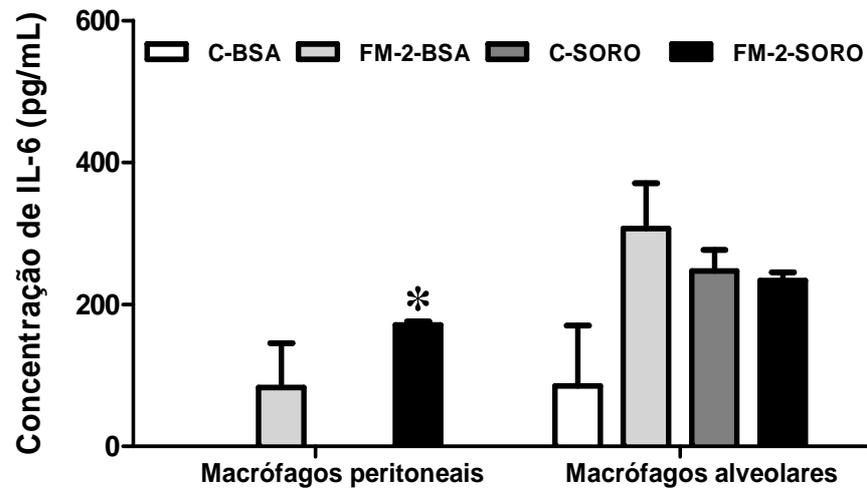
Na figura 19, observa-se que não há diferença significativa na produção de TNF- $\alpha$  entre os grupos avaliados.



**Figura 19.** Produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos alveolares e peritoneais incubados com FM-DMSA na concentração de 0,06 mg/mL (FM-2), na presença de soro de camundongo (SORO) ou albumina sérica bovina (BSA) e por seus respectivos controles (C-SORO e C-BSA).

### 5.5.5 Produção de IL-6

Na figura 20, observa-se que ocorreu um aumento significativo na produção de IL-6 pelos macrófagos peritoneais no grupo FM-2-SORO ( $170,63 \pm 4,88$  pg/mL) em comparação ao grupo C-SORO. Entre os demais grupos experimentais não houve diferença significativa.



**Figura 20.** Produção de IL-6 por macrófagos alveolares e peritoneais incubados com FM-DMSA na concentração de 0,06mg/mL (FM-2), na presença de soro de camundongo (SORO) ou albumina sérica bovina (BSA) e por seus respectivos controles (C-SORO e C-BSA). \* $p < 0,05$  em relação a C-SORO.

## **6 DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

O tamanho primário, a carga, a forma, a concentração, o estado de aglomeração, a superfície química e a área de superfície são características que afetam direta ou indiretamente a toxicidade e a internalização das nanopartículas. Por isso tanta divergência pode ser observada nos estudos de nanopartículas, inclusive entre aquelas com características semelhantes. Além disso, o meio de dispersão das nanopartículas exerce importante influência nessas características, especialmente no estado de aglomeração. Sendo assim, a dispersão de cada amostra de nanopartícula deve ser determinada empiricamente e os resultados não devem ser extrapolados para amostras de diferentes origens (ALEXIS et al., 2008; ALLOUNI et al., 2009; BUFORD et al., 2007; DENG et al., 2009).

Diante das variações que podem prejudicar as conclusões sobre os efeitos biológicos das nanopartículas, tornou-se necessário verificar a estabilização do FM-DMSA nas dispersões em meio de cultura RPMI-1640, antes de utilizá-las para os estudos *in vitro*.

O RPMI-1640 é um meio de cultura que provoca alta aglomeração de nanopartículas, levando a um acentuado aumento do diâmetro hidrodinâmico. Isso ocorre devido à complexidade do meio, composto por sais, aminoácidos e vitaminas (ALLOUNI et al., 2009). No presente estudo, observou-se que em RPMI-1640 puro ocorre alta aglomeração das nanopartículas, que assumem um alto diâmetro hidrodinâmico médio. Porém o aumento da concentração de soro de camundongo ou de albumina nas soluções leva a uma progressiva redução nesse diâmetro (figuras 5 e 6).

A obtenção do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em diferentes concentrações de BSA e soro de camundongo permitiu a determinação das concentrações em que o diâmetro hidrodinâmico mais se aproxima daquele da solução original de FM-DMSA, onde as nanopartículas de maguema recobertas com DMSA encontram-se dispersas em solução aquosa com NaCl a 0,9%. Assim, os resultados mostraram que as concentrações de albumina a 2,5% e 1,5% e a concentração de soro a 4,5% podem ser utilizadas para a estabilização das nanopartículas do FM-DMSA em meio de cultura RPMI-1640 (figura 7), evitando a formação de aglomerados e subsequente sedimentação das mesmas. Em outras

palavras, favorecendo o aumento da estabilidade das nanopartículas utilizadas (figura 5 e 6).

Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos que analisaram a estabilidade de nanopartículas magnéticas de maguemita recobertas com DMSA, pela avaliação do diâmetro hidrodinâmico e sedimentação, as quais se tornavam instáveis ao serem adicionadas a meio de cultura RPMI-1640. Porém, com a adição de soro fetal de cabra ocorria a manutenção da estabilidade das mesmas (CHEN et al., 2008a; CHEN et al. 2008b). Embora a adição de soro fetal de cabra seja capaz de estabilizar essas nanopartículas, ele também é responsável por uma maior internalização das mesmas, fato não observado para o soro de camundongo no presente estudo (CHEN et al., 2008b).

Outros estudos têm demonstrado a estabilidade das nanopartículas de diferentes composições pela redução do estado de aglomeração a partir da utilização de proteínas plasmáticas, pela adição de soro fetal bovino e soro fetal de cabra e também pela adição de albumina sérica bovina e albumina sérica humana a meios de dispersão, tais como RPMI-1640, solução de NaCl a 0,9% e PBS (ALLOUNI et al., 2009; BIHARI et al., 2008; BUFORD et al., 2007; LIM et al., 2009).

Embora o aumento da concentração de nanopartículas de ZnO, TiO<sub>2</sub>, e SiO<sub>2</sub> em soluções com ou sem proteínas acarrete maior aglomeração (ALLOUNI et al., 2009; DENG et al., 2009), os resultados do presente estudo mostram que o aumento da concentração de FM-DMSA não aumentou a aglomeração das nanopartículas magnéticas, requerendo inclusive uma menor quantidade de BSA para redução do diâmetro hidrodinâmico. Na concentração de 0,06 mgFe/mL, 1,5% de albumina é capaz de estabilizar as nanopartículas; já para 0,03 mgFe/mL é necessária a concentração de 2,5% (figura 6). Esses resultados podem ser explicados pela variação de pH das soluções avaliadas na presença de FM-DMSA. Soluções de meio RPMI-1640 com 1,5% de BSA foram preparadas com pH de 7,4. Entretanto, a adição de FM-DMSA resultou em um aumento do pH para 7,5 na concentração de 0,03 mgFe/mL e para 7,6 na concentração de 0,06 mgFe/mL (dados não mostrados). Portanto, a menor aglomeração para a concentração mais alta de ferro, em soluções com mesmas concentrações de BSA, pode ocorrer devido ao aumento da força iônica do meio (conforme observado na medição de pH), pois a maior quantidade de íons em solução pode resultar em uma dupla camada elétrica mais fina ao redor das partículas que assumem menores valores de diâmetro

hidrodinâmico. Assim, com uma menor concentração de albumina é possível obter um diâmetro hidrodinâmico menor para as nanopartículas na concentração mais alta de FM-DMSA. Por outro lado, concentrações mais altas de albumina são necessárias para reduzir o diâmetro hidrodinâmico nas soluções com FM-DMSA com menor concentração (XU, 1998).

A ausência de aglomeração das nanopartículas é importante para reduzir a internalização e conseqüentemente os seus efeitos tóxicos às células. A internalização das nanopartículas administradas intravenosamente ocorre, principalmente, pelo sistema mononuclear fagocitário. Estudos têm demonstrado que a internalização por macrófagos e monócitos pode ser dependente da opsonização das nanopartículas por proteínas plasmáticas. No geral, partículas sem cobertura apresentam intensa opsonização e, conseqüentemente, a fagocitose das mesmas é alta. Contudo, uma vez recobertas, essa opsonização é reduzida, bem como a internalização. Para a redução da internalização, a cobertura utilizada deve ser apropriada, sendo por isso essencial avaliar individualmente cada tipo de nanopartícula para entender sua ação no organismo (DOBROVOSLKAIA et al., 2008; LIN et al., 2010).

Em geral, as principais proteínas que interagem com as nanopartículas provocando sua fagocitose são as proteínas relacionadas à ativação do sistema complemento. Embora muitos artigos demonstrem ativação do sistema complemento e a opsonização, das nanopartículas de diversas composições (ABE et al., 2008; DENG et al., 2009; GAUCHER et al., 2009; HARASHIMA et al., 1997; LEROUX et al., 1995), no presente estudo, as nanopartículas incubadas com soro de camundongo não apresentaram maior internalização pelos macrófagos peritoneais e alveolares (Figuras 12 a 15), indicando a ausência da ativação do complemento. A ausência de internalização pelos macrófagos, observada para o FM-DMSA, é essencial para que as nanopartículas permaneçam longos períodos no sangue até alcançarem seus sítios específicos e para não causarem reações inflamatórias (BEDUNEAU et al., 2009; EHRENBURG et al., 2009; GAUCHER et al., 2008).

Coberturas hidrofílicas diminuem a ligação das proteínas às nanopartículas devido ao impedimento estérico ou eletrostático entre as moléculas da cobertura e as proteínas, enquanto que as hidrofóbicas aumentam (ALEXIS et al., 2008; DENG et al., 2009; GAUCHER et al., 2009; HE et al., 2010; SHENG, et al., 2009; ZHR et al., 2006). A cobertura de DMSA é uma cobertura com caráter hidrofílico e a

ausência da internalização pode, portanto, estar sendo beneficiada por essa característica (VALOIS et al., 2010).

O aumento da internalização das partículas incubadas com soro *in vitro*, também não foi observado por MÜLLER et al. (2007), que avaliaram a internalização de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas recobertas com dextran em cultura celular de monócitos e macrófagos derivados de monócitos humanos. Por outro lado, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro recobertas com diferentes coberturas foram avaliadas por MUHLENA et al. (2007), observando-se ativação do sistema complemento com a fagocitose por macrófagos sendo dependente do receptor de proteínas do complemento CR3.

Mesmo para aqueles estudos em que ocorre internalização na presença de soro, a análise dos resultados deve ser rigorosa, pois a incubação de partículas com células de determinada espécie, e soro de outra espécie provoca alterações no padrão de internalização. Isso porque a ativação do complemento e o padrão de opsonização das proteínas plasmáticas são espécie-dependentes (EHRENBERG et al., 2009; HARASHIMA et al., 1998). Assim, embora estudos anteriores do nosso grupo tenham demonstrado proeminente internalização do FM-DMSA, é importante ressaltar que estes estudos *in vitro* foram realizados com células de camundongo e soro fetal bovino (VALOIS et al., 2010).

O soro de camundongo não provocou a internalização do FM-DMSA, em contrapartida a albumina nas concentrações de 1,5% e 2,5% foi capaz de aumentar a internalização das nanopartículas do FM-DMSA. O aumento da internalização de nanopartículas na presença de albumina parece ser dependente do tipo de nanopartículas. Alguns estudos demonstram que a albumina não é capaz de promover a internalização das nanopartículas e aumentar sua captação pelo sistema retículo endotelial (OGAWARA et al., 1999; ZAHR et al., 2006), porém o aumento da internalização também já foi observado em outro estudo (BEDUNEAU et al., 2009). É possível que em alguns casos, a ligação da albumina às nanopartículas pode levar a mudanças conformacionais nas mesmas, resultando em reconhecimento por receptores de varredura (DUTTA et al., 2007).

Assim como prevenir a ativação da resposta imune pode ser interessante durante a utilização das nanopartículas para o direcionamento de fármacos a alvo específicos, o aumento da internalização em determinadas condições, por exemplo, na presença de albumina, também pode ser benéfica para determinadas aplicações

biomédicas, que necessitam de grande internalização das nanopartículas, como o diagnóstico por IRM (imagem de ressonância magnética). Atualmente, um grande desafio para o uso das nanopartículas magnéticas é carregar células com quantidades suficientes das partículas para o sucesso das terapias (LIN et al., 2010; PISANIC II et al., 2007). Portanto, as nanopartículas do FM-DMSA associadas à albumina podem permitir, por exemplo, a utilização de macrófagos como veículos do FM-DMSA a tecidos específicos.

As partículas de óxido de ferro são menos tóxicas que aquelas produzidas a partir de outros metais, porém as preocupações ainda são grandes acerca das aplicações biomédicas como IRM e direcionamento de fármacos a alvo específicos (SOENEN; CUYPER, 2009). A toxicidade das nanopartículas de ferro geralmente está associada à produção de espécies reativas de oxigênio e à internalização (LEWINSKI et al, 2008). No entanto, as nanopartículas magnéticas avaliadas neste estudo não foram tóxicas para os macrófagos peritoneais, como pôde ser observado pelos ensaios com os reagentes MTT, inclusive para os grupos incubados com BSA, nos quais houve elevada internalização do FM-DMSA (figuras 10 e 11). Esses resultados estão de acordo com estudos prévios em que macrófagos alveolares não apresentaram sua viabilidade alterada após a adição do FM-DMSA ao meio de cultura, por até 72 horas (VALOIS et al., 2010) e com outros estudos em que a exposição de macrófagos murinos a concentrações entre 1 e 100  $\mu\text{gFe/mL}$  de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (Ferucarbotrano) não alteram a viabilidade celular nos ensaios de MTT e azul tripan, mesmo com a alta internalização dessas partículas; apesar de influenciarem as funções fisiológicas, inclusive a resposta imune celular e humoral (HSIAO et al., 2008).

Outros tipos celulares incubados com nanopartículas magnéticas de ferro recobertas com DMSA em concentrações de até 100  $\mu\text{g/mL}$  também não apresentaram citotoxicidade em ensaios de viabilidade celular com avaliação de atividade mitocondrial, ciclo celular, morte por apoptose, produção de espécies reativas de oxigênio e fragmentação de DNA (LIU et al., 2010; WILHELM; GAZEAU et al., 2008).

Em alguns estudos há citotoxicidade de nanopartículas de ferro recobertas com DMSA (AUFFAN et al., 2006; PISANIC II et al., 2007). PISANIC II et al. (2007) avaliaram, não apenas a viabilidade celular, mas também outros parâmetros importantes como alterações no citoesqueleto, adesão das células ao substrato,

diferenciação e formação de contato intercelular de neurônios, observando, nesse estudo, alta toxicidade e alterações funcionais em concentrações de ferro superiores a 1,5 mM. Estudos com alta concentração de ferro são essenciais para avaliar os efeitos das nanopartículas, uma vez que em muitas aplicações biomédicas há a necessidade de grande quantidade de partículas dentro das células. Os resultados obtidos no presente estudo representam concentrações relativamente altas de ferro 0,03 mgFe/mL (0,53 mM) e 0,06 mgFe/mL (1,06 mM) e, como não foi observada toxicidade, há boa expectativa para a utilização do FM-DMSA em aplicações que requeiram altas concentrações intracelulares de nanopartículas como o direcionamento de fármacos e a lise celular por magnetohipertermia. Contudo, os tempos avaliados foram curtos, de no máximo 12h, sendo necessárias investigações em tempos mais longos e em diferentes tipos celulares. Vale ressaltar que mesmo em altas concentrações de ferro, ausência de cobertura e intervalos de tempo maiores (até 72h), nanopartículas magnéticas de magnetita não apresentaram citotoxicidade em células hepáticas e pulmonares humanas (LIU et al., 2009).

Sendo que as nanopartículas de óxido de ferro também podem causar efeitos independentes da internalização, principalmente pela toxicidade da cobertura das nanopartículas (LIN et al., 2008; SOENEN; CUYPER et al., 2009), a ausência de citotoxicidade observada para o FM-DMSA corrobora com a hipótese de que a cobertura dessas nanopartículas realmente possui uma combinação de características como, por exemplo, as suas cargas negativas, que as tornam biocompatíveis.

Enquanto nanopartículas sem cobertura provocam grande internalização com significativa morte celular, sendo a produção de espécies reativas de oxigênio uma das principais causas da morte celular, as partículas recobertas com substâncias hidrofílicas apresentam menor citotoxicidade, (LIN et al., 2010; SOENEN; CUYPER et al., 2009). Embora não seja possível concluir que o FM-DMSA induz uma menor produção de espécies reativas de oxigênio, pelo menos, pode-se concluir que os danos celulares, caso elas sejam liberadas pelas células, estão minimizados.

Vale novamente ressaltar que a aglomeração é outro fator importante na toxicidade das nanopartículas magnéticas. Estudos de viabilidade por MTT com nanopartículas de ferro superparamagnéticas recobertas com álcool polivinílico (PVA), por exemplo, tiveram sua viabilidade aumentada com a menor aglomeração das nanopartículas pelo controle da concentração de PVA (MAHMOUDI et al.,

2009). No presente estudo, os ensaios de estabilidade permitiram determinar as concentrações ideais das soluções utilizadas na cultura de células, impedindo a aglomeração das nanopartículas e, conseqüentemente, possíveis reações tóxicas decorrentes da aglomeração.

Uma importante característica dos macrófagos é a habilidade em produzir citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-12 e anti-inflamatórias IL-10 e TNF- $\alpha$  em resposta a um estímulo. Por sua vez, o balanço da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias é essencial para compreender a complexa atuação do macrófago (CHUNG et al., 2006).

Estudos *in vitro* com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, recobertas com dextran, não demonstraram indução na produção de IL-1 e IL-6 em monócitos incubados por 24h com 1mg Fe/mL (ENGBERINK et al., 2007). MÜLLER et al. (2007) também não observaram aumento da produção de IL-12, IL-10, IL-1b e TNF- $\alpha$ , *in vitro*, por macrófagos derivados de monócitos na presença de nanopartículas superparamagnéticas de Feumoxtran-10. Macrófagos peritoneais incubados por 48 horas com Ferumoxtran-10 em concentrações de 100 e 500mg/mL também não aumentaram significativamente a produção de IL-1 (RAYNAL et al., 2004). Esses estudos corroboram os resultados do presente trabalho em que não ocorreu aumento significativo na produção de IL-1 $\beta$  (figura 19) e TNF- $\alpha$  (Figura 20). Até mesmo para a produção de IL-6, que apresentou diferença significativa após a adição do FM-DMSA, os níveis são muito baixos podendo não representar um importante aumento para ação imunológica desses macrófagos (figura 21).

No entanto, em nosso estudo, observou-se aumento na liberação de TGF- $\beta$  *in vitro* para macrófagos peritoneais; o que não ocorreu para os macrófagos alveolares, os quais mantiveram sua expressão basal de TGF- $\beta$  (figura 17). Poucos estudos relatam o aumento da produção de TGF- $\beta$  em resposta à incubação com nanopartículas, porém observou-se *in vivo* o aumento dessa citocina após a instilação intratraqueal de nanopartículas de platina e nanopartículas de óxido de ferro no lavado bronco alveolar de camundongos. Os autores relacionam essa observação à produção de matriz extracelular para o reparo tecidual nas etapas inflamatórias iniciais (PARK et al., 2010a; PARK et al., 2010b).

O TGF- $\beta$  pode agir aumentando e impedindo a degradação da matriz extracelular, possuindo papel central no estímulo para a produção de colágeno pelos fibroblastos que pode levar a uma fibrose pulmonar ou peritoneal (FAIRWEATHER;

CIHAKOVA, 2009; LI et al., 2006; MARGETTS e BONNIAUD, 2003; NACU et al., 2008). Os resultados do presente estudo demonstraram a ausência de produção de TGF- $\beta$  para macrófagos alveolares, observação que corrobora o fato de fibroses pulmonares associadas às nanopartículas magnéticas não serem comuns, sendo que para o FM-DMSA nunca foi observada (GARCIA et al., 2005; GRASSIAN et al., 2007; MONGE-FUENTES, 2009; PETTIBONE et al., 2008; VALOIS et al., 2009). Por outro lado, o aumento da produção de TGF- $\beta$  para macrófagos peritoneais ocorreu, sendo importantes futuras avaliações para aplicação do fluido magnético na cavidade peritoneal.

O aumento da produção de TGF- $\beta$  não está necessariamente relacionado a fibroses; pois, uma vez produzida pelo macrófago, essa citocina desempenha diversas funções além da atração de fibroblastos para reparo da matriz, tais como a atração de neutrófilos, recrutamento e diferenciação de monócitos em macrófagos, migração e proliferação de células epiteliais, redução da expressão de receptores de fagocitose em macrófagos e da produção de EROs e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8. (KOBAYASHI et al., 2010; LI et al., 2006; LINGNAU et al., 2007). Essas duas últimas funções dessas citocinas podem ser importantes para os macrófagos incubados com o FM-DMSA, uma vez que o aumento da internalização não foi observado para os macrófagos incubados com soro, a viabilidade manteve-se estável em todos os grupos experimentais e o padrão de produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e IL-6 observados não revelam uma grande e homogênea atividade pró-inflamatória.

O aumento da produção de IL-10 (Figura 18) foi proeminente apenas para os macrófagos peritoneais incubados com BSA, ou seja, aqueles que apresentaram também uma maior internalização de nanopartículas. O aumento da produção de IL-10 para o FM-DMSA também foi observado no lavado bronco-alveolar em estudos realizados por VALOIS et al. (2010) *in vivo*. Também ocorreu aumento da produção de IL-10 no sangue periférico de camundongos tratados intravenosamente com nanopartículas magnéticas de magnetita sendo que quanto maior a concentração de nanopartículas administradas, menor era a produção dessas citocinas (CHEN et al., 2010).

Assim como o TGF- $\beta$ , a produção de IL-10 pode estar relacionada à ativação alternativa dos macrófagos para indução do reparo tecidual e redução da produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e de EROs (CHUNG et al., 2006; COUPER et al., 2008;

FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009; LI et al., 2006; LINGNAU et al., 2007; ZHANG et al., 2010). O uso tópico de nanopartículas de prata para queimaduras, por exemplo, promove esse padrão de correlação entre a alta produção de IL-10 e a baixa de IL-6, sendo que com a diminuição de IL-10 a produção de IL-6 aumenta (TIAN et al., 2007).

No presente estudo observa-se que os macrófagos peritoneais tiveram elevada produção de IL-10, associada à baixa produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (na presença de BSA e de soro de camundongo) e de IL-6 (na presença de soro), após 2h de incubação com FM-DMSA. A diferença significativa na dosagem de IL-6 para macrófagos peritoneais associados ao FM-DMSA na presença de soro pode representar uma inibição pouco acentuada de sua produção. É importante ressaltar que o tempo de estudo pode ser curto para avaliar esse tipo de padrão de inibição de citocinas, sendo necessário avaliar tempos mais longos para determinar a ocorrência de uma inibição da produção de TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  e IL-6 em decorrência do aumento de IL-10. Além disso, *in vivo* essas citocinas desencadeiam uma resposta sistêmica levando à produção de outras moléculas, como o fator de crescimento de hepatócito, que são capazes de aumentar sua produção na presença de IL-10 e, então, reduzir a produção de outras citocinas como a IL-6 por macrófagos (KAMIMOTO et al., 2009).

Embora os níveis dosados de IL-6 sejam baixos, o aumento significativo em relação ao controle da produção dessa citocina pelos macrófagos peritoneais incubados com FM-DMSA, em meio de cultura RPMI-1640 com soro de camundongo, pode estar indicando o seu papel antiinflamatório (figura 21). A IL-6 geralmente age como uma citocina pró-inflamatória durante uma inflamação crônica permitindo o acúmulo exagerado de células mononucleares, mas em uma inflamação aguda ela é responsável por atuar reduzindo a quantidade de neutrófilos e estimulando o recrutamento de macrófagos para a resolução da inflamação (KAPLANSKI et al., 2003).

Conforme observado no presente trabalho, estudos *in vitro* com nanopartículas superparamagnéticas também revelaram que o aumento da produção de IL-10 por macrófagos está relacionado à inibição da produção de TNF- $\alpha$  (SIGLIANTI et al., 2006). Outros estudos demonstram que macrófagos expostos a nanopartículas superparamagnéticas em altas concentrações de ferro (100mg/mL) apresentam significativa produção de TNF- $\alpha$ , já em concentrações mais baixas (10

mg/mL) essa produção não é observada (HSIAO et al, 2008). As concentrações utilizadas foram bem menores que as testadas por HSIAO e colaboradores (0,03 mgFe/mL e 0,06 mgFe/mL), podendo justificar a baixa produção de TNF- $\alpha$ . Além disso, o TNF- $\alpha$  pode ser responsável pelo estímulo da produção de EROs (KIM et al, 2010; SAKON et al., 2003) afetando a viabilidade celular, mas não houve citotoxicidade dessas nanopartículas no presente estudo. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro associado a sulfato de protamina também não apresentaram aumento na produção de TNF- $\alpha$  *in vitro* (JANIC et al., 2008). *In vivo*, a produção de citocinas pode ter um padrão diferenciado devido à resposta do organismo, talvez por isso tenha havido produção de TNF- $\alpha$  no pulmão de camundongos após a administração intravenosa de FM-DMSA (VALOIS et al, 2010).

Observa-se que o padrão para a produção de citocinas é bem diferenciado entre macrófagos alveolares e peritoneais, isso porque macrófagos de diferentes origens apresentam características próprias quanto ao tipo de moléculas produzidas e funções desempenhadas no organismo. Um estudo *in vivo*, por exemplo, demonstrou que a internalização de nanopartículas magnéticas aumenta a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos peritoneais de ratos, mas não de camundongos, indicando que diferentes tipos de macrófagos podem responder de forma distinta às nanopartículas (SIGLIANTI et al, 2006; SUZUKI et al., 2008; XU et al., 2006). Essa observação foi corriqueira nos resultados do presente estudo, uma vez que os macrófagos alveolares não apresentaram alteração na produção de citocinas mesmo para os grupos em que houve maior internalização, por outro lado os macrófagos alveolares apresentaram elevada produção de IL-10 e TGF- $\beta$  quando incubados com o FM-DMSA, em relação aos controles.

## **7 CONCLUSÃO**

## 7 CONCLUSÃO

Durante a avaliação dos efeitos do FM-DMSA sobre macrófagos peritoneais e alveolares, na presença de BSA ou soro de camundongo, as nanopartículas magnéticas utilizadas permaneceram estáveis, possibilitando a avaliação das atividades dos macrófagos em diferentes condições experimentais que resultaram em variações no padrão de internalização celular das nanopartículas e na produção de citocinas, sem alteração da viabilidade celular. Portanto, a partir dos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que:

- As nanopartículas do FM-DMSA permanecem estáveis nas concentrações de BSA a 2,5% (0,03 mgFe/mL) e 1,5% (0,06 mgFe/mL) e de soro de camundongo a 4,5% (0,03 e 0,06 mgFe/mL) em meio de cultura RPMI-1640;
- O FM-DMSA não é tóxico para os macrófagos incubados com as nanopartículas nas concentrações de 0,03 mgFe/mL e 0,06 mgFe/mL em RPMI-1640 com BSA ou soro de camundongo;
- Macrófagos peritoneais e alveolares não apresentam internalização das nanopartículas em meio de cultura RPMI-1640 com 4,5% de soro de camundongo, o que indica a ausência de ativação do sistema complemento;
- A internalização das nanopartículas por macrófagos peritoneais e alveolares é estimulada na presença 1,5% ou 2,5% de BSA, revelando que o BSA apresenta potencial para as aplicações biomédicas que exigem altas concentrações intracelulares de nanopartículas;
- Ocorre uma baixa atividade pró-inflamatória pelos macrófagos alveolares e peritoneais incubados com o FM-DMSA, que produzem IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 em níveis basais;
- Ocorre a predominância de uma ação antiinflamatória pelos macrófagos peritoneais quando incubados com o FM-DMSA, pois houve aumento na liberação de TGF- $\beta$  na presença de soro de camundongo e de BSA e na liberação de IL-10 na presença de BSA;
- Os macrófagos alveolares não apresentam uma proeminente resposta antiinflamatória ao serem incubados com FM-DMSA, confirmando que células diferentes podem ser estimuladas de forma distinta pelas nanopartículas.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; KURODA, Y.; KUBOKI, N.; MATSUSHITA, M.; YOKOYAMA, N.; KOJIMA, N. Contribution of complement component C3 and complement receptor type 3 to carbohydrate-dependent uptake of oligomannose-coated liposomes by peritoneal macrophages. **The Journal of Biochemistry**, v. 144, n. 5, p. 563–570, nov. 2008.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 593-623, apr. 1999.

AGGARWAL, P.; HALL, J. B.; MCLELAND, C. B.; DOBROVOLSKAIA, M. A. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 428-437, jun. 2009.

ALEXIS, F. A.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p.505-515, jul.-aug. 2008.

ALLOUNI, Z. E.; CIMPAN, M. R.; HØL, P. J.; SKODVIN, T.; GJERDET, N. R. Agglomeration and sedimentation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture medium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, n. 1, p. 83–87, jan. 2009.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS INTERNATIONAL COMMITTEE E56 ON NANOTECHNOLOGY. **ASTM E2456-06 Standard Terminology for Nanotechnology**. West Conshohocken, ASTM International, 2006.

AUFFAN, M.; DECOME, L.; ROSE, J.; ORSIERE, T.; DEMEO, M.; BRIOIS, V.; CHANEAC, C.; OLIVI, L; BERGE-LEFRAC, J-L.; BOTTA, A.; WISNER, M. R. BOTTERO, J-Y. In Vitro Interactions between DMSA-Coated Maghemite Nanoparticles and Human Fibroblasts: A Physicochemical and Cyto-Genotoxicity Study. **Environmental Science Technology**, v. 40, n. 14, p. 4367-4373, jul. 2006.

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

BALAGOPAL, A. ; MACFARLANE, A. S.; MOHAPATRA, N.; SONI, S.; GUNN, J. S.; SCHLESINGER, L. S. Characterization of the Receptor-Ligand Pathways Important for Entry and Survival of *Francisella tularensis* in Human Macrophages. **Infection and Immunity**, v.74, n. 9, p. 5114-5125, sep. 2006.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 595-601, sep-oct. 2008.

BEDUNEAU, A.; MA, Z.; GROTEPAS, C. B.; KABANOV, A.; RABINOW, B. E.; GONG, N.; MOSLEY, R. L.; DOU, H.; BOSKA, M. D.; GENDELMAN, H. E. Facilitated Monocyte-Macrophage Uptake and Tissue Distribution of Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, p. 1-12, feb. 2009.

BERRY, C. C.; CURTIS, A.S.G. Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R198–R206, jun. 2003.

BIHARI, P.; VIPPOLA, M., SCHULTES, S.; PRAETNER<sup>1</sup>, M.; KHANDOGA, A. G.; REICHEL<sup>1</sup>, C. A.; COESTER, C.; TUOMI, T.; REHBERG, M.; KROMBACH, F. Optimized dispersion of nanoparticles for biological *in vitro* and *in vivo* studies. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 5, p. 1-14, nov. 2008.

BILITEWISKI, U. Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of the innate immune system. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1545-1554, jul. 2008.

BUFORD, M. C.; HAMILTON JR, R. F.; HOLIAN, A. A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 4, p. 1-6, jul. 2007.

CAMPANGNE, M. L.; WIELSMANN, C.; BROWN, E. J. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2095-2102, sep. 2007.

CHAVES, S. B.; LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 38, n. 5, p. 3231-3233, dec. 2002.

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

CHEN, B-A.; JIN, N.; WANG, J.; DING, J.; GAO, C.; CHENG, J.; XIA, G.; GAO, F.; ZHOU, Y.; CHEN, Y.; ZHOU, G.; LI, X.; ZHANG, Y.; TANG, M.; WANG, X. The effect of magnetic nanoparticles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on immune function in normal ICR mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 593-599, sep. 2010.

CHEN, H-W.; SU, S. F.; CHIEN, C. T.; LIN, W-H.; YU, S. L.; CHOU, C-C.; CHEN, J. J. W.; YANG, P-C. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 13, p. 1732-1741, nov. 2006.

CHEN, Z. P.; ZHANG, Y.; XU, K.; XU, R. Z.; Liu, J. W.; GU, N. Stability of Hydrophilic Magnetic Nanoparticles Under Biologically Relevant Conditions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 12, p. 6260-6265, dec. 2008a.

CHEN, Z. P.; ZHANG, Y.; ZHANG, S.; XIA, J. G.; LIU, J. W.; XU, K.; GU, N. Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA. **Colloids and Surfaces A:**

***Physicochemical and Engineering Aspects***, v. 316, n. 1-3, p. 210-216, mar. 2008b.

CHUNG, E. Y.; KIM, S. J.; MA, X. J. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. **Cell Research**, v. 16, n. 2, p. 154-161, feb. 2006.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **The Journal of Immunology**. v. 180, n. 9, p. 5771-5777, may. 2008.

DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n.4, p. 935-945, aug. 2008.

DELVES P. J.; ROITT, I. M. Advances in immunology: The immune system. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, jul. 2000.

DENG, Z. J.; MORTIMER, G.; SCHILLER, T.; MUSUMECI, A.; MARTIN, D.; MINCHIN, R.F. Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 20, n. 45, p.1-9, nov. 2009.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; AGGARWAL, P.; HALL, J. B.; MCNEIL, S. E. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 487-495, jul.-aug. 2008.

DUTTA, D.; SUNDARAM, S. K.; TEEGUARDEN, J. G.; RILEY, B. J.; FIFIELD, L. S.; JACOBS, J. M.; ADDLEMAN, S. R.; KAYSEN, G. A.; MOUDGIL, B. M.; WEBERKJ, T. J. Adsorbed Proteins Influence the Biological Activity and Molecular Targeting of Nanomaterials. **Toxicological Sciences**, v. 100, n. 1, p. 303-315, nov. 2007.

EHRENBERG, M. S.; FRIEDMAN, A. E.; FINKELSTEIN, J. N.; OBERDÖRSTER, G.; MCGRATH, J. L. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. **Biomaterials**, v. 30, n. 4, p. 603-610, feb. 2009.

ENGBERINK, R. D. O.; VAN DER POL, S. M. A.; DÖPP, E. A.; DE VRIES, H. E. BLEZER, E. L. A. Comparison of SPIO and USPIO for in Vitro Labeling of Human monocytes: MR Detection and Cell Function. **Radiology**, v. 243, n. 2, p. 467-474, may. 2007.

FAIRWEATHER, D.; CIHAKOVA, D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 33, n. 3-4, p. 222–230, nov.-dec.2009.

FAROKHZAD, O.C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. **ACS Nano**, v.3, n. 1, p. 16-20, jun. 2009.

FLAVELL, R. A.; SANJABI, S.; WRZESINSKI, S. H.; LICONA □ LIMON, P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF $\beta$ . **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 554-567, aug. 2010.

GAN, Z-F.; JIANG, J-S.; YANG, Y.; DU, B.; QIAN, M.; ZHANG, P. Immobilization of homing peptide on magnetite nanoparticles and its specificity in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part**, v. 84A, n. 1, p. 10-18, jan. 2007.

GARCIA, M.P.; PARCA, R. M.; CHAVES, S. B.; SILVA, L. P.; SANTOS, A. D.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 277-282, may. 2005.

GAUCHER, G.; ASAHINA, K.; WANG, J.; LEROUX, J-C. Effect of Poly (*N*-vinylpyrrolidone)-*block*-poly (D,L-lactide) as Coating Agent on the Opsonization, Phagocytosis, and Pharmacokinetics of Biodegradable Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 2, p. 408-416, feb. 2008.

GÓMEZ, S.; GAMAZO, C.; ROMAN, B. S.; VAUTHIER, C.; FERRER, M.; IRACHE, J. M. Development of a Novel Vaccine Delivery System Based on Gantrez

Nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 6, n. 9-10, p. 3283-3289, sep.-oct. 2006.

GOODMAN, R. B.; PUGIN, J.; LEE, J. S.; MATTHAY, M. A. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 6, p. 523-535, dec. 2003.

GORDON, S. Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927-930, dec. 2002.

GRASSIAN, V. H.; O'SHAUGHNESSY, P. T.; ADAMCAKOVA-DODD, A.; PETTIBONE J. M.; THORNE, P. S. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 3, p. 397-402, mar. 2007.

GUPTA, K.; GUPTA, R. K.; HAJELA, K. Disease associations of mannose-binding lectin & potential of replacement therapy. **The Indian journal of medical research**, v. 127, n. 5, p. 431-440, may. 2008.

HAMILTON, Jr. R. F.; THAKUR, S. A.; HOLIAN, A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 44, n.7, p. 1246-1258, apr. 2008.

HARASHIMA, H.; MATSUO, H.; KIWADA, H. Identification of proteins mediating clearance of liposomes using a liver perfusion system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 32, n. 1-2, p. 61 –79, jun. 1998.

HE, C.; Hu, Y.; Yin, L.; Tang, C.; Yin, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657-3666, may. 2010.

HSIAO, J-K.; CHU, H-H., WANG, Y-H., LAI, C-W.; CHOU, P-T.; HSIEH, S-T.; WANG, J-L.; LIU, H-M. Macrophage physiological function after superparamagnetic iron oxide labeling. **NMR in Biomedicine**, v. 21, n. 8, p. 820-829, oct. 2008.

ITO, A.; INO, K.; HAYASHIDA, M.; KOBAYASHI, T.; MATSUNUMA, H.; KAGAMI, H.; UEDA, M.; HONDA, H. Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 9/10, p. 1553-1561, sep.-oct. 2005.

JANIC, B.; ISKANDER, A. S. M.; RAD, A. M. SOLTANIAN-ZADEH, H.; ARBAB, A. S. Effects of Ferumoxides – Protamine Sulfate Labeling on Immunomodulatory Characteristics of Macrophage-like THP-1 Cells. **PLoS ONE**, v.3, n. 6, p. e2499-e2508, jun. 2008.

KACHKACHI, H. Effects of spin non-collinearities in magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 316, n. 2, p. 248-254, sep. 2007.

KAMIMOTO, M.; MIZUNO, S.; NAKAMURA, T. Reciprocal regulation of IL-6 and IL-10 balance by HGF via recruitment of heme oxygenase-1 in macrophages for attenuation of liver injury in a mouse model of endotoxemia. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 24, n. 2, p. 161-170, aug. 2009.

KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **TRENDS in Immunology**, v. 24, n.1, jan. 2003.

KARLSSON, H.L.; CRONHOLM, P.; GUSTAFSSON, J.; MÖLLER, L. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 9, p. 1726-1732, sep. 2008.

KIM, J. J.; LEE, S. B.; PARK, J. K.; YOO, Y. D. TNF- $\alpha$ -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 9, p. 1420-1434, mar. 2010.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 6, p. 1-6, dec. 2010.

LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, jun. 2008.

LEE B-F.; YEH, J-L.; CHIU N-T.; LIU G-C.; YU, H-S; WANG, M-H.; SHEN, L-H. Evaluation of tc-99m (v) DMSA binding to human plasma proteins. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 1-9, jan. 2008.

LEROUX, J-C.; DE JAEGHERE, F.; ANNER, B.; DOELKER, E.; GUMY, R. An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly(d,l-lactic acid) nanoparticles by human monocytes. **Life Sciences**, v. 57, n. 7, p. 695-703, jul. 1995.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 1, p. 26-48, jan. 2008.

LI, M. O.; WAN, Y. Y.; SANJABI, S.; ROBERTSON, A. K-L.; FLAVELL, R. A. Transforming Growth Factor- $\beta$  Regulation of Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 99-146, apr. 2006.

LI, Y.; XU, X.; DENG, C.; YANG, P.; ZHANG, X. Immobilization of Trypsin on Superparamagnetic Nanoparticles for Rapid and Effective Proteolysis. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 9, p. 3849-3855, sep. 2007.

LIM, J. K.; MAJETICH, S. A.; TILTON, R. D. Stabilization of Superparamagnetic Iron Oxide Core-Gold Shell Nanoparticles in High Ionic Strength Media. **Langmuir**, v. 25, n. 23, p. 13384-13393, dec. 2009.

LIN, M. M.; KIM, D. K.; EL HAJ, A. J.; DOBSON, J. Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) for Translation to Clinical Applications. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 7, n. 4, p. 298-305, dec. 2008.

LIN, M. M.; KIM, H-H.; KIM, H. Iron oxide-based nanomagnets in nanomedicine: fabrication and applications. **Nano Reviews**, v. 1, p. 4883-4900 , feb. 2010.

LINGNAU, M.; HÖFLICH, C.; VOLK, H-D.; SABAT, R.; DÖCKE, W-D. Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes. **Human Immunology**, v. 68, n. 9, p. 730-738, sep. 2007.

LIU, S., LONG, L.; YUAN, Z.; YIN, L.; LIU, R. Effect and intracellular uptake of pure magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in the cells and organs of lung and liver. **Chinese Medical Journal**, v. 122, n. 15, p. 1821-1825, aug. 2009.

LIU, Y.; CHEN, Z.; WANG, J. Systematic evaluation of biocompatibility of magnetic Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with six different mammalian cells. **Journal of Nanoparticles Research**, *In press*, jul. 2010. Disponível em:  
<http://www.springerlink.com/content/r73302516p2044w5/>

MACIEL, J. C. **Síntese e caracterização de partículas de levana-magnetita e sua utilização como matriz para imobilização de tripsina**. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; MILANI, A.S. STROEVE, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 336, n. 2, p. 510-518, aug. 2009.

MARGETTS, P. J.; BONNIAUD, P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. **Peritoneal Dialysis International**, v.23, n. 6, p. 530-541, nov-dec. 2003.

MASTELOS, D.; PRECHL, J.; LÁSZLÓ, G.; PAPP, K.; OLÁH, E.; ARGYROPOULOS, E.; FRANCHINI, S.; TUDORAN, R.; MARKIEWSKI, M.; LAMBRIS, J. D.; ERDEI, A. Novel monoclonal antibodies against mouse C3 interfering with complement activation: description of fine specificity and applications to various immunoassays. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 1213-1221, mar. 2004.

MCBAIN, S. C.; YIU, H. H. P.; DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 169-180, jun. 2008.

MAYER, G. **Microbiologia e Imunologia On-line**. Escola de Medicina da universidade da Carolina do Sul. 2009. Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter2.htm>. Acesso em: 07 fev. 2011.

MONGE-FUENTES, V. **Estudo da biodistribuição e biocompatibilidade nanopartículas magnéticas à base de maguemitita recobertas com DMSA em macacos-prego (*Cebus spp.*) juvenis mediante análise morfológica**. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

MORAIS, P.C.; SANTOS, J. G.; NETO, K. S.; PELEGRINI, F.; DE CUYPER, M. Magnetic resonance of magnetic fluid and magnetoliposome preparations. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 526-531, may. 2005.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, dec. 1983.

MOSQUEIRA, V. C., F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, n. 22, p. 2967-2979, nov. 2001.

MUHLENA, C. V. Z.; ELVERFELDT, D. V.; BASSLER, N.; NEUDORFER, I.; STEITZ, B.; PETRI-FINK, A.; HOFMANN, H.; BODEA, C.; PETER, K. Superparamagnetic iron oxide binding and uptake as imaged by magnetic resonance is mediated by the integrin receptor Mac-1 (CD11b/CD18): Implications on imaging of atherosclerotic plaques. **Atherosclerosis**, v. 193, n. 1, p. 102-111, jul. 2007.

MUKHOPADHYAY, S.; HOIDAL, J. R.; MUKHERJEE, T. K. Role of TNF $\alpha$  in pulmonary pathophysiology. **Respiratory Research**, v. 7, n. 125, p.1-9, oct. 2006.

MÜLLER, K.; SKEPPER, J. N.; POSFAI, M.; TRIVEDI, R.; HOWARTH, S.; COROT, C.; LANCELOT, E.; THOMPSON, P. W.; BROWN, A. P.; GILLARD, J. H. Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. **Biomaterials**, v. 28, n. 9, p. 1629-1642, mar. 2007.

NACU, N.; LUZINA, I. G.; HIGHSMITH, K.; LOCKATELL, V.; POCHETUHEN, K. COOPER, Z. A.; GILLMEISTER, M. P.; TODD, N. W.; ATAMAS, S. P. Macrophages produce tgfb1 (big3) following ingestion of apoptotic cells and regulate mmp14 levels and collagen turnover in fibroblasts. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 5036-5044, apr. 2008.

OGAWARA, K-I.; YOSHIDA, M.; KUBO, J-I.; NISHIKAWA, M.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Mechanisms of hepatic disposition of polystyrene microspheres in rats: Effects of serum depend on the sizes of microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 61, n. 3, p. 241-250, sep. 1999.

PAPELL, S. S. **Low viscosity magnetic fluid obtained by the colloidal suspension of magnetic particles.** *Int CI C06B23/00. US. PI3215572.* 11 feb. 1965.

PARK, E-J.; KIM, H.; KIM, Y.; YI, J.; CHOID, K.; PARK, K. Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice. **Toxicology**. v. 275, n. 1-3, p. 65-71, sep. 2010a.

PARK, E-J.; KIM, H.; KIM, Y.; YI, J.; PARK, K. Intratracheal instillation of platinum nanoparticles may induce inflammatory responses in mice. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 5, p. 727-735, may 2010b.

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**, v. 2, n. 4, p. 189- 204, oct. 2008.

PISANIC II, T. R.; BLACWELL, J. D.; SHUBAYE, V.I. FIÑONES, R. R.; JI, S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. **Biomaterials**, v. 28, n. 16, p. 2572-2582, jun. 2007.

RAYNAL, I. PRIGENT, P.; PEYRAMAURE, S.; NAJID, A.; REBUZZI, C.; COROT, C. Macrophage Endocytosis of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. Mechanisms and Comparison of Ferumoxides and Ferumoxtran-10. **Investigative Radiology**, v. 39, n. 1, p. 56-63, jan. 2004.

SAKON, S.; XUE, X.; TAKEKAWA, M.; SASAZUKI, T; OKAZAKI, T; KOJIMA, Y.; PIAO, J-H; YAGITA, H.; OKUMURA, K. DOI, T; NAKANO, H. NF- $\kappa$ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *The EMBO Journal*, v. 22, n. 15, p. 3898-3909, aug. 2003.

SARRADIN, P-M.; LE BRIS, N.; LE GALL, C.; RODIER, P. Fe analysis by the ferrozine method: Adaptation to FIA towards in situ analysis in hydrothermal environment. **Talanta**, v. 66, n. 5, p. 1131-1138, jun. 2005.

SCHUH, J. M.; BLEASE, K.; KUNKEL, S. L.; HOGABOAM, C. M. Chemokines and cytokines: axis and allies in asthma and allergy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 6, p. 503-510, dec. 2003.

SHENG, Y.; LIU, C.; YUAN, Y.; TAO, X.; YANG, F.; SHAN, X.; ZHOU, H.; XU, F. Long-circulating polymeric nanoparticles bearing a combinatorial coating of PEG and water-soluble chitosan. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2340-2348, apr. 2009.

SIGLIENTI, I.; BENDSZUS, M.; KLEINSCHNITZ, C.; STOLL, G. Cytokine profile of iron-laden macrophages: Implications for cellular magnetic resonance imaging. **Journal of Neuroimmunology**, v. 173, n. 1-2, p. 166-173, apr. 2006.

SOENEN, S. J. H.; DE CUYPER, M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. **Contrast Media and Molecular Imaging**, v. 4, n. 5, p. 4207-4219, sep-oct. 2009.

SUZUKI, T.; CHOW, C-W.; DOWNEY, G. P. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 6-7, p. 1348-1361, jan. 2008.

TIAN, J.; WONG, K. K. Y.; HO, C-H.; LOK, C-N.; YU, W-Y.; CHE, C-M.; CHIU, J-F.; TAM, P. K. H. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. **ChemMedChem**, v. 2, n. 1, p. 129-136, jan. 2007.

VALOIS, C. R. A.; BRAZ, J. M.; NUNES, E. S.; VINOLO, A. R. M.; LIMA, C. D. L. CURI, R.; KUEBLER, W. M. E AZEVEDO, R. B. The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a b2 integrin-dependent pathway. **Biomaterials**. v. 31, n. 2, p. 366-374, jan. 2010.

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**, v. 9, n. 5, p. 2846-2855, may. 2009.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil Migration Mechanisms, with an Emphasis on the Pulmonary Vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 349-374, sep. 2000.

WILHELM, C.; BILLOTEY, C.; ROGER, J.; PONS, J. N., BACRI, J-C; GAZEAU, F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. **Biomaterials**, v. 24, p. 1001-1011, mar. 2003.

WILHELM, C.; GAZEAU, F. Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. **Biomaterials**, v.29, n. 22, p.3161–3174, may. 2008.

WYNN, T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 199-210, nov. 2008.

XU, R. Shear Plane and Hydrodynamic Diameter of Microspheres in Suspension. **Langmuir**, v. 14, n. 10, p. 2593-2597, apr. 1998.

XU, W.; ROOS, A.; SCHLAGWEIN, N.; WOLTMAN, A. M.; DAHA, M. R.; KOOTEN, C. V. IL-10–producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4930-4937, jun. 2006.

ZAHR, A. S.; DAVIS, C. A.; PISHKO, M. V. Macrophage Uptake of Core-Shell Nanoparticles Surface Modified with Poly(ethylene glycol). **Langmuir**, v. 22, n. 19, p. 8178-8185, sep. 2006.

ZHANG, S.; BIAN, Z.; GU, C.; ZHANG, Y.; HE, S.; GU, N.; ZHANG, J. Preparation of anti-human cardiac troponin I immunomagnetic nanoparticles and biological activity assays. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 55, n. 2, p. 143-148, apr. 2007.

ZHANG, Y.; KIM, H-J.; YAMAMOTO, S.; KANG, X.; MA, X. Regulation of Interleukin-10 Gene Expression in Macrophages Engulfing Apoptotic Cells. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 30, n. 3, p. 113-121, mar. 2010.