



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ESTUDO DA MOBILIZAÇÃO MAGNÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS MARCADAS COM NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA
FUNCIONALIZADAS COM CITRATO SOB EFEITO DE DIFERENTES CAMPOS
MAGNÉTICOS EM UM MODELO MURINO DE FIBROSE PULMONAR**

PAULA QUEIROZ ALVIM

Brasília

2016

PAULA QUEIROZ ALVIM

**ESTUDO DA MOBILIZAÇÃO MAGNÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS MARCADAS COM NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA
FUNCIONALIZADAS COM CITRATO SOB EFEITO DE DIFERENTES CAMPOS
MAGNÉTICOS EM UM MODELO MURINO DE FIBROSE PULMONAR**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Mara de Oliveira

Brasília

2016

Dedico este trabalho a meus familiares, amigos e professores pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, que me apoiou por toda minha vida, e me ensinou os melhores e verdadeiros valores humanos que eu poderia ter.

Agradeço em particular a minha irmã Ana Luiza Queiroz Alvim, sempre presente e disposta a ajuda de todas as formas, inclusive quando precisava ir à UnB sábados e Domingos.

A minha orientadora, Professora Dra. Daniela Mara de Oliveira, pela orientação e ensinamentos, que tiveram papel fundamental não só na minha vida acadêmica, mas na minha formação pessoal. Obrigada por todos esses anos ao meu lado, me tornando uma verdadeira cientista.

Agradeço ao Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, pelo acolhimento e oportunidade de trabalhar em seu laboratório, permitindo que essa pesquisa pudesse ser desenvolvida.

Agradeço também a nossa querida Dona Zélia, por todo o auxílio nos mais diversos momentos dentro das atividades do laboratório.

Agradeço a Dra. Jaqueline por ter sido uma grande amiga e tutora por todo este tempo.

Agradeço ao Professor Dr. Paulo Eduardo Souza, pela paciência e ensinamentos dentro da grande área da Física.

Agradeço aos professores da Genética e Morfologia, que sempre estiveram dispostos a ajudar sempre que precisei.

Agradeço ao Frederico Horst, por toda colaboração na ajuda acadêmica, na execução de experimentos deste estudo e pelo companheirismo.

Agradeço a Luiza Zuzanov e a Aline Ramos, por estarem sempre presentes em todos os momentos iniciais deste estudo, como estagiárias e grandes amigas.

Agradeço aos meus queridos amigos de laboratório, que proporcionaram momentos incríveis e inesquecíveis durante esse tempo: Matheus Candeia, Laíse Andrade, Raphael Bonadio, Ana Lígia Câmara, Rayana Ganassin, Frederico Horst, Karen Py, Luiza Lima, Jaqueline e Nayara Lima.

Agradeço ao Rodolfo Lisita, pelo companheirismo, apoio e suporte que me propiciou durante este último ano.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Agradeço ao CNPq, à FAP/DF, à CAPES e ao INCT de Nanobiotecnologia, pelo fomento dos meus estudos.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes presentes em uma grande variedade de tecidos. A administração sistêmica e intrapulmonar dessas células em animais com fibrose pulmonar diminui a mortalidade, o *clearance* do fluido alveolar e o processo inflamatório local, evitando assim a progressão da fibrose para uma síndrome pulmonar mais grave. Para compreender melhor o processo pelo qual as CTMs atuam na regeneração dos tecidos lesionados, é preciso avaliar sua migração, enxertia e retenção nos tecidos lesionados. As nanopartículas magnéticas vêm sendo usadas como uma estratégia eficiente para mobilizar CTMs para regiões lesionadas na presença de campos magnéticos. Esferas de tungstênio são capazes de alterar a homogeneidade de um campo magnético e consequentemente mudar o gradiente desse campo, intensificando a quantidade de CTMs que chegam no local da inflamação. **OBJETIVOS:** **a)** testar se CTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato podem ser mobilizadas magneticamente para o órgão alvo com a utilização de ímãs externos; **b)** investigar o potencial de mobilização magnética para aumentar a enxertia de CTMs humanas provenientes de lipoaspirado marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato em um modelo murino de fibrose pulmonar induzido por bleomicina, **c)** investigar também se, quando submetidas a campo magnético não uniforme, a migração das CTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato aumenta na presença de um ímã rodeado por esferas de tungstênio; e **d)** investigar se uma maior enxertia de CTMs no local da lesão, resultante da mobilização magnética, melhora significativamente a regeneração do tecido pulmonar. **MÉTODOS:** Inicialmente foi estudada a distribuição de fluidos magnéticos quando submetidos a diferentes campos magnéticos a fim de estabelecer qual campo magnético permitiria a distribuição mais adequada para este estudo. Posteriormente, foram feitos estudos *in vitro* de mobilização magnética com CTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato em diferentes campos magnético, e estudos *in vivo* visando: i) quantificar, sob a influência destes campos, a migração e retenção de CTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato nos pulmões com fibrose pulmonar induzida por bleomicina em um modelo murino; e ii) analisar a variação do peso e sobrevida destes animais. **RESULTADOS:** Observamos em nossos ensaios *in vitro* que o campo magnético que permitiu a melhor distribuição do fluido magnético de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato foi o arranjo com um ímã envolto por 5 esferas de tungstênio. Tal arranjo permitiu uma maior migração de CTMs marcadas com nanopartículas

(γ -Fe₂O₃)-citrato *in vitro* quando comparado a um campo magnético formado apenas por um ímã cilíndrico. Nos ensaios *in vivo*, os grupos de animais que tiveram mobilização magnética de CTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato induzida por campos magnéticos externos apresentaram maior retenção destas células nos pulmões do que o grupo que não foi submetido a mobilização magnética; sendo o grupo que teve o campo magnético formado por um ímã cilíndrico rodeado por cinco esferas de tungstênio o que apresentou maior retenção de CTMs nos pulmões. **CONCLUSÕES:** É possível aumentar a migração, enxertia, retenção e distribuição de CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas para regiões alvo quando submetidas a campos magnéticos externos. Modificar o gradiente de campo com as esferas de tungstênio permite uma maior mobilização magnética de CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, nanopartículas magnéticas, mobilização magnética, fibrose pulmonar, terapia celular.

ABSTRACT

Introduction: Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells present in a variety of tissues. The intrapulmonary and systemic administration of these cells in animals with pulmonary fibrosis decreases mortality, clearance of alveolar fluid and local inflammatory process, preventing fibrosis progression to a more severe pulmonary syndrome. To better understand the process of action the MSCs in the regeneration of damaged tissues, it is necessary analyze their migration, grafting and retention in injured tissues. Magnetic nanoparticles have been used as an effective strategy to mobilize MSCs to damaged regions in the presence of magnetic fields. Spheres of tungsten are able to change the homogeneity of a magnetic field and consequently change the gradient of the field. **Objective:** **a)** test whether MSCs labeled with nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrate can be mobilized magnetically to the target organ by the presence of magnets; **b)** investigate the potential of magnetic targeting to increase the engraftment of human MSCs derived from liposuction labeled with nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrate in a murine model of pulmonary fibrosis induced by bleomycin, **c)** and also, investigate whether under a non-uniform magnetic field, the migration of MSCs labeled with nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrate increases in the presence of a magnet surrounded by spheres of tungsten; and **d)** investigate if a higher grafting of MSCs to the site of injury, resulting of magnetic targeting, improves significantly the regeneration of lung tissues. **Methodology:** At first, we studied the distribution of magnetic fluids when submitted to different magnetic fields to determine what magnetic field would allow the most adequate distribution for this study. Subsequently, studies *in vitro* of magnetic targeting with MSCs labeled with nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrate in different magnetic fields have been made studies *in vitro*; and *in vivo* studies intending to: **i)** quantify, under the influence of these fields, the migration and retention of MSCs labeled with nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrate in lungs of a murine model of pulmonary fibrosis, induced by bleomycin; and **ii)** analyze the variation in weight and survival of these animals. **Results:** It was observed *in vitro*, that the magnetic field that allowed the best distribution of the magnetic fluid of nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrate was the arrangement with a magnetic surrounded by five spheres of tungsten. This arrangement improved the migration of MSCs labeled with nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrate *in vitro* when compared with a magnetic field formed only by a cylindrical magnet. In the teste *in vivo*, the groups of animals that had magnetic targeting of MSCs labeled with nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrate induced by an external magnetic fields showed greater retention of these cells in the lungs than the group that was not submitted to magnetic targeting; being the group that had the magnetic field formed by a cylindrical magnet

surrounded by five spheres of tungsten which showed greater engraftment of MSCs in the lungs.

Conclusion: It's possible to increase the homing, engraftment and distribution of MSCs labeled with magnetic nanoparticles to target sites under an external magnetic fields. Modify the gradient field with the spheres of tungsten improves magnetic mobilization of MSCs labeled with magnetic nanoparticles *in vitro* and *in vivo*.

Key words: Mesenchymal stem cell, magnetic nanoparticles, magnetic targeting, pulmonary fibrosis, cell therapy

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da técnica não-cirúrgica de instilação intratraqueal e intranasal em camundongos. Cateteres intravenosos atuam como sondas que permitem a administração de líquidos em região próxima à traqueia. Adaptado de Munder et al. (2011)⁽⁵⁵⁾.....6
- Figura 2.** **A)** arranjo de um único ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, **B)** arranjo com dois ímãs cilíndricos de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, **C)** arranjo com quatro ímãs cilíndricos de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura. 15
- Figura 3.** Arranjos ímãs/esferas de tungstênio. **A)** somente o ímã; **B)** arranjo de um ímã com uma única esfera de tungstênio ao redor; **C)** arranjo de um ímã rodeado por duas esferas de tungstênio; **D)** arranjo de um ímã rodeado por três esferas de tungstênio; **E)** arranjo de um ímã rodeado por quatro esferas de tungstênio; e **F)** arranjo de um ímã rodeado por cinco esferas de tungstênio..... 16
- Figura 4.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato.....22
- Figura 5.** Gráficos da distribuição de tamanho por: **A)** volume; **B)** intensidade e **C)** número das nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato em meio aquoso..... 23
- Figura 6.** Gráfico do potencial zeta da nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato.24
- Figura 7.** Distribuição do fluido magnético de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato submetidas a um campo magnético **A)** de um único ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, **B)** com dois ímãs e **C)** com quatro ímãs. O asterisco se refere a posição dos ímãs. 25
- Figura 8.** Distribuição do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato na presença: **A)** do ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, **B)** do ímã e uma esfera

de tungstênio, **C**) do ímã e duas esferas de tungstênio **D**) do ímã e três esferas de tungstênio **E**) do ímã e quatro esferas de tungstênio e **F**) do ímã e cinco esferas de tungstênio. 26

Figura 9. Diâmetros comparativo de distribuição dos fluidos de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato na presença de um ímã com 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 esferas de tungstênio ao seu redor. 27

Figura 10. Arranjo de ímã com 5 esferas de tungstênio escolhido para os experimentos com CTMs. 27

Figura 11. Migração das adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato na concentração de 0,08 mg/mL quando submetidas a um campo magnético externo de **A**) um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, **B**) um ímã de igual propriedade rodeado por 5 esferas de tungstênio. 29

Figura 12. Quantidade da média de eventos azuis-acobreados contados nas lâminas histológicas de pulmões de camundongos submetidos ao tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, de acordo com os grupos trabalhados. 32

Figura 13. Análise histológica de pulmões murinos, corados pela técnica de Perls e contracorados com vermelho neutro. Os animais receberam administração intratraqueal de bleomicina (6 UI/Kg) e, 24 horas depois, foram tratados intranasalmente com 1×10^6 adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, em que **A**) é o grupo Controle Saudável, **B**) o grupo controle Fibrose, **C**) o grupo CTM, **D**) o grupo CTM + ÍMÃ, **E**) o grupo CTM + TUNGSTÊNIO e **F**) o grupo CTM + ÍMÃ/TUNG. Algumas das células presentes no tecido pulmonar estão evidenciadas em azul-acobreado (setas brancas). Barra: 50 μ m. 32

Figura 14. Variação do peso nos grupos de camundongos durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, de acordo com os grupos trabalhados. No dia 1, administrou-se 30 μ l do fármaco diluído a 6 UI/Kg, ou de solução fisiológica estéril (grupo controle saudável), por instilação intratraqueal. No dia 2, inoculou-se 1×10^6 adCTMs por instilação intranasal marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato nos animais dos grupos tratados. O peso dos animais também foi mensurado no dia seguinte (dia 3) à administração das células e antes destes serem eutanasiados (dia 7). 34

Figura 15. Monitoramento do peso dos animais dos grupos controles por 7 dias durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato nos grupos: **A)** controle saudável, **B)** controle CTM e **C)** controle fibrose. No grupo controle da fibrose, tiveram duas mortes entre o dia 3 e 7 (C)..... 34

Figura 16. Monitoramento do peso dos animais dos grupos tratados por 7 dias durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato nos grupos: **A)** CTM, **B)** CTM + ÍMÃ, **C)** CTM + ÍMÃ/TUNG e **D)** CTM + TUNGSTÊNIO. O grupo CTM + ÍMÃ (**B)** e CTM + TUNGSTÊNIO (**D)** apresentaram uma morte entre os dias 3 e 7. 35

Figura 17. Monitoramento do peso nos grupos de camundongos durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, de acordo com os grupos trabalhados. No dia 1, administrou-se 30 μ l do fármaco diluído a 6UI/Kg, ou de solução fisiológica estéril (grupo controle saudável), por instilação intratraqueal. No dia 2, inoculou-se 1×10^6 adCTMs por instilação intranasal marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato nos animais dos grupos tratados. O peso dos animais também foi mensurado nos próximos 28 dias. 38

Figura 18. Monitoramento do peso dos animais dos grupos controles durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato nos grupos: **A)** controle saudável, **B)** controle CTM e **C)** controle fibrose por 30 dias. 38

Figura 19. Monitoramento do peso dos animais dos grupos tratados durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato nos grupos: **A)** CTM, **B)** CTM + Ímã, **C)** CTM + ÍMÃ/TUNG e **D)** CTM + TUNGSTÊNIO ao longo de 30 dias..... 39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Ensaios Clínicos de terapias com CTMs em Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI). 5
- Tabela 2.** Tabela dos grupos de animais utilizados no experimento. 18
- Tabela 3.** Monitoramento dos pesos dos camundongos durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, de acordo com os grupos trabalhados. No dia 1, administrou-se 30 μ l do fármaco diluído a 6 UI/Kg, ou de solução fisiológica estéril (grupo controle saudável), por instilação intratraqueal. No dia 2, inoculou-se 1×10^6 adCTMs por instilação intranasal marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato nos animais dos grupos tratados. O peso dos animais também foi mensurado no dia seguinte (dia 3) à administração das células e antes destes serem eutanasiados (dia 7). 33
- Tabela 4.** Monitoramento dos pesos dos camundongos durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, de acordo com os grupos trabalhados. No dia 1, administrou-se 30 μ l do fármaco diluído a 6 UI/Kg, ou de solução fisiológica estéril (grupo controle saudável), por instilação intratraqueal. No dia 2, inoculou-se 1×10^6 adCTMs por instilação intranasal marcadas com nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato nos animais dos grupos tratados. O peso dos animais também foi mensurado nos próximos 28 dias. 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- \vec{B} Momento magnético total
- \vec{F}_{mag} Força magnética
- \vec{m} Momento magnético
- μm Micrometros
- **adCTMs** Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

- **CEUA-UnB** Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília

- **CTMs** Células-tronco mesenquimais
- **DH** Diâmetro hidrodinâmico
- **DIP** Doenças intersticiais pulmonares
- **DLS** Dinâmica de espalhamento de luz (*do inglês Dynamic Light Scattering*)
- **DMEM-LG** *Low-Glucose Dulbeccos Modified eagles Medium*
- **DMSO** *Dimethyl sulfoxide*
- **DP** Desvio padrão
- **DPOC** Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- **Fe₃O** Magnetita
- **FeCl₃** Cloreto de ferro
- **FeSO₄** Sulfato ferroso
- **FITC** Isotiocianato de fluoresceína
- **FPI** Fibrose Pulmonar Idiopática
- **GEM** Genética e Morfologia
- **H&E** Hematoxilina e Eosina
- **HCl** Ácido clorídrico
- **IB** Instituto de Biologia
- **ISSCR** Sociedade Internacional para Pesquisas com Células-tronco
- **M** Molar
- **MET** Microscopia Eletrônica de Transmissão

- **moCTMs** Células-tronco mesenquimais de medula óssea
- **NaOH** Hidróxido de sódio
- **NdFeB** Neodímio, Ferro e Boro
- **NPs** Nanopartículas
- **°C** Graus Celsius
- **OGM** Organismos geneticamente modificados
- **PBS** Tampão fosfato salino (*do inglês Phosphate Saline Buffer*)
- **PDI** Índice de polidispersão
- **Ptz** Potencial zeta
- **SPIONS** Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (*do inglês Superparamagnetic iron oxide nanoparticles*)
- **UI** Unidades internacionais
- **uL** Microlitros
- **UnB** Universidade de Brasília
- **USPIONS** Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas ultrapequenas (*do inglês ultra-small superparamagnetic iron oxide NPs*)
- **V** Volts
- **VSPIONS** Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas muito pequenas (*do inglês very small superparamagnetic iron oxide NPs*).
- **γ -Fe₂O₃** Maghemita
- **γ -Fe₂O₃-citrato** Nanopartículas de maghemita revestida com citrato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Células-tronco mesenquimais	1
1.2 CTMs de tecido adiposo	2
1.3 CTMs e fibrose pulmonar	3
1.4 Traçadores magnéticos e táticas para mobilização via campo magnético	7
1.5 Força Magnética	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos Gerais	11
2.2 Objetivos específicos	11
2.2.1 Objetivos específicos <i>in vitro</i>:	11
2.2.2 Objetivos específicos <i>in vivo</i>:	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Obtenção do fluido de nanopartículas (γ-Fe₂O₃)-citrato	12
3.2 Caracterização das nanopartículas (γ-Fe₂O₃)-citrato	13
3.3 Obtenção das adCTMs de lipoaspirado	14
3.4 Animais	14
3.5 Simulação do comportamento do fluido de nanopartículas (γ-Fe₂O₃)-citrato em diferentes campos magnéticos	15
3.6 Marcação das CTMs com nanopartículas (γ-Fe₂O₃)-citrato	16
3.7 Mobilização magnética de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ-Fe₂O₃)-citrato .	17
3.8 Indução da lesão pulmonar	17
3.9 Administração das adCTMs nos animais	17

3.10	Aplicação do ímã e do tungstênio na região pulmonar	19
3.11	Análise histológica	19
3.11.1	Coleta e Fixação	19
3.11.2	Desidratação, inclusão e corte.....	20
3.11.3	Coloração.....	20
3.11.4	Montagem.....	21
3.12	Análises Estatísticas	21
4.	RESULTADOS	21
4.1	Caracterização das nanopartículas (γ -Fe ₂ O ₃)-citrato	21
4.1.1	Tamanho e Formato	22
4.1.2	Diâmetro Hidrodinâmica e Índice de Polidispersão (PDI)	22
4.1.3	Potencial Zeta	24
4.1.4	Estudo do comportamento do fluido de nanopartículas (γ -Fe ₂ O ₃)-citrato em presença do ímã e das esferas de tungstênio	24
4.2	Estudos <i>In vitro</i> com adCTMs.....	28
4.2.1	Estudo <i>in vitro</i> da migração de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe ₂ O ₃)-citrato na concentração de 0,08mg/ml.....	28
4.3	Estudos <i>In vivo</i>	29
4.3.1	Estudo <i>in vivo</i> da migração e retenção de adCTMs marcadas nanopartículas (γ -Fe ₂ O ₃)-citrato	29
4.3.2	Estudo de sobrevivência dos animais com fibrose pulmonar induzida por bleomicina tratados com adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe ₂ O ₃)-citrato	35
5.	DISCUSSÃO	40
5.1	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	40
5.1.1	Análise das nanopartículas de (γ -Fe ₂ O ₃)-citrato	40
5.1.2	Análise do arranjo ímã e esferas de tungstênio	41

5.1.3	Análise da migração de adCTMs marcadas com nanopartículas de $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3)$ -citrato quando submetidas a um campo magnético externo.....	42
5.2	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	43
5.2.1	Análise da migração e retenção de adCTMs nos pulmões dos camundongos	43
5.2.2	Análise de sobrevivência dos animais	46
5.2.3	Ensaio clínico de mobilização magnética de CTMs.	48
5.3	PERSPECTIVAS.....	49
6.	CONCLUSÕES	50
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes presentes em uma grande variedade de tecidos. Essas células podem ser isoladas de diversos sítios biológicos, como o tecido adiposo, placenta, tecidos fetais, sangue e parede do cordão umbilical, polpa dentária, líquido sinovial, entre outros⁽¹⁾. A Sociedade Internacional para Pesquisas com Células-tronco (ISSCR) definiu que as CTMs devem ser naturalmente aderentes ao plástico; diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* na presença de indutores; e possuir marcadores específicos na membrana positivos para CD90, CD105, CD73 e negativos para CD45, CD34 e CD14⁽²⁾.

Dentre todas as células-tronco estudadas até o presente momento, CTMs são muito promissoras no campo de pesquisas da medicina regenerativa devido sua habilidade de se auto renovar e se diferenciar em multilinhagens celulares^(3,4).

Além disso, CTMs possuem características imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam as possibilidades de utilização terapêutica⁽⁵⁾. As CTMs secretam uma grande variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento. Essas moléculas bioativas proporcionam: a modulação da resposta inflamatória, ação anti-apoptótica, o restabelecimento do suprimento vascular e a reparação adequada do tecido, contribuindo para a homeostasia tecidual e imunológica^(3,6-9). As CTMs possuem uma imunogenicidade baixa, pois não expressam moléculas co-estimulatórias e assim são fracamente reconhecidas pelo HLA de hospedeiros incompatíveis. Essa propriedade permite que as CTMs humanas migrem e se enxertem em órgãos lesionados de animais imunocompetentes sem que ocorra uma resposta imune. Essa tolerância, observada até em xenotransplantes, permite que modelos animais sejam usados para estudos de CTMs humanas⁽³⁾.

Outra propriedade importante das CTMs é o processo de 'homing' que envolve a migração e enxertia de células progenitoras para o local da injúria. Fatores presentes no microambiente do tecido lesionado direcionam a migração das CTMs para aquele local.

Acredita-se que esses fatores aumentam a permeabilidade vascular e induzem a superexpressão de moléculas que ajudam na adesão, facilitando assim o ‘homing’ e a enxertia de células que irão participar do reparo tecidual⁽¹⁰⁾.

As terapias baseadas em CTMs possuem grande potencial para o reparo e regeneração de tecidos lesionados, devido a capacidade dessas células de migrarem para sítios de tecidos lesionados e inflamados e modularem a resposta inflamatória nesses locais^(11,12).

1.2 CTMs de tecido adiposo

No decorrer das últimas décadas as CTMs foram isoladas de uma grande variedade de tecidos humanos, porém as CTMs derivadas de medula óssea (moCTMs) e CTMs de tecido adiposo (adCTMs) são as fontes mais utilizadas de CTMs, especialmente em se tratando de terapias celulares autólogas (relativa ao próprio indivíduo)⁽¹³⁾.

O tecido adiposo vem sendo utilizado cada vez mais como uma fonte rica de CTMs na medicina regenerativa, sua grande vantagem vai desde sua fácil obtenção e isolamento quando comparada aos outros tipos de CTMs humanas, a um maior potencial proliferativo e imunomodulatório⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Vários estudos mostram dados conflitantes quando comparam as moCTMs com as adCTMs⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Principalmente quanto as diferenças entre as citocinas secretadas e a expressão de receptores de quimocinas entre elas^(18,20,21). As adCTMs e as moCTMs apresentam morfologia semelhante e mesma expressão de marcadores de membrana, porém as adCTMs possuem um maior potencial proliferativo⁽¹⁴⁾. Segundo o estudo comparativo de Chun-yu Li *et al* (2015), entre adCTMs e moCTMs, as primeiras secretam diferentes proteínas, citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, apresentando um potencial maior de efeitos imunomodulatórios, quando comparadas às moCTMs. Este fato é importante para a escolha deste tipo celular para o presente estudo, por se tratar de uma terapia com CTMs em pulmões com processos inflamatórios⁽¹⁴⁾.

As adCTMs também mostraram possuir maiores propriedades imunossupressoras quando comparadas aos outros tipos de CTMs, sendo as mais indicadas para terapias halogênicas⁽²²⁾. Elas também são indicadas para transplantes autólogos, essas células possuem

fácil obtenção podendo ser retiradas de qualquer tecido adiposo do paciente com uma simples anestesia local e cultivadas em laboratório para posterior utilização⁽²³⁾.

1.3 CTMs e fibrose pulmonar

Doenças pulmonares são causa de uma alta taxa de morbidez e mortalidade ao redor do mundo. Infelizmente, a taxa de doenças pulmonares está crescendo cada vez mais e é esperado que se torne a terceira causa de mortalidade por doenças no mundo até 2020⁽²⁴⁾.

As doenças intersticiais pulmonares (DIP) são doenças que tem em comum a inflamação do interstício (o tecido mais profundo do pulmão) e dos alvéolos. Essa inflamação dos tecidos pulmonares pode levar a consequente fibrose cicatricial, resultando em um menor funcionamento dos alvéolos e assim uma perda irreversível na capacidade pulmonar⁽²⁵⁾.

As lesões pulmonares quebram a barreira alvéolo-capilar, resultando nessa região edemas ricos em proteínas e células inflamatórias, ocorrendo assim uma menor produção de surfactante e favorecendo o colapso alveolar, que associado ao edema gera um grande prejuízo nas trocas gasosas. Em alguns pacientes, essas lesões evoluem para uma fase crônica, também denominada de fibroproliferativa, caracterizada por edema pulmonar, deposição de colágeno, inflamação crônica, fibrose e neovascularização. Pacientes que apresentam a fase crônica da doença apresentam um mau prognóstico e alta taxa de mortalidade⁽²⁵⁾.

A fase fibroproliferativa pode resultar em uma doença chamada fibrose pulmonar idiopática, que é marcada pela excessiva deposição de matriz extracelular no interstício pulmonar, resultando na obstrução das vias respiratórias e modificando a arquitetura alveolar. A fibrose pulmonar é progressiva, não responde a terapias farmacológicas, e pode resultar em morte devido a falência respiratória, necessitando urgentemente de terapias e tratamentos eficazes⁽²⁶⁾.

A administração de CTMs para o tratamento experimental de fibrose pulmonar em camundongos tem mostrado resultados bastante promissores⁽²⁷⁻²⁹⁾. Vários estudos demonstraram que CTMs podem se enxertar e/ou participar na regeneração de tecidos pulmonares, e por esse motivo transplantes com CTMs têm sido estudado como uma estratégia terapêutica na regeneração de tecidos pulmonares lesionados⁽²⁹⁻³¹⁾.

Estudos com ensaios *in vitro*, em modelos animais e em ensaios clínicos com pacientes que apresentaram doenças pulmonares demonstram que as CTMs suprimem a ativação, proliferação e funções efetoras nas respostas tanto do sistema imune inato quanto do sistema imune adaptativo, promovendo o desenvolvimento de células T-reguladoras, que são tipicamente associadas à supressão do sistema imunológico⁽³²⁻³⁶⁾.

Estudos recentes, em animais que apresentavam doenças intersticiais pulmonares, mostram que CTMs quando infundidas intrapulmonarmente ou na circulação sanguínea melhoram a função pulmonar^(29,31,37). Acredita-se que o mecanismo terapêutico das CTMs seja via fatores parácrinos, que estimulam o crescimento das células pulmonares e inibem a inflamação e a fibrose nesse tecido lesionado⁽³⁰⁾. Esses fatores parácrinos ajudam a formar um ambiente favorável à sobrevivência e proliferação das células progenitoras remanescentes nos tecidos comprometidos^(29,30).

Estes efeitos são descritos em detalhes por vários trabalhos na literatura^{24,26,27}. Por exemplo, Rojas *et al* (2005) verificaram que células oriundas de tecidos pulmonares injuriados secretam fatores que promovem a migração de moCTMs em direção ao órgão lesionado; sugerindo-se assim que estas desempenham um efeito protetor e reparador⁽³⁸⁾. Ortiz *et al* (2003), verificaram que, além do efeito protetor, as CTMs eram capazes de impedir a deposição de colágeno diminuindo a fibrose⁽³⁹⁾ e, anos mais tarde, Ortiz *et al* (2007) relacionaram tais efeitos ao bloqueio de duas citocinas pró-inflamatórias pulmonares: o TNF- α e o INF- γ 43, sendo que esta última é uma das principais citocinas detectadas em fluidos pulmonares de pacientes com síndrome do desconforto respiratório⁽⁴⁰⁾.

Um grande problema encontrado para o tratamento da fibrose pulmonar é que ela é frequentemente diagnosticada em um estágio tardio, no qual o paciente possui significativo tecido fibrótico e pouca inflamação, diminuindo o potencial imunomodulatório das CTMs e consequentemente a melhora tecidual⁽²⁶⁾.

O papel terapêutico de CTMs em doenças pulmonares se mostraram tão promissores nos ensaios pré-clínicos que já existem várias terapias com CTMs em ensaios clínicos, conforme mostra a Tabela 1⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾.

Tabela 1. Ensaios Clínicos de terapias com CTMs em Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI).

País	Doença	Tipo Celular	Dose	Frequência	Via de administração	Tempo de acompanhamento	Status	ClinicalTrials.gov
Brasil	DPOC	moCTM	1x10 ⁸	Dose única	Intravenosa	12 meses	Completo	NCT01110252
EUA	DPOC	moCTM	1x10 ⁸	4x por semana	Intravenosa	2 anos	Completo	NCT00683722
Brasil	DPOC	moCTM	*	Dose única	Endobronquial	4 meses	Completo	NCT01872624
Holanda	DPOC	moCTM	*	2x por semana	Intravenosa	8 semanas	Completo	NCT01306513
Rússia	DPOC	moCTM	2x10 ⁸	6x por ano	Intravenosa	2 anos	Recrutando pacientes	NCT01849159
Irã	DPOC	moCTM	6x10 ⁷	Dose única	Endobronquial	1 ano	*	NCT01758055
México	DPOC	adCTM	*	Dose única	Intravenosa	6 meses	Recrutando pacientes	NCT01559051
EUA	FPI	moCTM	2x10 ⁷	Dose única	Intravenosa	60 semanas	Em andamento	NCT02013700
Espanha	FPI	moCTM	*	*	Endobronquial	12 meses	Recrutando pacientes	NCT01919827
Austrália	FPI	CTM de placenta	2x10 ⁶	Dose única	Intravenosa	6 meses	Completo	NCT01385644

*Dados não disponíveis.

É interessante ressaltar, que dentre tais estudos mostrados na Tabela 1, o primeiro a ser realizado foi no Brasil, e embora o estudo tenha sido feito apenas com quatro pacientes, estes não apresentaram nenhum efeito colateral e mostraram uma melhora significativa na qualidade de vida e uma melhor estabilidade no quadro clínico. Tais resultados foram essenciais para que novos estudos estejam sendo feitos ao redor do mundo, a fim de elucidar o papel, eficácia e segurança das terapias com CTMs em doenças pulmonares⁽⁴¹⁾.

Hoje em dia, existem várias técnicas que levam a indução de fibrose pulmonar em modelos animais, cada qual com suas vantagens e desvantagens. As principais técnicas utilizadas são administração de isotiocianato de fluoresceína (FITC); exposição à irradiação; instilação de sílica; introdução permanente de genes de modo a criar animais geneticamente modificados; administração de bleomicina, entre outros⁽⁴⁶⁾.

O modelo animal mais utilizado em roedores para o estudo da fibrose pulmonar é o induzido pela bleomicina. Neste modelo, o processo de patogênese da fibrose pulmonar possui alterações bioquímicas e morfológicas semelhantes as observadas em pacientes humanos⁽⁴⁷⁾.

Embora existam muitos estudos com CTMs e doenças pulmonares, não há um consenso sobre a melhor via de administração dessas células em modelos animais. Ainda existem muitas lacunas no estudo das terapias com CTMs em modelos de doenças pulmonares, como qual é a melhor rota de administração dessas células: intratraqueal, intranasal, intrapulmonar, intravenosa ou intra-arterial. Também não estão definidos: i) a dose adequada de CTMs a ser

administrada, ii) a importância do momento ideal de administração, iii) os efeitos a longo prazo^(48,49); e iv) o exato mecanismo de ação.

Estudos pré-clínicos mostraram que a injeção de CTMs por via intratraqueal (Figura 1) melhoraram a estrutura alveolar e vascular e atenuaram a inflamação, resultando em uma diminuição da fibrose e melhora do funcionamento pulmonar⁽⁵⁰⁻⁵³⁾. Porém, não há relatos na literatura sobre a eficácia no tratamento de doenças pulmonares com a administração de CTMs por via intranasal (Figura 1), visto que na pneumologia essa via seria mais direta e menos invasiva⁽⁵⁴⁾.

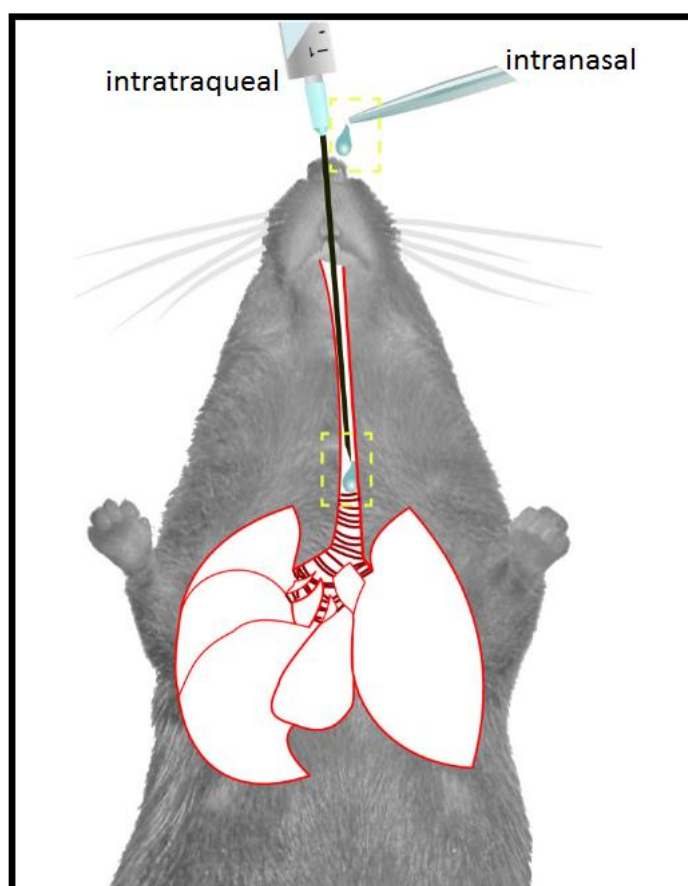


Figura 1. Representação da técnica não-cirúrgica de instilação intratraqueal e intranasal em camundongos. Cateteres intravenosos atuam como sondas que permitem a administração de líquidos em região próxima à traqueia. Adaptado de Munder *et al.* (2011)⁽⁵⁵⁾.

A alta mortalidade da fibrose pulmonar requer que novas terapias mais efetivas no reparo do tecido pulmonar lesionado sejam adotadas. A restauração da barreira alvéolo-capilar, a modulação do processo inflamatório e da fibrose em longo prazo são objetivos da terapia com CTMs em doenças intersticiais pulmonares^(40,41).

1.4 Traçadores magnéticos e táticas para mobilização via campo magnético

A marcação celular é um método muito utilizado nas pesquisas biomédicas, com ela é possível avaliar a integridade funcional e morfológica das células transplantadas e determinar sua atividade proliferativa e migratória sem alterar a sua viabilidade ou capacidade funcional. O uso de nanopartículas como marcadores celulares tem atraído cada vez mais atenção dos pesquisadores⁽⁵⁶⁾.

A vantagem das nanopartículas é que algumas podem ser monitoradas a longo prazo, permitindo imagens repetidas ao longo do tempo. Há vários métodos de imagens que visualizam nanopartículas, como por exemplo, a tomografia computadorizada (TC), tomografia de emissão de pósitron (PET), tomografia computadorizada de emissão de um fóton (PECT), imagem por ressonância magnética nuclear (MRI) e colorações histológicas específicas⁽⁵⁶⁾.

Nanopartículas de óxido de ferro vem sendo utilizadas cada vez mais para pesquisas na área de biomedicina, o principal motivo para isso é que essas nanopartículas têm se mostrado não-tóxicas em estudos com modelos animais. Dentre as nanopartículas de óxido de ferro, podemos citar a maghemita (γ -Fe₂O₃) e a magnetita (Fe₃O₄)^(57,58).

Além de serem pouco tóxicas, tais nanopartículas são biocompatíveis e magnéticas (superparamagnéticas)⁽⁵⁹⁾. Para serem consideradas ideais para o uso em pesquisas devem ser fabricadas de maneira controlada, sendo permitido fazer novos lotes similares sempre que preciso.

A classificação em nanopartículas superparamagnéticas depende do campo de estudo e de sua aplicação. No campo da medicina e biologia, o que determina sua nomenclatura é o tamanho. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro de diâmetro entre 50 e 80 nm são classificadas como SPIONS (*superparamagnetic iron oxide NPs*), de 10 a 50 nm são classificadas como USPIONS (*ultra-small superparamagnetic iron oxide NPs*) e com diâmetro menor que 10 nm são classificadas como VSPIONS (*very small superparamagnetic iron oxide NPs*)^(60,61).

Fluidos de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro na presença de um campo magnético externo apresentam magnetização e, após a retirada deste campo, o fluido volta para seu estado não magnetizado^(62,63). Tais propriedades permitem que essas nanopartículas de óxido de ferro ajam como marcadores celulares específicos na utilização de campos magnéticos para experimentos *in vivo*⁽⁶⁴⁾. Direcionar as células marcadas após sua

implantação, por meio de utilização de ímãs externos posicionados sobre o órgão-alvo, permite aprimorar o “homing” (migração para o órgão alvo) destas células nos locais de interesse^(65,66). A habilidade de manipular e direcionar células para sítios específicos tem grande importância no campo da biomedicina e medicina regenerativa.

Estudos estão utilizando a técnica de mobilização magnética para terapias com vários tipos celulares, como CTMs, células-tronco hematopoiéticas, progenitores de células neurais, progenitores de células endoteliais e células epiteliais da retina⁽⁶⁷⁻⁷²⁾.

A internalização de nanopartículas magnéticas por CTMs pode ser realizada por diferentes maneiras, como endocitose, fagocitose, difusão passiva e macropinocitose⁽⁷³⁾. O tamanho, a forma e a superfície da nanopartícula influencia a quantidade que a célula captura, o mecanismo desta captura e a região celular em que essa partícula vai ficar acumulada^(60,74).

Devido à falta de capacidade fagocitária das CTMs, eficientes marcações com nanopartículas de óxido de ferro podem ser problemáticas. Para intensificar a captura de nanopartículas em maiores concentrações e assim potencializar o efeito da nanopartícula na terapia desejada é preciso funcionalizar as nanopartículas de modo que elas interajam melhor com a célula⁽⁷³⁾.

O citrato é um polímero de revestimento biocompatível usado como um monômero aniônico que melhora a captura celular de nanopartículas⁽⁷⁵⁾. Ele possui uma alta carga negativa que modifica a superfície da nanopartícula de ferro e cria uma forte afinidade entre a nanopartícula e a célula, que é traduzida como uma melhor internalização dessas nanopartículas pela célula⁽⁷³⁾.

As nanopartículas magnéticas vem sendo usadas como uma eficiente estratégia para induzir migrações de CTMs para regiões lesionadas na presença de ímãs. Estudos mostram que, quando submetidas a campos magnéticos não uniformes, as CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas são atraídas pelo ímã^(52,53,54). Dessa forma, é possível direcionar um maior número de CTMs para locais de lesões e inflamações, possibilitando um aumento na eficiência do tratamento e minimizando efeitos sistêmicos indesejados⁽⁴⁸⁾.

No estudo de Tukmachev *et al.* (2015), foram usadas CTMs marcadas com nanopartículas de ferro revestidas por poly-L-lysine para tratar lesões na coluna espinhal de ratos. O experimento consistiu em comparar grupos que receberam: 1) CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas submetidas a um campo magnético, 2) CTMs não marcadas com nanopartículas magnéticas submetidas a um campo magnético e 3) CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas, porém não submetidas a um campo magnético. Para criar o campo

magnético, eles usaram dois ímãs cilíndricos de NdFeB, com polos iguais de frente para o outro, na direção da região alvo. O resultado do estudo mostrou que o grupo 1, que continha CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas submetidas a um campo magnético, apresentou eficiência de migração celular para o sítio de injúria de 45%, enquanto o grupo 2 apresentou uma eficiência somente de 14% e o grupo 3 de 13%⁽⁷⁶⁾.

No estudo de Yanai *et al* (2012), CTMs marcadas com nanopartículas do tipo SPIONs foram utilizadas no tratamento de um modelo de doenças de degeneração da retina em ratos. Neste estudo eles utilizaram um ímã em forma de disco de boro e neodímio banhado a ouro para produzir um campo magnético no sítio alvo. Foram comparadas duas vias de administração, a via intravitreal (injeção pelo olho) e a via intravenosa pela veia caudal. O resultado desse estudo mostrou que a via intravitreal apresentou 20% de cobertura no hemisfério superior da retina, e a enxertia de CTMs aumentou de 9.600 para 355.500 células quando utilizados campos de mobilização magnética. A via intravenosa apresentou 2,48% de cobertura do hemisfério superior da retina, e um aumento de 4.000 para 42.000 CTMs quando utilizados campos de mobilização magnética⁽⁶⁶⁾.

Tais resultados mostram que a mobilização magnética de CTMs marcadas com nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas são eficientes e melhoram a migração, o *homing* e a enxertia dessas células nos locais de injúria. Muitos estudos apresentam essa técnica para terapias em tecidos cardíacos, na coluna espinhal, em lesões oculares, em lesões no fígado, entre outros^(67-69,71,72), porém, não foi encontrado na literatura nenhum estudo que fez mobilização magnética de CTMs para tratamento de injúrias pulmonares.

1.5 Força Magnética

A força de atração entre as nanopartículas magnéticas e o gradiente do campo magnético é governado pela seguinte equação:

Equação 1. Equação da Força Magnética.

$$\vec{F}_{mag} = \vec{\nabla} (\vec{m}_o \cdot \vec{B})$$

Onde \vec{F}_{mag} é a força gerada por um carreador magnético com um momento magnético \vec{m} , \vec{B} é o campo magnético total, e $\vec{\nabla}$ é o gradiente que atua sobre o produto interno do momento magnético com o campo magnético. Especificamente no nosso experimento podemos considerar \vec{m} como sendo homogêneo, conseqüentemente a força magnética dependerá de $\vec{\nabla}B$. Em outras palavras, dependerá da variação espacial do campo magnético. A força magnética será maior nas regiões de maior gradiente. Por exemplo, para um ímã cilíndrico a região de maior força serão as bordas do mesmo, resultando em uma figura anelar para a distribuição do material submetido a esta força. O modo de modificar a geometria do campo de força magnética consiste em alterar a geometria do campo magnético, o que pode ser realizado experimentalmente com a adição de partículas ferromagnéticas na região de influência do ímã principal⁽⁷³⁾.

O posicionamento de esferas de tungstênio, que é um material ferromagnético, ao redor de um ímã cilíndrico modifica a distribuição das linhas de campo ($\nabla\vec{B}$), mudando assim a simetria do campo magnético (\vec{B}).

A mudança na simetria de um campo magnético altera a distribuição de fluidos de nanopartículas magnéticas submetidas a este campo. Quando submetido ao campo externo de um único ímã cilíndrico, as nanopartículas magnéticas formam um anel concentrado na região de borda do ímã, porém com a alteração do gradiente de campo causada pela presença do tungstênio, essas nanopartículas se distribuem de maneira mais uniforme por toda a região do arranjo de ímã e esferas de tungstênio⁽⁷³⁾.

Sistemas de mobilização magnética necessitam de um campo magnético e de gradientes de campo⁽⁷³⁾. Nesse estudo, o papel do gradiente de campos magnéticos é atrair e posicionar CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas para o local da lesão.

Modificar o gradiente de campo com as esferas de tungstênio, em teoria, permite que a mobilização magnética de CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas seja mais eficiente, pois com isso se modificaria a distribuição dessas células no local da injúria, aumentando assim o diâmetro e homogeneidade de distribuição⁽⁷³⁾.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral deste projeto é investigar a viabilidade de utilização de mobilização magnética de CTMs humanas no modelo de fibrose pulmonar induzido por bleomicina em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Objetivos específicos *in vitro*:

- Determinar o melhor arranjo de esferas de tungstênio ao redor de um ímã para produzir a geometria de força mais apropriada para o presente estudo.
- Avaliar se um campo magnético formado por um ímã cilíndrico que sofre interferência de esferas de tungstênio é capaz de atrair mais adCTMs do que um campo magnético sem as esferas de tungstênio.

2.2.2 Objetivos específicos *in vivo*:

- Avaliar a eficácia da mobilização magnética de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato para aumentar o homing destas para pulmões fibróticos, e avaliar, conseqüentemente, a eficácia terapêutica desta estratégia.

- Avaliar se as modificações no campo magnético alteram a migração e retenção de adCTMs no tecido lesionado. Avaliar se uma maior retenção de adCTMs no tecido lesionado melhoram a regeneração desse tecido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato

A síntese das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato (nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato) aconteceu no laboratório da Profa. Dra. Emília Celma de Oliveira Lima, no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

As nanopartículas foram sintetizadas através de uma mistura estequiométrica de cloreto de ferro (FeCl₃) e sulfato ferroso (FeSO₄) em um meio aquoso e precipitadas com solução de hidróxido de sódio (NaOH). Inicialmente, foram dissolvidos 16,2 g (0,06 mol) de FeCl₃.6H₂O e 8,4 g (0,03 mol) de FeSO₄.7H₂O em 300 mL de água destilada contendo 1,3 mL de HCl concentrado para baixar o pH da solução para 1,5. Em seguida, a amostra foi aquecida até o ponto de fervura. Após o aquecimento, foi acrescentado por gotejamento 11g (0,25 mol) de NaOH aquoso sob constante agitação para se dar o início da precipitação. A amostra ficou sob agitação por 10 min.

Após a precipitação obtivemos nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄). A reação química de formação de Fe₃O₄ é dada por:



A precipitação de Fe₃O₄ ocorreu em pH entre 8-14, com uma relação estequiométrica de 2:1 (Fe³⁺: Fe²⁺).

Após a precipitação, ocorreu a lavagem da amostra com água destilada através do processo de separação precipitado/sobrenadante pelo meio de decantação do precipitado com a ajuda de um ímã. Para verificar se a amostra ainda apresentava sulfato livre, foram realizados

testes do sobrenadante com cloreto de bário até constatar-se que este não apresentava mais resquício de sulfato.

Após a lavagem da amostra, o pH foi ajustado para 1,5 e a amostra aquecida sob agitação para oxidar. Para ajudar no processo de oxidação a amostra foi borbulhada com gás oxigênio por 12 h. Após a oxidação, a amostra mudou de cor, passando de uma coloração marrom escuro para marrom avermelhada, indicando que a amostra de magnetita (Fe_3O_4) se oxidou em maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

A funcionalização da nanopartícula de maghemita foi feita com a adição de 5 g (0,016 mol) do sal citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) dissolvido em 100 mL de água destilada. Após a adição do citrato, a amostra foi ultrasonicada 3 vezes por 2 minutos. Para separar frações de nanopartículas agregadas, a amostra foi centrifugada 2 vezes por 5 min em uma velocidade de 2000 rpm e teve o pellet descartado. Para reduzir o volume e concentrar a amostra, esta foi purificada por meio de diálise. A amostra final apresentou uma concentração de 4,6 mg de ferro por mL e foi autoclavada para utilizações em estudos *in vivo*.

3.2 Caracterização das nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato

Para determinar a forma e o tamanho médio das nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato, foi realizada análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tal, alíquotas de 20 μL da formulação diluídas em 980 μL de água Milli-Q foram colocadas em telinhas de cobre de 300 mesh previamente cobertas com resina Formvar® e deixadas para secar durante uma noite dentro de placas de Petri, sendo depois analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão a 80 KV (JEOL 1011).

Para os testes de avaliação da estabilidade coloidal, as variáveis como o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial Zeta (Ptz) foram analisadas no equipamento Zetasizer (ZS90).

Os dados referentes ao diâmetro hidrodinâmico (DH) e índice de polidispersão (PDI) foram obtidos por dispersão dinâmica da luz (DSL), que é uma medida que envolve direcionar um feixe de laser para uma amostra altamente diluída e contabilizar a luz espalhada em um

fotomultiplicador posicionado em um determinado ângulo⁽⁷⁷⁾, e o potencial zeta (Ptz) foi obtido por dispersão de luz eletroforética em Zetasizer (ZS90).

3.3 Obtenção das adCTMs de lipoaspirado

As adCTMs foram obtidas de lipoaspirado em conjunto com o médico cirurgião Dr. Carlos Augusto Carpaneda. As amostras de gordura foram coletadas pelo Dr. Carlos Augusto Carpaneda na Clínica Carpaneda de Cirurgia Plástica de forma estéril. Após a coleta, a amostra de gordura foi encaminhada para o laboratório de células-tronco no departamento de genética e morfologia – UnB – IB, onde foram incubadas com a enzima colagenase tipo IV (Science Pro) na concentração de 0,5 mg/mL em estufa a 37°C. Depois de 3h, a colagenase foi inativada com Soro fetal bovino e centrifugada por 10 minutos, sob força centrífuga relativa de 500 g. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspendido em meio de cultura (DMEM-LG (Low-Glucose Dulbeccos Modifiedagles Medium – GIBCO), 10% de SFB (soro fetal bovino), antibiótico streptomina (5 uL/mL) e L-glutamina (10 uL/mL) a 5%) e plaqueado em 8 garrafas de cultura, que foram mantidas em estufas a 5% CO₂ e 37°C. Quando atingiram a confluência de 90% as CTMs de lipoaspirado foram congeladas em uma solução de 5% de DMSO (Dimethyl sulfoxide) e estocadas no nitrogênio líquido do Departamento de Genética e Morfologia da UnB – Brasília.

Os experimentos foram feitos sempre utilizando adCTMs na terceira passagem e na confluência de 80%.

3.4 Animais

Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, com oito semanas de idade, foram mantidos no biotério do Departamento de Genética e Morfologia (GEM-IB- UnB) com temperatura controlada (aproximadamente 23°C), ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas e os animais receberam água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais com os animais foram

aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB) (certificado 99769/2012).

Foram utilizados camundongos (machos e fêmeas) com idade de 3-6 meses.

3.5 Simulação do comportamento do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato em diferentes campos magnéticos

Para estabelecer a melhor distribuição possível do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, foram testados vários arranjos entre ímãs e esferas de tungstênio.

Para isso, foi fotografada a distribuição do fluido ao decorrer do tempo quando submetido a diferentes campos magnéticos, com 1, 2, e 4 ímãs cilíndricos de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, e posteriormente com 1 ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura e de 1 a 5 esferas perfeitas feitas de pó de carboneto de tungstênio com 1,6 mm de diâmetro.

Em uma placa de Petri de 5,5 cm de diâmetro foi colocado 2 mL do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, que foi apoiada sobre uma base de acrílico com 1, 2 ou 4 ímãs cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, conforme mostra a Figura 2. A distribuição do fluido foi fotografada após a estabilização.

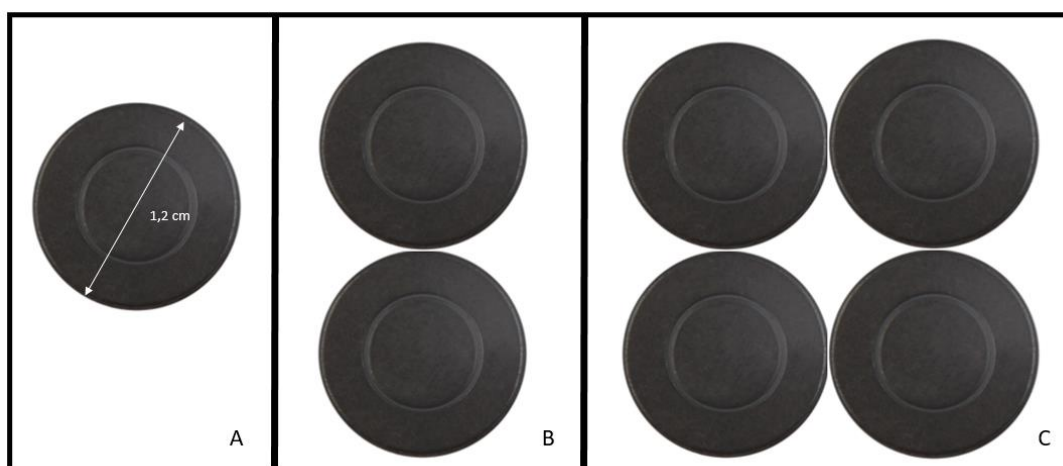


Figura 2. A) arranjo de um único ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, B) arranjo com dois ímãs cilíndricos de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, C) arranjo com quatro ímãs cilíndricos de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura.

Para os arranjos de ímãs e esferas de tungstênio, a placa de Petri de 5,5 cm de diâmetro contendo 2 mL do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato foi colocada sobre o suporte de acrílico onde no centro continha um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, e 0, 1, 2, 3, 4, ou 5 esferas de tungstênio ao redor desse ímã. Foi fotografada a distribuição do fluido após este se estabilizar. O arranjo ímã e esferas de tungstênio está representado na Figura 3.

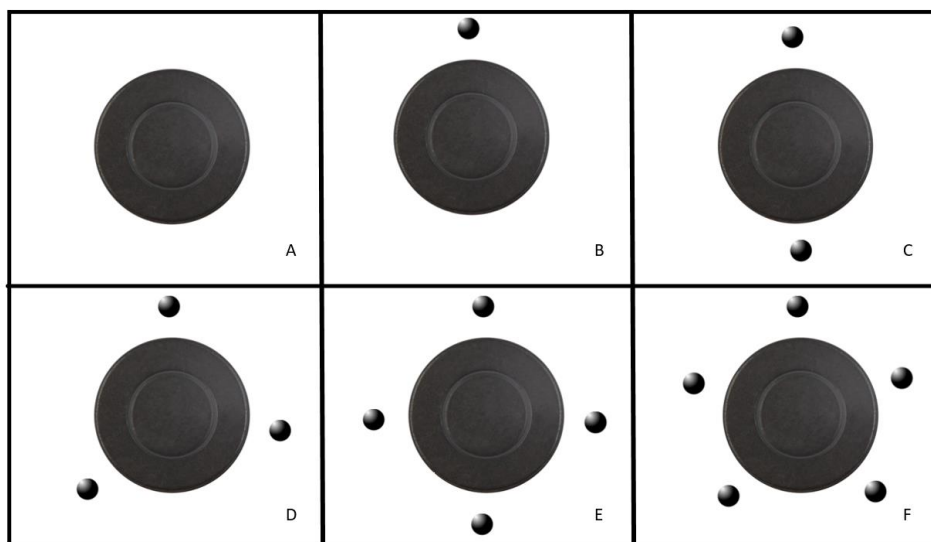


Figura 3. Arranjos ímãs/esferas de tungstênio. **A)** somente o ímã; **B)** arranjo de um ímã com uma única esfera de tungstênio ao redor; **C)** arranjo de um ímã rodeado por duas esferas de tungstênio; **D)** arranjo de um ímã rodeado por três esferas de tungstênio; **E)** arranjo de um ímã rodeado por quatro esferas de tungstênio; e **F)** arranjo de um ímã rodeado por cinco esferas de tungstênio.

3.6 Marcação das CTMs com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato

As adCTMs foram marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato na concentração de 0,08 mg/ml. Para isso, as nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato foram adicionadas junto ao meio de cultura DMEM-LG (Low-Glucose Dulbeccos Modifiedagles Medium – GIBCO), 10% de SFB (soro fetal bovino), antibiótico streptomina (5uL/mL) e L-glutamina (10uL/mL). As células ficaram em contato com o meio de cultivo adicionado de nanopartículas de maghemita por 24h. Após as 24h, as placas de cultura foram lavadas 3 vezes com PBS estéril e receberam nova adição de meio de cultivo ou então foram dissociadas para eventual uso.

3.7 Mobilização magnética de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato

Em uma garrafa de cultivo de 75 cm², foi fixado na extremidade direita um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, e na extremidade esquerda foi fixado um ímã de mesmas propriedades rodeado por 5 esferas de tungstênio (Figura 3F). As adCTMs foram marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato na concentração de 0,08 mg/mL 24 horas antes do procedimento e plaqueadas na garrafa com o ímã e o arranjo ímã/5esferas de tungstênio e incubadas em estufa a 37° durante 12 horas. Após esse tempo, a migração das adCTMs em direção as extremidades com os ímãs foi analisada.

3.8 Indução da lesão pulmonar

O modelo animal de fibrose pulmonar foi induzido por sulfato de bleomicina (0,15 mg) (Meizler) em soro fisiológico estéril, numa dose de 6 UI/kg, com administração intratraqueal em camundongos machos e fêmeas da cepa C57Bl/6 sob efeito de uma solução anestésica composta por ketamina 50 mg/kg e xilazina 5 mg/kg. Para tal foram utilizados cateteres intravenosos (INJEX), de calibre 0,7 por 19 mm, que atuaram como pequenas sondas intratraqueais, inseridas a partir da boca dos animais, passando pela laringe e atingindo a traqueia.

Cada animal recebeu 30 uL da solução contendo sulfato de bleomicina e soro fisiológico estéril, com exceção do grupo controle que recebeu 30 uL apenas de soro fisiológico estéril.

3.9 Administração das adCTMs nos animais

Um dia após a indução da lesão pulmonar com a bleomicina, os grupos de camundongos receberam a infusão de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato através da via

intranasal, com exceção do grupo controle saudável, que recebeu apenas PBS. Para a infusão, as células foram ressuspensas em 40 uL de PBS com a concentração de 1×10^6 células.

Algumas horas antes da infusão, as adCTMs marcadas com as nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato foram dissociadas das placas de cultura, lavadas 3 vezes com PBS estéril e ressuspensas em PBS estéril para a obtenção de uma suspensão.

No experimento tiveram 7 grupos de animais, com n=3, conforme mostra a Tabela 2. O grupo 1 foi o grupo controle saudável, no qual os animais receberam soro fisiológico estéril no dia 1 e infusão de PBS no dia 2. Os animais do grupo 2 foram o controle de adCTM, e receberam a administração apenas das CTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2. No grupo 3, os animais foram o controle de fibrose, no qual os animais receberam administração apenas do sulfato de bleomicina no dia 1. No grupo 4 (CTM), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2. No grupo 5 (CTM + Ímã), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2 e tiveram um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, colado ao seu peito, sobre a região pulmonar. No grupo 6 (CTM + Tungstênio), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2 e tiveram 5 esferas de tungstênio coladas na região peitoral, sobre a região pulmonar. No grupo 7 (CTM + Ímã/Tung), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2 e tiveram um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura rodeado por 5 esferas de tungstênio colado na região peitoral.

Tabela 2. Tabela dos grupos de animais utilizados no experimento.

Grupo	1	2	3	4	5	6	7
	Controle saudável	Controle CTM	Controle fibrose	CTM	CTM + Ímã	CTM + Tungstênio	CTM + Ímã/Tung
Soro Fisiológico	+						
Bleomicina			+	+	+	+	+
CTMs com ferro		+		+	+	+	+
Ímã					+		+
Tungstênio						+	+

3.10 Aplicação do ímã e do tungstênio na região pulmonar

Para gerar um campo magnético e induzir a mobilização magnética das adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, os animais dos grupos 5 (Ímã) ,6 (tungstênio) e 7(Ímã/Tung) tiveram respectivamente:

Grupo 5) um ímã externo de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, apoiado sobre a região pulmonar com uma fita adesiva.

Grupo 6) cinco esferas de tungstênio, formando um arranjo pentágono regular coladas na região peitoral com uma fita adesiva.

Grupo 7) um ímã externo de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, rodeado por 5 esferas de tungstênio apoiado sobre a região pulmonar com uma fita adesiva.

Os animais ficaram imobilizados com os ímãs e/ou esferas de tungstênio por 1h, tempo equivalente ao efeito da anestesia.

3.11 Análise histológica

Foram feitas análises histológicas dos pulmões, baço e fígado dos animais tratados. Os grupos de animais foram sacrificados 7 dias após a infusão de adCTMs.

3.11.1 Coleta e Fixação

Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram cuidadosamente coletados com material cirúrgico apropriado. Estes foram rapidamente levados a uma solução fixadora constituída por paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (0,1 M) e ali mantidos durante 03-04 horas a temperatura ambiente.

3.11.2 Desidratação, inclusão e corte

Os pulmões murinos foram desidratados, a temperatura ambiente, com etanol em uma série de concentrações crescentes, a 70, 80 e 90%, durante 1 hora cada, e 3 vezes de 1 hora a 100%. Em seguida foram colocados em uma solução 1:1 de álcool e xilol por 1 hora, seguido por 3 banhos em xilol puro de 45 minutos cada. Para a inclusão, o material foi submetido a 3 banhos de parafina a 60°C. Por último, os órgãos foram montados em blocos de parafina e moldados por formas de inclusão.

Após a solidificação dos blocos, foi utilizado um micrótomo Leica RM2125 para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Cada órgão foi cortado em sua totalidade, em cortes semi-seriados. Neste procedimento, para cada corte aproveitado, outros dez em sequência foram desprezados, totalizando um intervalo de aproximadamente 50 µm entre os cortes aproveitados. Cada corte foi montado em lâminas de vidro, as quais foram mantidas em estufa a 37°C, para melhor aderência dos cortes nas lâminas.

3.11.3 Coloração

As lâminas com os cortes foram submetidas a um processo de hidratação, com banhos em 3 soluções de xilol (1 minuto cada), 3 soluções de álcool 100% (1 minuto cada), álcool 90%, 80% e 70% (1 minuto cada).

Para a coloração por hematoxilina e eosina (H&E), as lâminas foram colocadas em hematoxilina durante 1 minuto e dez segundos e posteriormente em eosina durante dois minutos (após breve banho em água corrente).

Para a coloração pelo método de Perls (a fim de detectar ferro), as lâminas foram lavadas em água destilada por 1 minuto, depois coradas em uma solução de ferrocianeto de potássio a 10% por 5 minutos; coradas numa solução 1:1 de ferrocianeto de potássio a 10% e ácido clorídrico a 10% durante 10 minutos, seguido por duas lavagens em água destilada; contracoradas na solução vermelho neutro por 15 minutos; lavadas com água corrente por 3 minutos.

3.11.4 Montagem

Depois da coloração, o material foi desidratado em uma concentração crescente de álcool 70%, 80%, 90%, 100% (3 vezes) e xilol puro (3 vezes). Após o último banho de xilol, as lâminas foram recobertas com lamínulas utilizando-se verniz incolor, e colocadas para secar a temperatura ambiente por 24 horas. As lâminas foram analisadas e fotografadas no microscópio EVOS Cell Imaging System.

3.12 Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados como média +- DP (desvio padrão) e estatisticamente avaliados por teste t Student. Será considerado significante $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato

As nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato foram caracterizadas quanto ao seu tamanho médio, formato, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e quanto ao potencial zeta.

4.1.1 Tamanho e Formato

As imagens da Figura 4 foram obtidas por MET e conforme mostra esta figura as nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato se apresentam homogêneas, com forma esféricas e diâmetro médio de 9 nm.

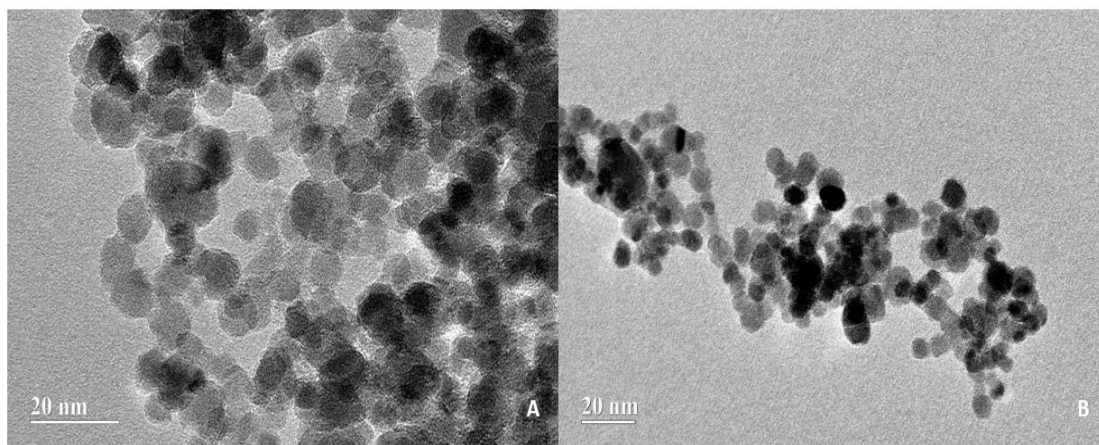


Figura 4. Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato.

4.1.2 Diâmetro Hidrodinâmica e Índice de Polidispersão (PDI)

O diâmetro médio das nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato foi medido pelo método de espalhamento dinâmico de luz (DLS- *Dynamic Light Scattering*). A análise por DLS das nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, representado na Figura 5, avaliou o tamanho das partículas em dispersão aquosa. O diâmetro hidrodinâmico (DH) das nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato apresentou bons resultados para as distribuições por volume (Figura 5A), diâmetro (Figura 5B) e por número (Figura 5C). O valor de Z-average – medida que leva em consideração também as distribuições de volume e intensidade – foi de 113,6 nm.

O índice de polidispersão (PDI) é um parâmetro calculado pela análise da função de autocorreção das medidas de espalhamento dinâmico de luz. O PDI das amostras nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato é de 0,148.

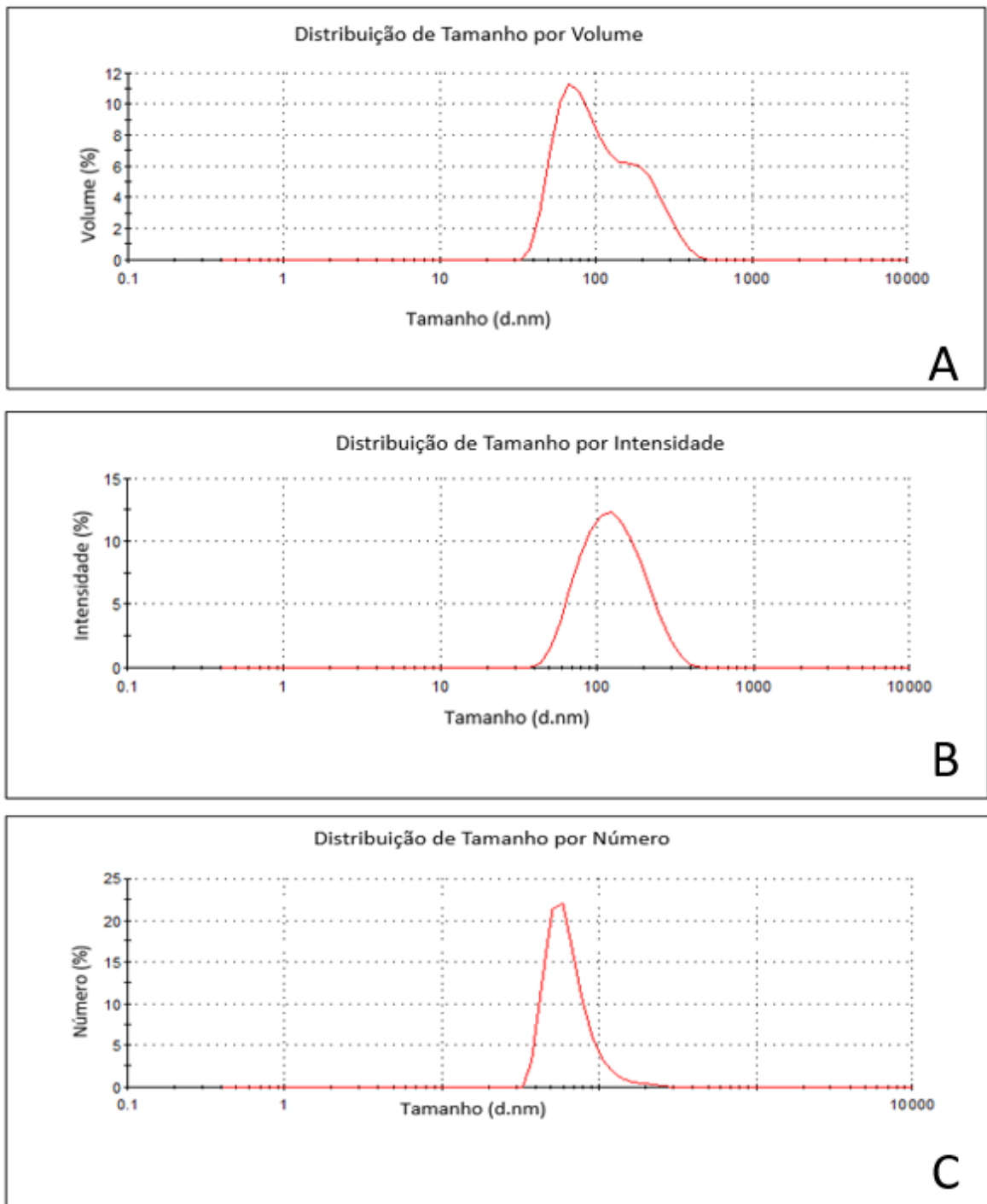


Figura 5. Gráficos da distribuição de tamanho por: **A)** volume; **B)** intensidade e **C)** número das nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato em meio aquoso.

4.1.3 Potencial Zeta

Na Figura 6, está representado o potencial Zeta das nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato. Conforme dados obtidos da Figura 6, o potencial zeta da nanopartícula é de -51,5 mV, o que demonstra que a superfície dessas partículas está carregada negativamente em meio aquoso.

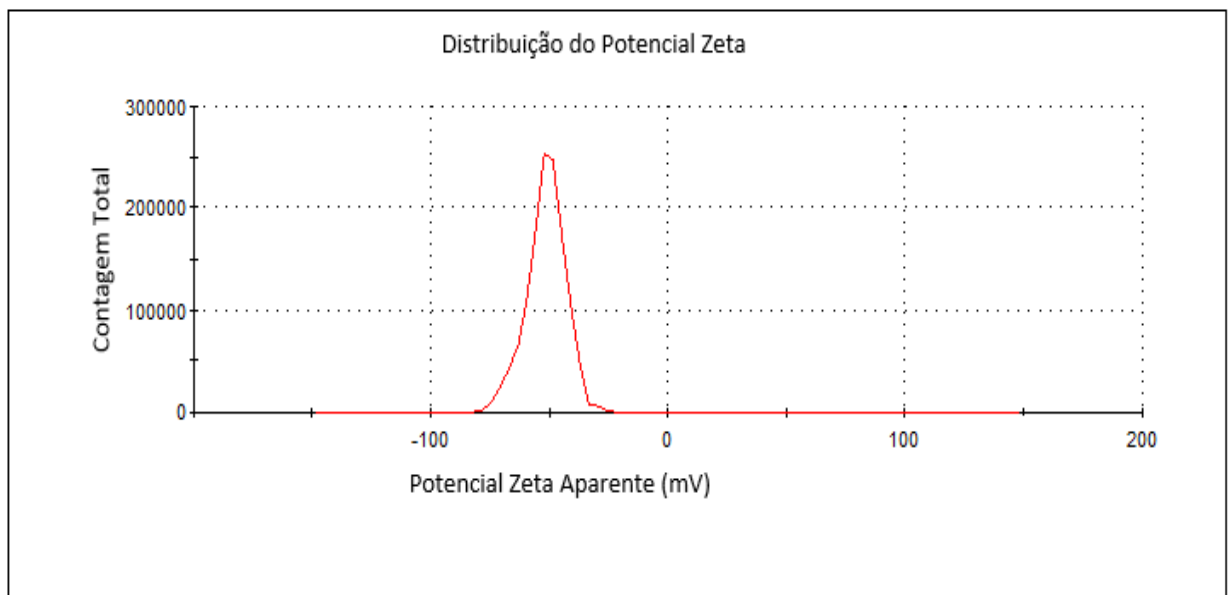


Figura 6. Gráfico do potencial zeta da nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato.

4.1.4 Estudo do comportamento do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato em presença do ímã e das esferas de tungstênio

Fluidos de nanopartículas magnéticas se distribuem de maneira diferente se submetidos a geometrias de campos magnéticos diferentes. Devido a isso, vários arranjos foram testados a fim de garantir a melhor distribuição do fluido magnético de nanopartículas para o tratamento da fibrose pulmonar com adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato. O arranjo

ideal deve fazer com que o fluido cubra uma área equivalente ao pulmão do animal, garantido assim que mais células cheguem e se distribuam neste órgão.

Na Figura 7, observamos a distribuição do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato quando submetido a um campo magnético de um ou mais ímãs cilíndricos de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura. Na Figura 7, a letra A representa a distribuição do fluido na presença de um único ímã, a B mostra a distribuição do fluido na presença de um arranjo de dois ímãs, e a C na presença de 4 ímãs.

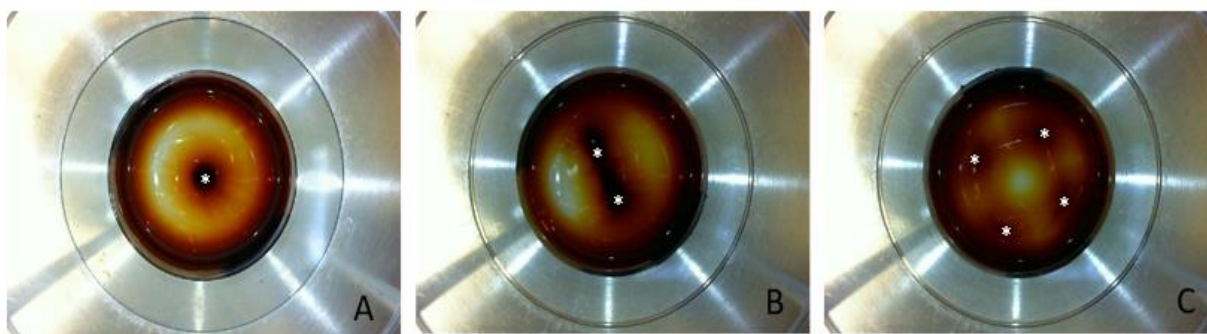


Figura 7. Distribuição do fluido magnético de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato submetidas a um campo magnético **A)** de um único ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, **B)** com dois ímãs e **C)** com quatro ímãs. O asterisco se refere a posição dos ímãs.

Devido ao tamanho e anatomia dos camundongos que receberam a terapia, foi escolhido o arranjo com apenas um ímã. Na presença de um único ímã (Figura 7 A), a distribuição do fluido magnético de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato teve um diâmetro de aproximadamente 1,2 cm, tamanho similar à área pulmonar de um camundongo. No arranjo com dois e quatro ímãs (Figura 7 B e C), a área de distribuição do fluido corresponde a uma área muito maior do que a área de região peitoral dos camundongos usados para os ensaios in vivo, por este motivo tais arranjos não foram utilizados.

Na Figura 8, temos os arranjos com um único ímã e diferentes quantidades de esferas de tungstênio. As esferas de tungstênio além de serem ferromagnéticas, ou seja, também funcionarem como ímãs, exercem uma força não nula sobre o ímã, aumentando a área de distribuição do fluido para o arranjo ímã/esferas de tungstênio.

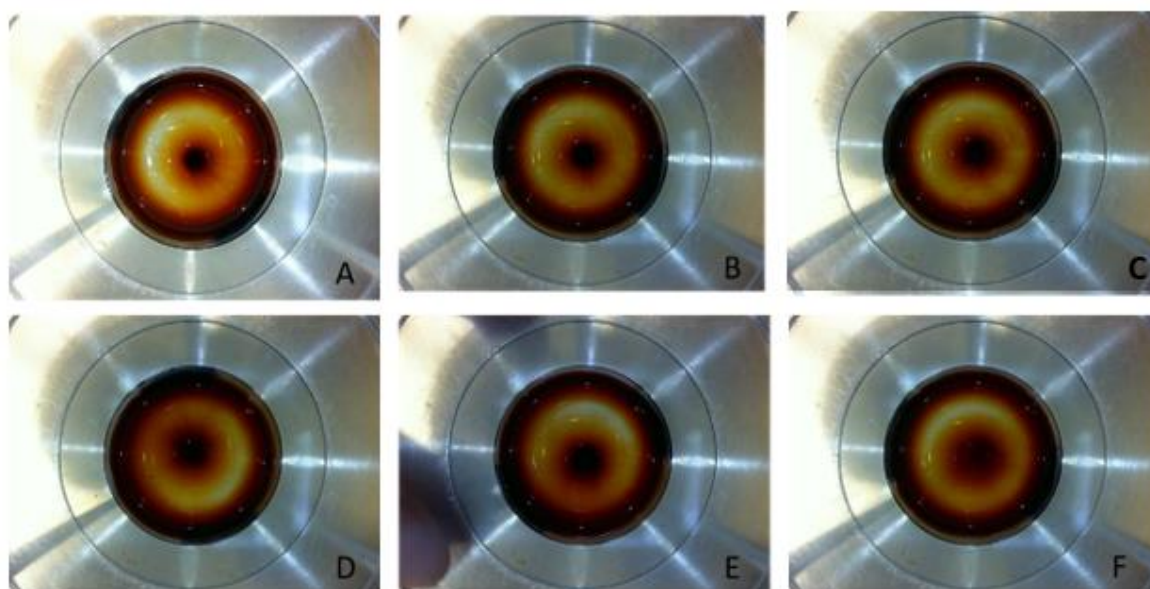


Figura 8. Distribuição do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato na presença: **A)** do ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, **B)** do ímã e uma esfera de tungstênio, **C)** do ímã e duas esferas de tungstênio **D)** do ímã e três esferas de tungstênio **E)** do ímã e quatro esferas de tungstênio e **F)** do ímã e cinco esferas de tungstênio.

É possível observar nas figuras acima que, quando o fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato é colocado na presença do ímã, ele se concentra inteiramente na região equivalente à do ímã, porém, quando esse mesmo fluido está na presença do ímã e de esferas de tungstênio, o fluido se espalha, abrangendo uma região com maior diâmetro e uma distribuição mais homogênea. Conforme mostrado na Figura 8, quando o fluido é submetido ao campo magnético só do ímã (A) ele se distribui numa região de aproximadamente 1,2 cm de diâmetro, equivalente ao diâmetro do ímã, porém na presença de apenas uma esfera de tungstênio (B) esse diâmetro de distribuição já é maior, sendo aproximadamente de 1,5 cm. Quando arranjado com 2 esferas de tungstênio (C), o diâmetro da distribuição do fluido é de aproximadamente 1,6 cm; com 3 esferas (D) aproximadamente 2,2 cm; com 4 esferas (E) aproximadamente 2,5 cm e por fim; com um arranjo contendo 5 esferas de tungstênio ao redor do ímã a distribuição do fluido foi de aproximadamente 3 cm de diâmetro, se mostrando mais uniforme por todo o espaço em que se distribuiu.

A Figura 9 mostra a comparação dos diâmetros de distribuição do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato na presença de um ímã com 0, 1, 2, 3, 4 e 5 esferas de tungstênio. O círculo central representa o diâmetro de distribuição do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato somente na presença do ímã, e os seguintes círculos representam a distribuição

do fluido de nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato na presença do ímã e 1, 2, 3, 4 e 5 esferas de tungstênio, conforme mostra a legenda. Os diâmetros da distribuição do fluido com 1 e 2 esferas de tungstênio são muito similares, sem uma diferença significativa entre os dois. Entretanto, o diâmetro de distribuição do fluido de nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato foi significativamente maior quando submetido a um campo magnético de um ímã cilíndricos de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, rodeado por 5 esferas de tungstênio.

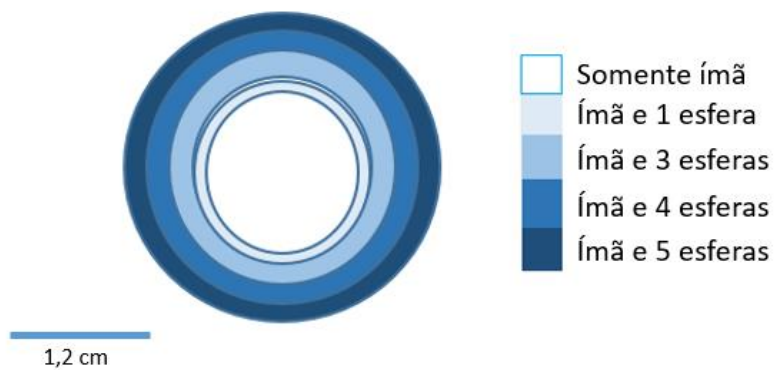


Figura 9. Diâmetros comparativo de distribuição dos fluidos de nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato na presença de um ímã com 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 esferas de tungstênio ao seu redor.

Vários arranjos com as esferas de tungstênio foram testados, porém o fluido de nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato se mostrou com maior diâmetro e mais uniforme quando submetido ao campo magnético do ímã junto com 5 esferas de tungstênio, visto isso, o arranjo ímã/5esferas de tungstênio foi escolhido para os experimentos *in vivo* (Figura 10).



Figura 10. Arranjo de ímã com 5 esferas de tungstênio escolhido para os experimentos com CTMs.

4.2 Estudos *In vitro* com adCTMs

4.2.1 Estudo *in vitro* da migração de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato na concentração de 0,08mg/ml

Para demonstrar a habilidade de controlar a mobilidade celular por forças magnéticas, as adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato foram plaqueadas em uma garrafa de cultura celular de 75cm² e submetidas a diferentes campos magnéticos externos.

Na Figura 11 é possível visualizar a migração das adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato na concentração de 0,08 mg/mL quando submetidas a campos magnéticos externos. Do lado A, havia um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, já no lado B havia outro ímã de igual propriedade, porém, com 5 esferas de tungstênio ao seu redor.

É possível perceber na Figura 11 que ocorre uma migração das adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato para a região de borda dos dois ímãs, porém a quantidade de células que migra para o lado B é significativamente maior, mostrando que as esferas de tungstênio ao redor do ímã produzem um maior gradiente de densidade do fluxo magnético, aumentando assim a atração de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato e induzindo uma maior migração dessas células para o lado que possuía as esferas. Além de migrarem mais células para o lado com o arranjo ímã/5esferas de tungstênio, a área de distribuição dessas células é maior.

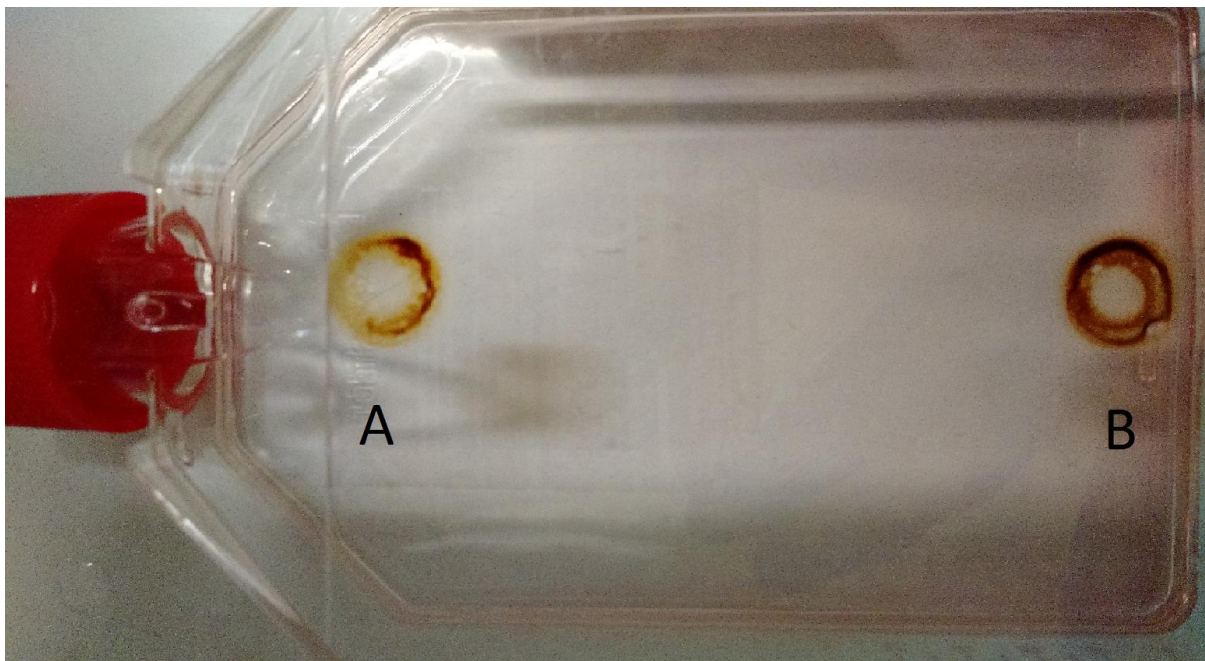


Figura 11. Migração das adCTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato na concentração de 0,08 mg/mL quando submetidas a um campo magnético externo de **A)** um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, **B)** um ímã de igual propriedade rodeado por 5 esferas de tungstênio.

4.3 Estudos *In vivo*

4.3.1 Estudo *in vivo* da migração e retenção de adCTMs marcadas nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato

Neste experimento, foram usados camundongos machos da cepa C57Bl/6 com 6 meses de vida e n=3 e 7 grupos.

No experimento tiveram 7 grupos de animais, com n=3, conforme mostra a Tabela 2. O grupo 1 foi o grupo controle saudável, no qual os animais receberam soro fisiológico estéril no dia 1 e infusão de PBS no dia 2. Os animais do grupo 2 foram o controle de adCTM, e receberam a administração apenas das CTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato no dia 2. No grupo 3, os animais foram o controle de fibrose, no qual os animais receberam administração apenas do sulfato de bleomicina no dia 1. No grupo 4 (CTM), os animais receberam a

administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2. No grupo 5 (CTM + Ímã), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2 e tiveram um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, colado ao seu peito, sobre a região pulmonar. No grupo 6 (CTM + Tungstênio), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2 e tiveram 5 esferas de tungstênio coladas na região peitoral, sobre a região pulmonar. No grupo 7 (CTM + Ímã/Tung), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2 e tiveram um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura rodeado por 5 esferas de tungstênio colado na região peitoral.

No dia 1, foi induzida a fibrose pulmonar nos animais através de administração de 30uL de uma solução de sulfato de bleomicina na dose de 6 UI/Kg diluídos em soro fisiológico estéril por instilação intratraqueal. O grupo controle saudável recebeu infusão apenas de soro fisiológico estéril. A concentração de 6 UI/Kg foi estabelecida devido a estudos ainda não publicados feitos por pesquisadores do nosso grupo.

No dia 2 os animais receberam adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato ressuspendidas em PBS estéril por via intranasal, com exceção do grupo controle saudável, que recebeu apenas PBS.

Sete dias após a administração das adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, os animais foram eutanasiados e tiveram os órgãos (pulmão, baço e fígado) coletados e submetidos a processamentos histológicos. As lâminas histológicas foram coradas pelo método de Perls, método que cora ferro de azul, e contracoradas com vermelho neutro, dessa forma foi possível contar os eventos azuis-acobreados encontrados nos pulmões dos camundongos. As lâminas histológicas foram feitas em triplicata e cada grupo teve 3 lâminas analisada e contadas, sendo o resultado do gráfico uma média de eventos azuis-acobreados encontrados por grupo.

Analisando a Figura 12 é possível observar que o número de ‘eventos azuis-acobreados’ é significativamente maior no grupo 7, grupo que recebeu o ímã e as esferas de tungstênio sobre os pulmões. Este resultado é bastante promissor pois revela que o grupo que foi submetido ao ímã e tungstênio conseguiu reter mais adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no pulmão, corroborando com a ideia de que esferas de tungstênio quando colocadas na região peitoral de camundongos intensificam a atração de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -

Fe₂O₃)-citrato por um ímã, induzindo, assim, uma maior migração dessas células para o local da injúria.

A Figura 13 representa a análise histológica dos pulmões de camundongos de diferentes grupos, corados pela técnica de Perls e contracorados com vermelho neutro sendo **A)** o grupo Controle Saudável, **B)** o grupo Controle Fibrose, **C)** o grupo CTM, **D)** o grupo CTM + ÍMÃ, **E)** o grupo CTM + TUNGSTÊNIO e **F)** o grupo CTM + ÍMÃ/TUNG.

Os animais tiveram o peso monitorado diariamente desde antes dos procedimentos até o dia da eutanásia (dias 7), os dados se encontram na Tabela 3 e Figuras 14,15 e 16.

Conforme mostra a Tabela 3, entre o dia 3 e 7 houve morte de animais nos grupos controle fibrose, CTM + ÍMÃ e CTM + Tungstênio. É importante ressaltar que o animal do grupo CTM + Tungstênio foi encontrado com machucados pelo corpo, indicando sinais de briga, devido a este ocorrido a morte deste não será considerada como morte devido ao tratamento com bleomicina e adCTMs, pois não é possível afirmar que o que o levou a morrer foram complicações pulmonares.

A Figura 14 representa a variação do peso médio dos grupos de animais no decorrer de 7 dias, já as Figuras 15 e 16 representam respectivamente a variação do peso de cada animal nos grupos controles e nos grupos tratados no decorrer de 7 dias.

Conforme mostram as Figuras 14,15 e 16, todos os animais que tiveram fibrose pulmonar induzida por bleomicina numa dose de 6 UI/kg tiveram perda significativa de peso, não tendo correlação entre a quantidade de adCTMs encontradas nos pulmões e a perda de peso.

Também foi possível constatar que os animais que só tiveram a fibrose induzida sem a administração de adCTMs apresentaram uma mortalidade maior que os demais grupos, tendo dois animais mortos, um no 4º dia após a indução da fibrose e o outro no 5º dia. Isso corrobora com os estudos que mostram que as adCTMs ajudam na melhora dos processos inflamatórios do pulmão lesionado.

Visto esses resultados, sentimos a necessidade de fazer um estudo de sobrevivência dos animais, monitorando seus pesos e taxa de morte por 30 dias.

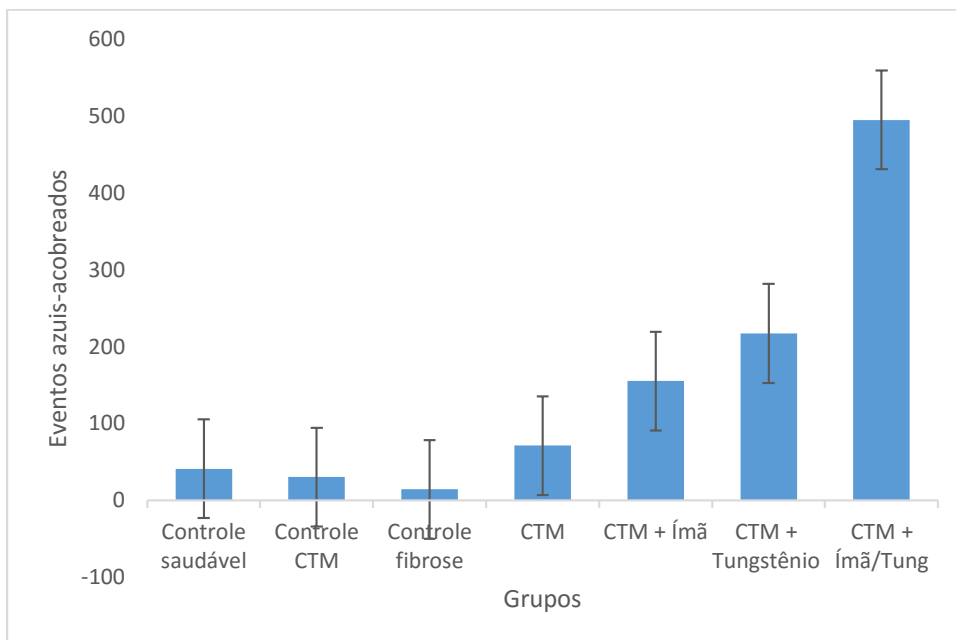


Figura 12. Quantidade da média de eventos azuis-acobreados contados nas lâminas histológicas de pulmões de camundongos submetidos ao tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato, de acordo com os grupos trabalhados.

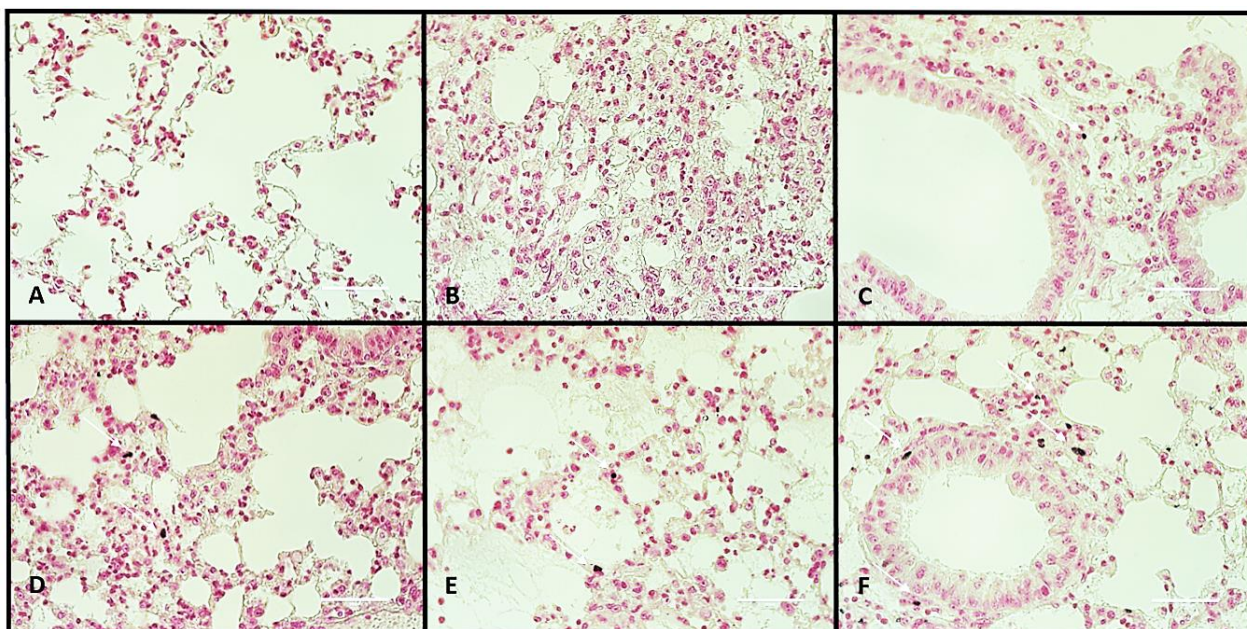


Figura 13. Análise histológica de pulmões murinos, corados pela técnica de Perls e contracorados com vermelho neutro. Os animais receberam administração intratraqueal de bleomicina (6 UI/Kg) e, 24 horas depois, foram tratados intranasalmente com 1×10^6 adCTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato, em que **A)** é o grupo Controle Saudável, **B)** o grupo controle Fibrose, **C)** o grupo CTM, **D)** o grupo CTM + ÍMÃ, **E)** o grupo CTM + TUNGSTÊNIO e **F)** o grupo CTM + ÍMÃ/TUNG. Algumas das células presentes no tecido pulmonar estão evidenciadas em azul-acobreado (setas brancas). Barra: 50 μm

Tabela 3. Monitoramento dos pesos dos camundongos durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, de acordo com os grupos trabalhados. No dia 1, administrou-se 30 μ l do fármaco diluído a 6 UI/Kg, ou de solução fisiológica estéril (grupo controle saudável), por instilação intratraqueal. No dia 2, inoculou-se 1×10^6 adCTMs por instilação intranasal marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato nos animais dos grupos tratados. O peso dos animais também foi mensurado no dia seguinte (dia 3) à administração das células e antes destes serem eutanasiados (dia 7).

Grupo experimental	Animal	Medidas de peso (g)			
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 7
Controle saudável: animais não tratados com bleomicina que não desenvolveram fibrose pulmonar.	A	35,6	35,1	35,0	36,0
	B	30,0	31,2	31,4	31,0
	C	29,1	28,9	29,3	30,01
	Média	31,5	31,8	31,9	31,9
	Desvio Padrão	3,5	3,1	2,9	3,2
Controle CTMs: animais não tratados com bleomicina que não desenvolveram fibrose pulmonar, mas receberam infusão de CTMs.	A	36,0	35,5	35,3	36,0
	B	33,9	32,8	33,2	34,0
	C	34,0	34,3	33,2	33,5
	Média	34,6	34,2	33,9	34,5
	Desvio Padrão	1,2	1,4	1,2	1,3
Controle fibrose: animais tratados com bleomicina e que desenvolveram fibrose pulmonar.	A	37,3	35,1	33,3	*
	B	38,3	35,9	33,8	*
	C	37,8	36,8	36,1	33,4
	Média	37,8	35,9	34,4	33,4
	Desvio Padrão	0,5	0,9	1,5	-
CTM: animais que desenvolveram fibrose pulmonar e foram tratados com CTMs, mas não tiveram indução da mobilização magnética por um ímã externo	A	37,0	34,2	33,3	30,2
	B	38,2	35,5	34,5	27,8
	C	33,7	31,5	32,2	32,0
	Média	36,3	33,7	33,3	30,0
	Desvio Padrão	2,3	2,0	1,2	2,1
CTM + ímã: animais que desenvolveram fibrose pulmonar e foram tratados com CTMs sob efeito de um campo magnético externo formado por um ímã.	A	34,2	32,2	32,3	27,3
	B	36,6	34,2	32,3	*
	C	35,5	34,6	33,0	27,9
	Média	35,5	33,7	32,5	27,6
	Desvio Padrão	1,2	1,3	0,4	0,4
CTM + tungstênio: animais que desenvolveram fibrose pulmonar e foram tratados com CTMs sob efeito de um campo magnético externo formado por 5 esferas tungstênio	A	34,5	31,9	30,2	*
	B	35,1	32,8	31,6	24,2
	C	37,7	35,1	34,2	27,2
	Média	35,8	33,3	32,0	25,7
	Desvio Padrão	1,7	1,7	2,0	2,1
CTM + ímã/tungstênio: animais que desenvolveram fibrose pulmonar e foram tratados com CTMs sob efeito de um campo magnético externo formado por um ímã e 5 esferas de tungstênio.	A	33,0	30,6	29,9	30,1
	B	33,3	30,8	29,2	28,8
	C	39,2	35,3	35,0	28,6
	Média	35,2	32,2	31,7	29,1
	Desvio Padrão	3,5	2,7	3,1	0,8

* animais que morreram. *este animal apresentou sinais de briga.

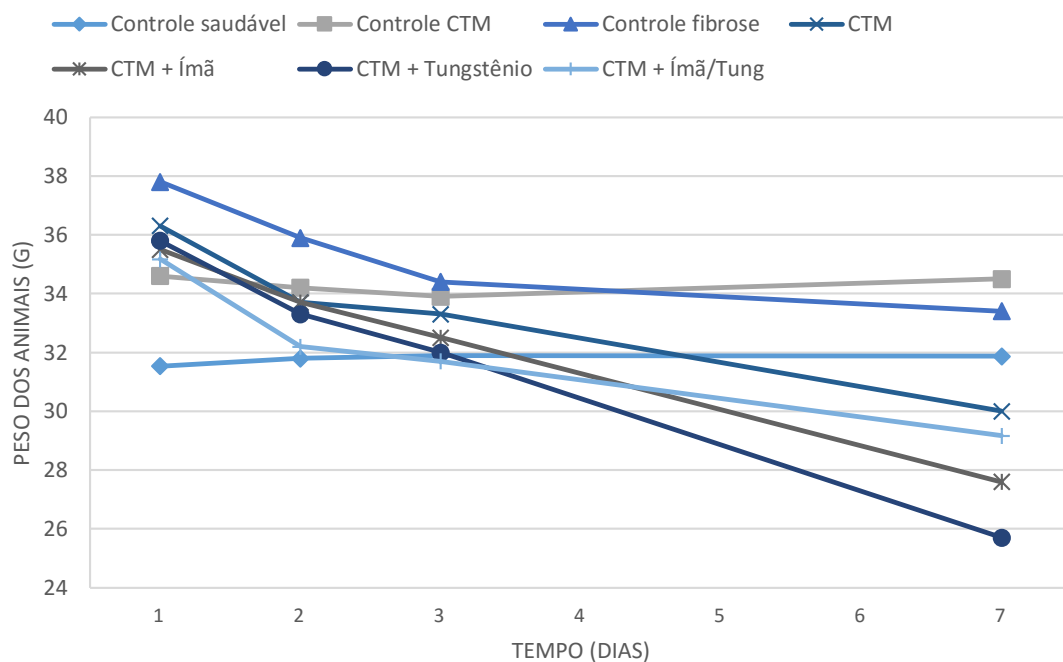


Figura 14. Variação do peso nos grupos de camundongos durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato, de acordo com os grupos trabalhados. No dia 1, administrou-se 30 μl do fármaco diluído a 6 UI/Kg, ou de solução fisiológica estéril (grupo controle saudável), por instilação intratraqueal. No dia 2, inoculou-se 1×10^6 adCTMs por instilação intranasal marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato nos animais dos grupos tratados. O peso dos animais também foi mensurado no dia seguinte (dia 3) à administração das células e antes destes serem eutanasiados (dia 7).

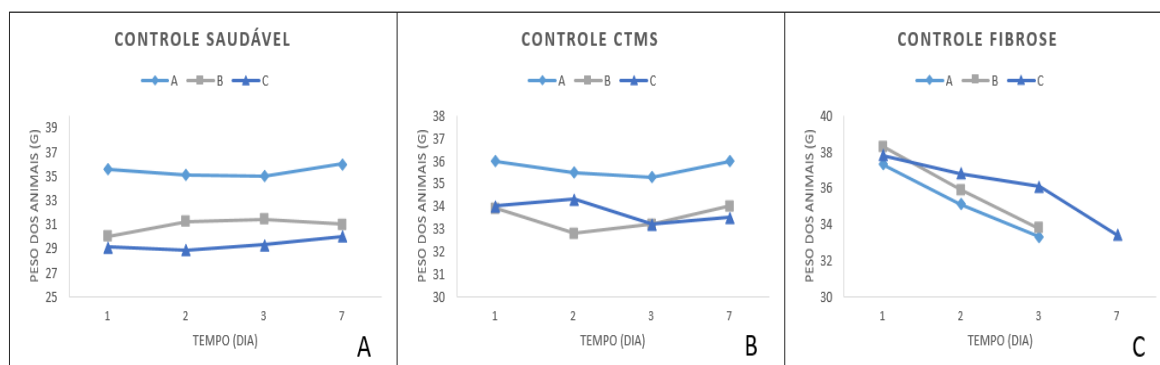


Figura 15. Monitoramento do peso dos animais dos grupos controles por 7 dias durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato nos grupos: **A)** controle saudável, **B)** controle CTM e **C)** controle fibrose. No grupo controle da fibrose, tiveram duas mortes entre o dia 3 e 7 (C).

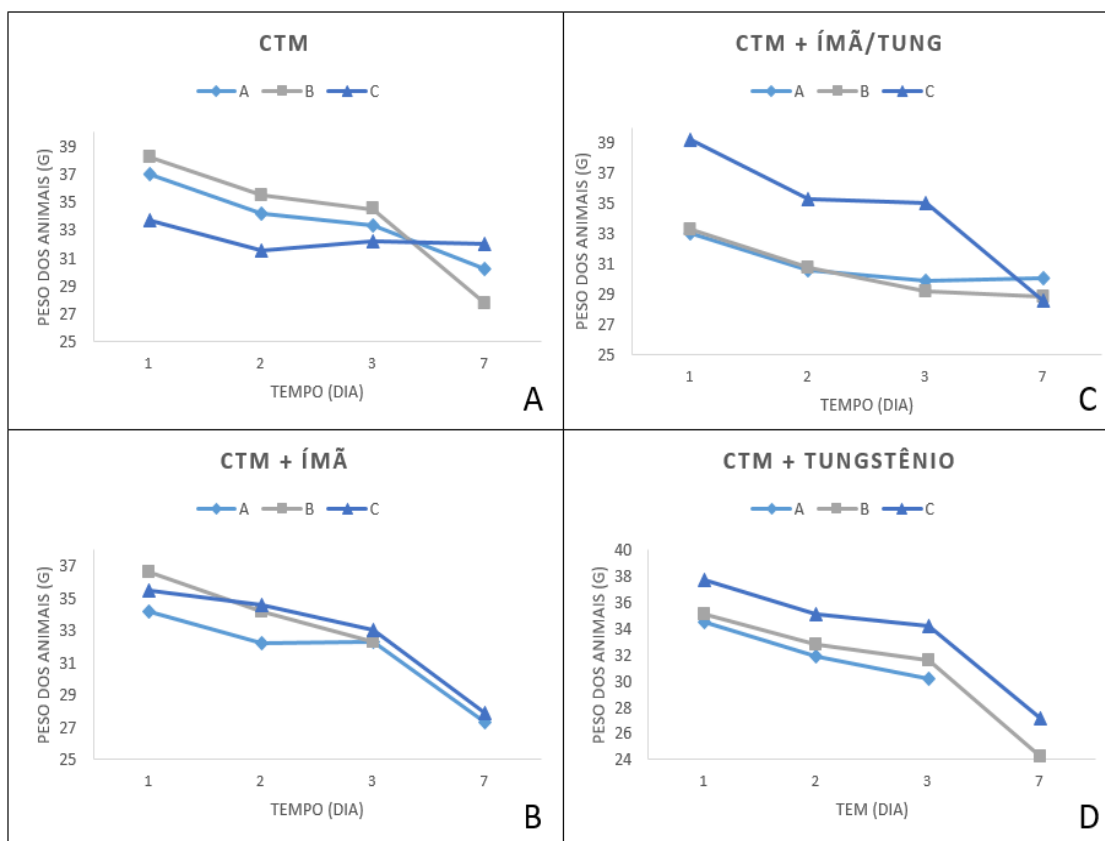


Figura 16. Monitoramento do peso dos animais dos grupos tratados por 7 dias durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato nos grupos: **A)** CTM, **B)** CTM + ÍMÃ, **C)** CTM + ÍMÃ/TUNG e **D)** CTM + TUNGSTÊNIO. O grupo CTM + ÍMÃ (**B**) e CTM + TUNGSTÊNIO (**D**) apresentaram uma morte entre os dias 3 e 7.

4.3.2 Estudo de sobrevivência dos animais com fibrose pulmonar induzida por bleomicina tratados com adCTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato

Neste experimento, foram usados camundongos fêmeas da cepa C57Bl/6 com 3 meses e $n=3$ separados em 7 grupos.

No experimento tiveram 7 grupos de animais, com $n=3$, conforme mostra a Tabela 2. O grupo 1 foi o grupo controle saudável, no qual os animais receberam soro fisiológico estéril no dia 1 e infusão de PBS no dia 2. Os animais do grupo 2 foram o controle de adCTM, e receberam a administração apenas das CTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato no dia 2. No

grupo 3, os animais foram o controle de fibrose, no qual os animais receberam administração apenas do sulfato de bleomicina no dia 1. No grupo 4 (CTM), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2. No grupo 5 (CTM + Ímã), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2 e tiveram um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, colado ao seu peito, sobre a região pulmonar. No grupo 6 (CTM + Tungstênio), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2 e tiveram 5 esferas de tungstênio coladas na região peitoral, sobre a região pulmonar. No grupo 7 (CTM + Ímã/Tung), os animais receberam a administração de bleomicina no dia 1 e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato no dia 2 e tiveram um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura rodeado por 5 esferas de tungstênio colado na região peitoral.

No dia 1, foi induzida a fibrose pulmonar nos animais através de administração de 30uL de uma solução de sulfato de bleomicina na dose de 6 UI/Kg diluídos em soro fisiológico estéril por instilação intratraqueal. O grupo controle saudável recebeu infusão apenas de soro fisiológico estéril.

No dia 2 os animais receberam adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato em PBS estéril por via intranasal.

O peso dos animais foi monitorado do dia 1 ao dia 30, observando a taxa de morte.

Conforme observado na Tabela 4 e nas Figuras 17,18 e 19, todos os animais que tiveram fibrose induzida por bleomicina apresentaram uma significativa perda de peso entre os dias 2 e 5. A partir do dia 6 os animais começaram a recuperar o peso, com exceção do grupo controle fibrose e do grupo CTMs + Ímã, que recebeu adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato sob efeito de um campo magnético externo formado por um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura.

Esses dois grupos, controle fibrose e CTMs + Ímã, foram os únicos grupos que apresentaram mortes após a administração de adCTMs ao longo dos 30 dias monitorados, podendo mostrar uma relação entre a perda de peso e a taxa de morte.

O grupo controle fibrose teve um animal encontrado morto no 12º dia após a indução da fibrose por bleomicina, já o grupo CTMs + Ímãs só foi apresentar animais mortos no 19º e 28º dia após a indução da bleomicina.

Tabela 4. Monitoramento dos pesos dos camundongos durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, de acordo com os grupos trabalhados. No dia 1, administrou-se 30 μ l do fármaco diluído a 6 UI/Kg, ou de solução fisiológica estéril (grupo controle saudável), por instilação intratraqueal. No dia 2, inoculou-se 1×10^6 adCTMs por instilação intranasal marcadas com nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato nos animais dos grupos tratados. O peso dos animais também foi mensurado nos próximos 28 dias.

Grupo experimental	Animal	Medidas de peso (g)					
		Dia 1	Dia 2	Dia 5	Dia 10	Dia 20	Dia 30
Controle saudável: animais não tratados com bleomicina que não desenvolveram fibrose pulmonar.	A	21,4	21,3	23,2	21,5	22,4	21,9
	B	21,6	21,5	21,3	21,8	21,9	22,3
	C	26,1	25,3	24,4	23,5	24,9	25,9
	Média	23,0	22,7	22,9	21,6	23,0	23,3
	Desvio Padrão	2,6	2,2	1,5	0,1	1,6	2,2
Controle CTMs: animais não tratados com bleomicina que não desenvolveram fibrose pulmonar, mas receberam infusão de CTMs.	A	19,9	19,7	20,2	20,0	20,3	21,1
	B	19,2	18,7	19,2	19,5	19,9	19,6
	C	23,5	22,2	22,1	21,7	22,5	22,4
	Média	20,8	20,2	20,5	20,4	20,9	21,0
	Desvio Padrão	2,3	1,8	1,4	1,1	1,4	1,4
Controle fibrose: animais tratados com bleomicina e que desenvolveram fibrose pulmonar.	A	22,1	20,8	19,9	21,2	20,67	20,2
	B	23,5	20,4	21,5	21,3	21,1	21,2
	C	22,6	19,6	17,2	14,3	*	*
	Média	22,7	20,2	19,5	18,9	20,8	20,7
	Desvio Padrão	0,7	0,6	2,1	4,0	0,3	0,7
CTM: animais que desenvolveram fibrose pulmonar e foram tratados com CTMs, mas não tiveram indução da mobilização magnética por um ímã externo	A	20,2	18,8	16,1	17,1	19,2	20,4
	B	21,5	20,6	21,2	21,6	22,0	21,8
	C	17,5	*	*	*	*	*
	Média	19,7	19,7	18,6	19,3	20,6	21,1
	Desvio Padrão	2,0	1,2	3,6	3,1	1,9	0,9
CTM + ímã: animais que desenvolveram fibrose pulmonar e foram tratados com CTMs sob efeito de um campo magnético externo formado por um ímã.	A	22,1	20,8	20,1	18,3	15,6	*
	B	20,2	19,7	17,2	18,9	19,1	20,6
	C	21,8	17,7	16,4	16,0	*	*
	Média	21,3	19,4	17,9	17,7	17,3	20,6
	Desvio Padrão	1,0	1,5	1,9	1,5	2,4	-
CTM + tungstênio: animais que desenvolveram fibrose pulmonar e foram tratados com CTMs sob efeito de um campo magnético externo formado por 5 esferas tungstênio	A	23,1	20,7	19,7	21,5	22,0	22,8
	B	22,4	20,5	17,9	20,6	21,8	21,0
	C	21,3	18,0	16,3	17,11	17,2	18,2
	Média	22,2	19,7	17,9	19,7	20,3	20,6
	Desvio Padrão	0,9	1,5	1,7	2,3	2,7	2,3
CTM + ímã/tungstênio: animais que desenvolveram fibrose pulmonar e foram tratados com CTMs sob efeito de um campo magnético externo formado por um ímã e 5 esferas de tungstênio.	A	20,5	18,8	20,7	20,9	21,4	22,4
	B	21,1	17,8	18,8	19,1	19,1	19,4
	C	20,3	17,6	18,8	17,9	18,9	19,8
	Média	20,6	18,0	19,4	19,3	19,8	20,5
	Desvio Padrão	0,4	0,6	1,1	2,0	1,51	1,6

* Representa animais mortos. * Este animal morreu na noite após a indução da fibrose, antes da administração de adCTMs.

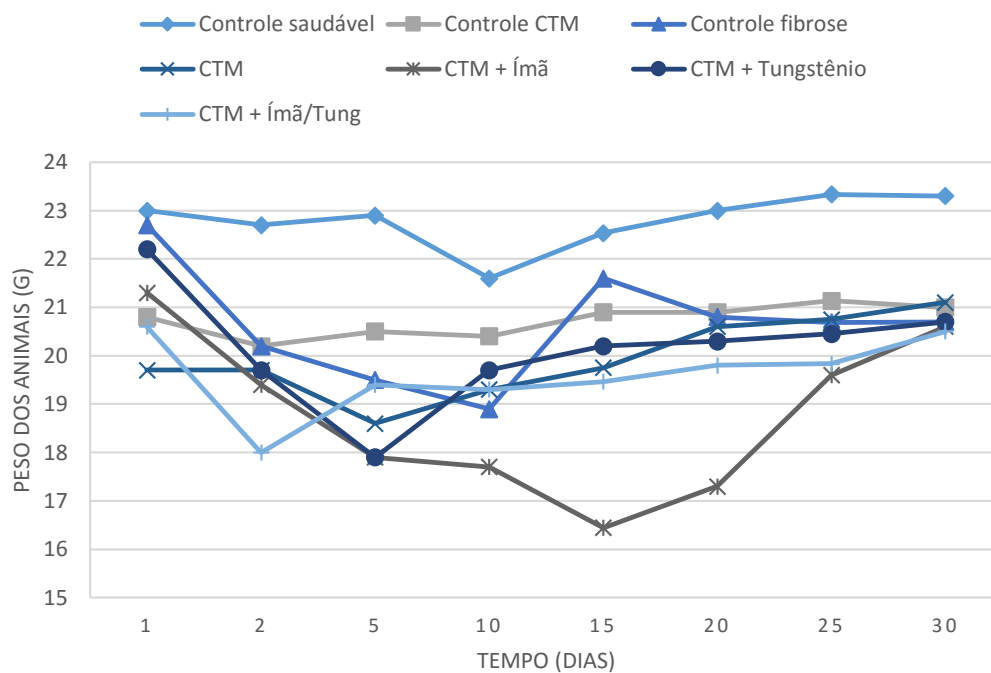


Figura 17. Monitoramento do peso nos grupos de camundongos durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato, de acordo com os grupos trabalhados. No dia 1, administrou-se 30 μl do fármaco diluído a 6UI/Kg, ou de solução fisiológica estéril (grupo controle saudável), por instilação intratraqueal. No dia 2, inoculou-se 1×10^6 adCTMs por instilação intranasal marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato nos animais dos grupos tratados. O peso dos animais também foi mensurado nos próximos 28 dias.

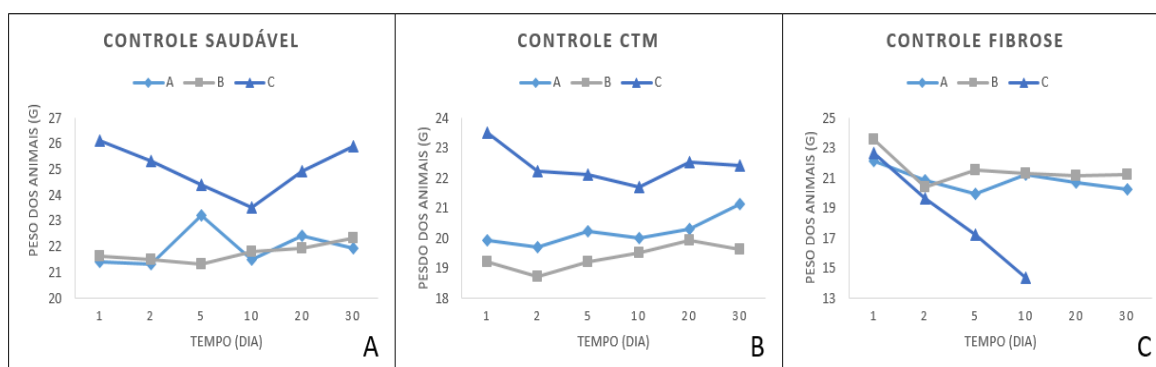


Figura 18. Monitoramento do peso dos animais dos grupos controles durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato nos grupos: **A)** controle saudável, **B)** controle CTM e **C)** controle fibrose por 30 dias.

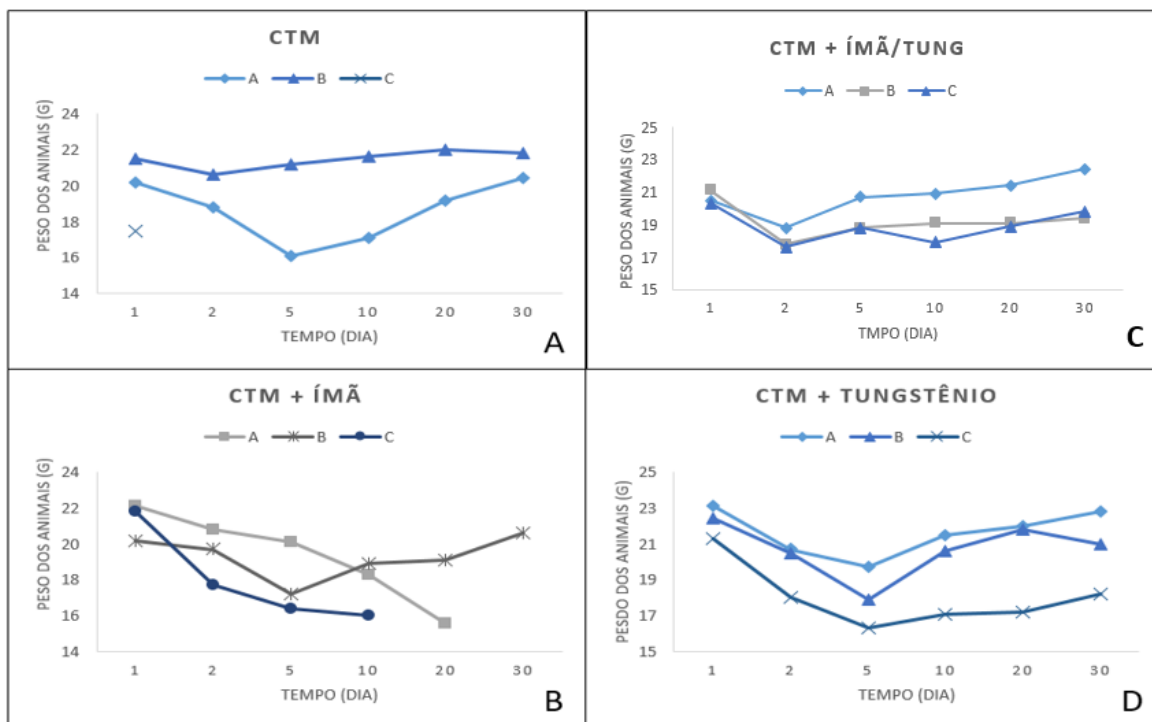


Figura 19. Monitoramento do peso dos animais dos grupos tratados durante o tratamento com bleomicina e adCTMs marcadas com nanopartículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-citrato nos grupos: **A)** CTM, **B)** CTM + Ímã, **C)** CTM + ÍMÃ/TUNG e **D)** CTM + TUNGSTÊNIO ao longo de 30 dias.

5. DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS *IN VITRO*

5.1.1 Análise das nanopartículas de (γ -Fe₂O₃)-citrato

Para analisar as nanopartículas de (γ -Fe₂O₃)-citrato foram feitas análise de MET, diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial Zeta (Ptz).

As fotomicrografias do MET permitiram estabelecer o diâmetro médio das nanopartículas, que foi de aproximadamente 9 nm, e também que elas se apresentaram homogêneas e com forma esférica. Devido ao diâmetro destas nanopartículas ser menor do que 10 nm, elas são classificadas como VSPIONs (*very small superparamagnetic iron oxide NPs*)⁽⁶¹⁾.

Para determinar a estabilidade do colóide, foi feito o ensaio de potencial zeta, que indicou um potencial zeta de -51,5 mV. O valor ideal do potencial zeta deve ser entre |30-60| mV uma vez que as forças repulsivas evitam agregações entre as partículas em dispersão^(78,79). O fato do potencial zeta ter se apresentado tão negativo é devido ao recobrimento das nanopartículas com os íons de citrato, proporcionado pelos grupos carboxilas ancorados na superfície (íon citrato pode possuir até três cargas negativas provenientes da desprotonação de cada uma de suas três carboxilas), evitando a agregação das nanopartículas e consequentemente aumentando sua estabilidade, fazendo delas boas escolhas para se trabalhar com sistemas biológicos⁽⁸⁰⁾.

A análise do tamanho de partículas e o índice de polidispersão (IPD) das soluções de nanopartículas de (γ -Fe₂O₃)-citrato foram obtidos pelo método de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Esta técnica baseia-se no fato de que as partículas se movem aleatoriamente sob o impacto das moléculas do solvente sobre a sua superfície. A frequência e a amplitude deste movimento, denominado browniano, que é o movimento aleatório das partículas suspensas em um líquido ou gás, resultante da sua colisão com átomos ou moléculas no fluido, é dependente do tamanho da partícula e da viscosidade do solvente, ou seja, quanto menor a partícula, maior será a frequência de colisão do movimento browniano⁽⁷⁹⁾.

O diâmetro hidrodinâmico (DH) das nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato em solução aquosa apresentou bons resultados para as distribuições por volume, diâmetro e por número. O valor de Z-average foi de 113,6 nm.

O índice de polidispersão (PDI) foi de 0,148, indicando possivelmente um sistema monodisperso.

5.1.2 Análise do arranjo ímã e esferas de tungstênio

Campos magnéticos externos não são uniformes ao longo de seus eixos tangenciais e isso pode gerar algumas problemáticas na tática de mobilização magnética de CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas. Quando submetidas a ação de um campo magnético de ímãs cilíndricos por exemplo, as CTMs marcadas formam anéis circulares na borda do ímã, isso acontece porque os ímãs cilíndricos criam um campo magnético de atração longe de seu centro⁽⁶⁸⁾. Para tentar resolver essa problemática, foi colocado esferas de tungstênio ao redor de um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura. Essas esferas além de serem ferromagnéticas, ou seja, também funcionarem como ímãs, mudam a distribuição das linhas de campo, mudando a simetria do campo magnético e, conseqüentemente, mudando a forma de atração desse arranjo ímã/esferas de tungstênio.

A diferente distribuição e homogeneidade do fluido de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato quando submetido a diferentes arranjos de ímã e esferas de tungstênio se deve ao fato de que esses arranjos possuem campos magnéticos com geometrias diferentes. Os resultados obtidos mostraram que o fluido de nanopartícula (γ -Fe₂O₃)-citrato quando submetido a um campo magnético externo formado por um ímã e 5 esferas de tungstênio ao redor (Figura 8D) apresentou a melhor zona de distribuição e homogeneidade para o presente estudo quando comparado a distribuição desse fluido na presença de campos magnéticos externos de um único ímã e um ímã com 1, 2, 3 e 4 esferas de tungstênio. Quando submetido a este arranjo, o fluido apresentou uma distribuição com diâmetro médio de 3 cm, correspondendo a uma área similar a região pulmonar dos camundongos. É importante lembrar que a melhor distribuição possível do fluido de nanopartículas magnéticas varia de acordo com os interesses de cada estudo, podendo variar de trabalho para trabalho.

5.1.3 Análise da migração de adCTMs marcadas com nanopartículas de (γ -Fe₂O₃)-citrato quando submetidas a um campo magnético externo

O estudo de mobilização magnética de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato através de dois diferentes campos magnéticos externos, um formado por um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, e outro formado por um ímã de mesmas propriedades rodeado por 5 esferas de tungstênio, mostrou que as adCTMs tiveram uma migração diferenciada *in vitro* quando expostas simultaneamente a esses dois campos magnéticos (Figura 11). Foi possível perceber que ocorreu migração das adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato para a região de borda dos dois ímãs, porém a quantidade de células que migrou para o lado B é significativamente maior, mostrando que as esferas de tungstênio ao redor do ímã produzem um maior gradiente de densidade do fluxo magnético, aumentando assim a atração de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato e induzindo uma maior migração dessas células para o lado que possuía as esferas. Além de ter migrado mais células para o lado com o arranjo ímã/5esferas de tungstênio, a área de distribuição dessas células foi maior neste lado.

Apesar da mobilização magnética de CTMs por campos magnéticos externos estar sendo feita em muitos estudos pré-clínicos com resultados promissores, é preciso investigar se esse campo magnético exerce algum efeito sobre as CTMs. Existem poucos estudos sobre o efeito do campo magnético a um nível celular, dessa forma o efeito da força magnética e tempo de exposição de CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas a um campo magnético externo formado por ímãs permanece desconhecido⁽⁸¹⁾.

Segundo os estudos de Nakamae e Ochi *et al.* (2010) e Schäfer *et al.* (2010), forças magnéticas externas não afetam a proliferação celular de CTMs⁽⁸¹⁾. Porém, segundo Schäfer *et al.* (2010), CTMs submetidas a campos magnéticos externos apresentam: redução na habilidade de formarem colônias; aumento da expressão de CD93 (uma glicoproteína envolvida na resposta imune inata); e intensificação na diferenciação adipogênica e redução na diferenciação osteogênica, indicando uma certa influência de campos magnéticos externos na diferenciação^(81,82). O estudo de Schäfer *et al.* (2010) mostra que campos magnéticos externos afetam a biologia e funcionamento de CTMs humanas *in vitro* de forma independente de outros fatores, mas ainda é preciso investigações em modelos *in vivo* para elucidar os mecanismos de interação de campos magnéticos com a biologia de CTMs⁽⁸²⁾.

5.2 ENSAIOS *IN VIVO*

5.2.1 Análise da migração e retenção de adCTMs nos pulmões dos camundongos

Estratégias para melhorar a migração e enxertia de CTMs pós administração em modelos *in vivo* são muito utilizadas e diversas dentro do campo da biomedicina, essas principais estratégias são por meio de abordagens com anticorpos ligados a proteínas G, manipulação genética de CTMs, selectina e mobilização e direcionamento de peptídeos, etc⁽⁸³⁾.

Apesar de existirem vastas estratégias para aumentar o potencial de migração, enxertia e retenção de CTMs, a mobilização magnética dessas células tem se mostrado o protocolo mais promissor para tal⁽⁷³⁾. Entretanto, é importante ressaltar que tratamento com mobilização magnética de CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas por um ímã externo só é eficiente para órgãos ou tecidos superficiais, devido ao fato de que o fluxo de densidade magnética é maior no polo da face do ímã, e se dissipa quanto mais se afasta do ímã. Dessa forma, CTMs marcadas com as nanopartículas magnéticas não serão atraídas para tecidos profundos como coração, rim e fígado⁽⁸⁴⁾.

Os nossos ensaios *in vivo* nos mostraram que as técnicas de mobilização magnéticas foram eficientes no modelo de inflamação pulmonar em camundongos. Os três grupos de animais que tiveram indução da migração de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato por campos magnéticos externos apresentaram uma maior retenção de adCTMs no pulmão inflamado após uma semana. Este resultado é importante pois, apesar de inúmeros estudos mostrarem o papel terapêutico das adCTMs em pulmões inflamados, nenhum estudo quantifica as adCTMs que migram e se enxertam no pulmão. Devido a isso não foi possível comparar nossos resultados com outros estudos.

Foi possível observar a presença de adCTMs no tecido pulmonar dos camundongos tratados através da análise das lâminas histológicas uma vez que, devido a coloração de Perls contracorada com vermelho neutro, as adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato apresentaram coloração azul-acobreada, permitindo a contagem dessas células nos pulmões dos grupos trabalhados como ‘eventos azuis-acobreados’.

Neste estudo, o grupo CTM + ÍMÃ/TUNG apresentou uma contagem de adCTMs nos pulmões muito maior do que os outros grupos, isso se deve ao fato de que nesse grupo os

animais tiveram a indução da mobilização das adCTMs por um campo magnético externo formado por um ímã e rodeado por 5 esferas de tungstênio. As 5 esferas de tungstênio modificam o gradiente de campo e permitem que a mobilização magnética das adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato seja mais eficiente, ocorrendo um aumento na migração, retenção e diâmetro de distribuição dessas células no local da injúria.

O grupo CTM + Tungstênio também apresentou quantidade de contagem de adCTMs altas nos pulmões dos camundongos que tiveram fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Isto se deve ao fato de que o tungstênio é um material ferromagnético, ou seja, ele também forma campos magnéticos, e dessa forma, também atua na mobilização magnética das adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato.

O curioso deste estudo foi que o grupo CTM + Tungstênio apresentou uma maior contagem de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato do que o grupo CTM + Ímã, isto se deve provavelmente ao fato de que no grupo CTM + Ímã as células se concentraram somente nas regiões de borda do ímã, tendo uma menor distribuição pelo pulmão, e dessa forma aparecendo apenas em pequenas faixas quando analisadas nas lâminas histológicas.

O fato dos grupos que não tiveram a infusão de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato apresentarem eventos azuis-acobreados se deve a um processo fisiológico que acontece nos pulmões que consiste na degradação de hemácias, liberando hemossiderina. Este é um pigmento ferroso fagocitado por macrófagos específicos que se mostram positivos para a coloração de Perls⁽⁴⁸⁾. Dentre os eventos azuis-acobreados encontrados nos pulmões dos grupos que receberam infusão de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, não é possível distinguir os macrófagos com hemossiderina internalizada das adCTMs marcadas, para isso é necessário um teste imunohistoquímico com anticorpos que se ligam a CTMs. Este estudo está em andamento, porém ainda não obtivemos os dados até o presente momento.

Mesmo com o processo de fagocitose da hemossiderina por macrófagos, que acontece naturalmente nos pulmões, a quantidade de ‘eventos azuis-acobreados’ contado nos pulmões dos grupos que receberam adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato é expressivamente maior quando comparado aos grupos que não receberam células, indicando que estes ‘eventos azuis-acobreados’ realmente representam adCTMs marcadas.

Apesar de ter sido constatada uma quantidade significativamente maior de ‘eventos azuis-acobreados’ nos animais que tiveram terapias com mobilização magnética de adCTMs marcadas com nanopartículas de (γ -Fe₂O₃)-citrato submetidas a campos magnéticos externos,

não foi confirmado que o aumento da retenção de adCTMs nos pulmões melhorou a inflamação, resultando em uma maior regeneração ou reparo tecidual.

Convergências entre estudos com mobilização magnética de CTMs vem acontecendo. Alguns estudos mostram que uma maior migração e retenção de CTMs se traduzem em maior efeito terapêutico, porém em outros estudos não^(65,85,86).

Estudos como o de Cheng *et al.* (2012) e Chaudeurge *et al.* (2012) mostram que a mobilização magnética de CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas para o coração aumenta a migração, retenção e consequente reparo tecidual, porém, no estudo de Huang *et al.* (2013) a mobilização magnética de CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas aumentou a migração e retenção de células no local da inflamação, mas não foi observada uma melhora considerável no miocárdio lesionado entre os grupos que tiveram a mobilização magnética e os que não tiveram^(65,85,86).

Para garantir eficácia no papel terapêutico da mobilização magnética de CTMs resultando na sua maior migração e retenção e evitar eventuais complicação, como por exemplo microembolias devido ao acúmulo de CTMs em vasos sanguíneos, é preciso estudar o campo magnético ao qual as CTMs serão submetidas e desenvolver sistemas de campos magnéticos homogêneos (campo magnético relativamente homogêneo com intensidade magnética otimizada) e conformais (com as três dimensões similares a area alvo)⁽⁶⁸⁾.

Os resultados obtidos neste estudo se mostraram positivos em se tratando da mobilização magnética de adCTMs. Quando induzidas a um campo magnético formado pelo ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, e 5 esferas de tungstênio, a migração e retenção das adCTMs foi maior do que quando expostas ao campo magnético formado só pelo ímã cilíndrico ou ao campo formado pelas 5 esferas de tungstênio.

Quando as adCTMs foram submetidas a um campo magnético de apenas um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, apesar de ter havido maior migração e retenção de adCTMs quando comparado ao grupo que não teve indução da mobilização magnética, os animais apresentaram uma alta taxa de mortalidade e perda de peso. Estes resultados comprovam a necessidade de estudar o campo magnético a que as adCTMs serão submetidas antes de partir para os ensaios *in vivo*, como já havia sido colocado por Huang *et al.* (2013) em seus estudo sobre mobilização magnéticas de CTMs em modelos experimentais de doenças coronarianas⁽⁶⁸⁾.

Mesmo com a comprovação de uma maior migração e retenção das adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato para o local quando submetidas a campos magnéticos

externos, ainda é preciso realizar estudos mais profundos para comprovar se a maior retenção de CTMs gera uma melhora no tecido pulmonar inflamado desses animais, diminuindo a fibrose local.

5.2.2 Análise de sobrevida dos animais

Os estudos em animais que apresentavam doenças intersticiais pulmonares, mostram que CTMs melhoraram a função pulmonar^(24,26,27). Acredita-se que o mecanismo terapêutico das CTMs seja via fatores parácrinos, que estimulam o crescimento das células pulmonares e inibem a inflamação e a fibrose nesse tecido lesionado⁽²⁵⁾. Esses fatores parácrinos ajudam a formar um ambiente favorável à sobrevivência e proliferação das células progenitoras remanescentes nos tecidos comprometidos^(29,30).

Nos experimentos de sobrevida dos animais, foi possível observar que os grupos que tiveram fibrose pulmonar induzida por bleomicina tiveram perda significativa de peso após o procedimento de indução da fibrose, entre o dia 1 e 2 (Figura 19), porém, os grupos tratados com adCTMs por via intranasal conseguiram recuperar o peso após a administração de adCTMs, do dia 2 em diante.

A via intranasal foi escolhida por ser menos invasiva e, conforme estudos ainda não publicados por pesquisadores do nosso grupo, ela mostrou ter uma maior eficácia terapêutica no tratamento de fibrose pulmonar com CTMs quando comparada a via intravenosa. Está maior eficácia se deve, provavelmente, ao fato de que chega uma maior quantidade de CTMs ao pulmão pela via intranasal, enquanto que pela via intravenosa as CTMs permaneciam retidas nos linfonodos associados aos pulmões.

O fato do grupo controle fibrose não ter recuperado o peso se deve às complicações causadas pela inflamação pulmonar, que é marcada pela excessiva deposição de matriz extracelular no interstício pulmonar, resultando na obstrução das vias respiratórias e modificando a arquitetura alveolar⁽⁸⁷⁾. Também foi possível constatar que os animais deste grupo (que só tiveram a fibrose induzida sem a administração de adCTMs) apresentaram uma mortalidade maior que os demais grupos, apresentando morte de dois animais no experimento em que o peso foi monitorado por 7 dias, tendo um animal morto no 4º dia após a indução da fibrose e o outro no 5º dia. No experimento onde os animais tiveram o peso monitorado no

decorrer de 30 dias, ocorreu morte de um animal no 12º dia. Estes dados corroboram com o fato de que as adCTMs desempenham papel importante no reparo tecidual de pulmões inflamados, mostrando que os grupos que a receberam recuperaram seu peso ao longo do tempo, com exceção do grupo CTM + Ímã.

O grupo CTMs + Ímã, que teve indução da fibrose por bleomicina e foram tratados com CTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato sob efeito de um campo magnético externo formado por um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, não teve recuperação do peso ao longo dos dias e apresentou mortes nos dois experimentos feitos, totalizando um total de 3 mortes para n=6.

Quando comparado aos outros grupos que receberam a administração de adCTMs, esse grupo apresentou perda significativa de peso.

Segundo o estudo do grupo Y. Shen *et al.* (2015), em que foram feitas terapias de reparo tecidual do miocárdio com mobilização magnética de CTMs por ímãs cilíndricos, os grupos submetidos a mobilização magnética tiveram um aumento na retenção das células, porém não houve benefício adicional no funcionamento do órgão após a terapia, quando comparado ao grupo controle⁽⁸⁸⁾.

Apesar do tratamento com CTMs terem se mostrado promissores em muitos estudos, o procedimento de mobilização magnética das CTMs por um ímã cilíndrico faz com que as células se concentrem na região de borda do ímã, formando um anel circular. Devido a isso, a hipótese para o não benéfico adicional no estudo de Y. Shen *et al.* (2015) e dos resultados negativos do grupo submetido a mobilização magnética por um campo magnético formado pelo ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, é de que mesmo que a mobilização magnética tenha ocorrido com sucesso, e ocorra uma maior migração e retenção de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato, elas não conseguem se distribuir por toda a área pulmonar, ficando restritas as regiões equivalentes a borda do ímã, e dessa forma não consigam propiciar um papel terapêutico eficiente nos tecidos inflamados. Também há a suspeita de que devido ao fato dessas células se concentrarem na região de borda do ímã, elas acabem formando agregados, podendo causar microembolias e hemorragias, afetando as trocas gasosas nos alvéolos e assim piorando o quadro inflamatório⁽⁸⁸⁾.

Apesar do grupo CTMs + Ímã ter tido o mesmo número de mortes do que o grupo controle fibrose, os animais do grupo CTM + Ímã apresentaram uma expectativa de vida maior do que os do grupo controle fibrose, mostrando que as adCTMs contribuíram de alguma forma no reparo e modulação da inflamação dos pulmões.

Os grupos CTM, CTM + Tungstênio e CTM + Ímã/Tung, não apresentaram mortes durante os 30 dias de monitoramento e é possível observar que após a administração de adCTMs (a partir do 2º dia) esses grupos conseguiram recuperar e estabilizar o peso (Figura 19), garantindo eficácia no tratamento de adCTMs nesses grupos.

O grupo CTM, que recebeu adCTMs, porém não foi submetido a um campo magnético, apresentou uma quantidade de retenção de adCTMs muito menor do que os grupos que tiveram mobilização magnética, mas quando analisamos os resultados do monitoramento de peso e sobrevivência, este grupo apresentou resultados semelhantes aos grupos CTM + Tungstênio e CTM + Ímã/Tung. Este resultado mostra um indicativo de que talvez, após uma determinada quantidade de adCTMs chegar ao pulmão, o aumento destas não tem um efeito significativo na regulação da inflamação.

Para confirmar tal resultado é preciso realizar mais estudos qualitativos da fisiologia do pulmão dos grupos de animais tratados, como por exemplo, a quantificação de colágeno depositado, mensuração de parâmetros mecânicos do pulmão (resistência e viscoelasticidade, pressão e elastância estática pulmonar), teste de apoptose, etc. Estes estudos serão realizados em breve pelo grupo.

5.2.3 Ensaios clínicos de mobilização magnética de CTMs.

Existem muitos estudos pré-clínicos com mobilização magnética de CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas, porém ainda não há nenhum estudo clínico usando esta técnica^(66,68,69,81,88,89). Isso se deve ao fato de ainda não haver estudos conclusivos sobre o efeito do campo magnético em CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas e também ao fato de que, embora grande parte dos ensaios pré-clínicos mostrem uma maior migração e retenção de CTMs marcadas com nanopartículas magnéticas quando submetidas a um campo magnético externo, não há consenso de que a maior migração e enxertia de CTMs realmente intensifica o papel terapêutico destas no tecido lesionado.

Apesar deste ser um protocolo fácil de ser incorporado nos estudos clínicos, por ser não invasivo, ainda é preciso investigar mais sobre as consequências da mobilização magnética destas células, assim como a quantidade de CTMs ideais a serem enxertadas e o tempo de administração destas, elucidando assim o papel das CTMs nos sítios de lesão.

5.3 PERSPECTIVAS

O posicionamento de esferas de tungstênio, que é um material ferromagnético, ao redor de um ímã cilíndrico modificou a distribuição das linhas de campo, mudando assim a simetria do campo magnético. A mudança na simetria do campo magnético alterou a distribuição do fluido de nanopartículas magnéticas submetidas a este campo. Quando submetido ao campo externo de um único ímã, as nanopartículas magnéticas formam um anel concentrado na região de borda do ímã, porém, com a alteração do gradiente de campo causada pela presença do tungstênio, essas nanopartículas se distribuem de maneira mais uniforme por toda a região do arranjo de ímã e esferas de tungstênio, aumentando assim a sua distribuição.

Apesar de não termos dados suficientes para afirmar que o grupo CTM + Ímã/Tung resultou em uma melhora na regeneração dos pulmões, o fato deste grupo ter apresentado um quantitativo de migração e retenção de adCTMs nos pulmões significativamente maior que nos outros grupos é um resultado muito promissor, pois comprova que campos magnéticos formados por ímãs cilíndricos rodeados por esferas de tungstênio aumentam a migração, retenção e distribuição de adCTMs quando comparados a campos formados apenas por ímãs cilíndricos.

Nossa estratégia de alteração da simetria do campo magnético por meio de esferas de tungstênio, que resulta em uma distribuição mais uniforme e espalhada em relação a área do ímã, pode, a princípio, ser extrapolada e utilizadas em todas terapias que envolvam táticas de mobilização magnética, tais como: mobilização de células marcadas com nanopartículas magnéticas, *drug delivery* de fármacos híbridos magnéticos, e terapias de magnetohipertemia.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados alcançados pode-se concluir que a mobilização magnética de adCTMs por indução de um campo magnético externo aumenta a migração e enxertia destas células em pulmões inflamados em um modelo de fibrose pulmonar em camundongos.

As conclusões deste estudo apontaram, de forma mais específica, que:

1. Esferas de tungstênio ao redor de um ímã mudam a simetria do campo magnético formado pelo ímã, aumentando a homogeneidade e o diâmetro de distribuição de fluidos de nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato.
2. As adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato quando expostas, *in vitro*, a dois campos magnéticos, um formado apenas por um ímã e o outro formado por um ímã e 5 esferas de tungstênio ao redor, simultaneamente, migram mais para o campo magnético formado pelo arranjo ímã/5tungstenio.
3. Ocorre um aumento na migração e retenção de adCTMs marcadas com nanopartículas (γ -Fe₂O₃)-citrato quando submetidas a campos magnéticos externos, em um modelo de fibrose pulmonar em camundongos.
4. Dentre os campos magnéticos estudados, a maior eficácia na migração e retenção de adCTMs foi quando submetidas ao campo magnético formado por um ímã cilíndrico de neodímio, com 1,2 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, rodeado por 5 esferas de tungstênio.
5. Não foi possível concluir se o aumento na migração e retenção de adCTMs favoreceu o reparo tecidual pulmonar dos camundongos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina, sendo necessário mais estudos qualitativos de análise pulmonar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Abdel Aziz, M.T.; Atta, H.M.; et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 893–899, 2007.
- 2 Dominici, M.; Blanc, K. Le; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.
- 3 Aggarwal, S.; Pittenger, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815–22, 2005.
- 4 Zou, J.-P.; Huang, S.; et al. Mesenchymal stem cells/multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): potential role in healing cutaneous chronic wounds. **The international journal of lower extremity wounds**, v. 11, n. 4, p. 244–53, 2012.
- 5 Xu, J.; Wang, D.; et al. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren syndrome. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 3142–51, 2012.
- 6 Bydlowski, S.P.; Debes, A.A.; et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25–35, 2009.
- 7 Meirelles, L. da S.; Fontes, A.M.; et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n. 5-6, p. 419–27, 1991.
- 8 Mok, P.-L.; Leong, C.-F.; et al. Cellular mechanisms of emerging applications of mesenchymal stem cells. **Malaysian J Pathol**, v. 35, n. 1, p. 17–32, 2013.
- 9 Ozaki, K.; Sato, K.; et al. Mechanisms of Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells. **International Journal of Hematology**, v. 86, n. 1, p. 5–7, 2007.
- 10 Karp, J.M.; Leng Teo, G.S.; et al. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell stem cell**, v. 4, n. 3, p. 206–16, 2009.
- 11 Devine, S.M.; Bartholomew, A.M.; et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. **Experimental Hematology**, v. 29, n. 2, p. 244–255, 2001.
- 12 Saito, T.; Kuang, J.-Q.; et al. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. **The Annals of thoracic surgery**, v. 74, n. 1, p. 19–24; discussion 24, 2002.
- 13 Hoogduijn, M.J.; Dor, F.J.M.F. Mesenchymal stem cells: are we ready for clinical

- application in transplantation and tissue regeneration? **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 144, 2013.
- 14 Li, C.; Wu, X.; et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. **Stem cell research & therapy**, v. 6, p. 55, 2015.
- 15 AlexAndre Lorico TissiAni, L.; AguenA, M.; et al. Effects of different liposuction techniques on the isolation of mesenchymal stem cells. **Rev Bras Cir Plást**, v. 27, n. 4, p. 509–13, 2012.
- 16 Claudio-da-Silva, C.; Baptista, L.S.; et al. Autologous mesenchymal stem cells culture from adipose tissue for treatment of facial rhytids. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, 2009.
- 17 Danisovic, L.; Varga, I.; et al. Comparison of in vitro chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **General physiology and biophysics**, v. 28, n. 1, p. 56–62, 2009.
- 18 Elman, J.S.; Li, M.; et al. A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 11, n. 1, p. 1, 2014.
- 19 Huang, J.I.; Kazmi, N.; et al. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 6, p. 1383–1389, 2005.
- 20 Hsiao, S.T.-F.; Asgari, A.; et al. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. **Stem cells and development**, v. 21, n. 12, p. 2189–203, 2012.
- 21 Ahmadian Kia, N.; Bahrami, A.R.; et al. Comparative analysis of chemokine receptor's expression in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 44, n. 3, p. 178–85, 2011.
- 22 Puissant, B.; Barreau, C.; et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British journal of haematology**, v. 129, n. 1, p. 118–29, 2005.
- 23 Aust, L.; Devlin, B.; et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. **Cytotherapy**, v. 6, n. 1, p. 7–14, 2004.
- 24 Orens, J.B.; Garrity, E.R. General Overview of Lung Transplantation and Review of Organ Allocation.

- 25 Treatments for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1407776>, 2014.
- 26 Lau, A.N.; Goodwin, M.; et al. Stem cells and regenerative medicine in lung biology and diseases. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 20, n. 6, p. 1116–30, 2012.
- 27 Lee, S.-H.; Jang, A.-S.; et al. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis. **Respiratory research**, v. 11, p. 16, 2010.
- 28 Akram, K.M.; Samad, S.; et al. Mesenchymal stem cells promote alveolar epithelial cell wound repair in vitro through distinct migratory and paracrine mechanisms.
- 29 Toonkel, R.L.; Hare, J.M.; et al. Mesenchymal stem cells and idiopathic pulmonary fibrosis. Potential for clinical testing. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 188, n. 2, p. 133–40, 2013.
- 30 Akram, K.M.; Samad, S.; et al. Mesenchymal stem cells promote alveolar epithelial cell wound repair in vitro through distinct migratory and paracrine mechanisms. **Respiratory research**, v. 14, p. 9, 2013.
- 31 Hayes, M.; Curley, G.; et al. Mesenchymal stem cells - a promising therapy for Acute Respiratory Distress Syndrome. **F1000 medicine reports**, v. 4, p. 2, 2012.
- 32 Phinney, D.G.; Prockop, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 11, p. 2896–902, 2007.
- 33 Nauta, A.J.; Fibbe, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3499–506, 2007.
- 34 Prockop, D.J. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 17, n. 6, p. 939–46, 2009.
- 35 Giordano, A.; Galderisi, U.; et al. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **Journal of cellular physiology**, v. 211, n. 1, p. 27–35, 2007.
- 36 Uccelli, A.; Moretta, L.; et al. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726–36, 2008.
- 37 Lee, S.-H.; Jang, A.-S.; et al. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis. **Respiratory research**, v. 11, p. 16, 2010.
- 38 Rojas, M.; Xu, J.; et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the

- injured lung. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 33, n. 2, p. 145–52, 2005.
- 39 Ortiz, L.A.; Gambelli, F.; et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8407–11, 2003.
- 40 Akram, K.M.; Samad, S.; et al. Mesenchymal stem cell therapy and lung diseases. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 130, p. 105–29, 2013.
- 41 Antunes, M.A.; Laffey, J.G.; et al. Mesenchymal stem cell trials for pulmonary diseases. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 6, p. 1023–1032, 2014.
- 42 Cargnoni, A.; Gibelli, L.; et al. Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis. **Cell transplantation**, v. 18, n. 4, p. 405–22, 2009.
- 43 Moodley, Y.; Atienza, D.; et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury. **The American journal of pathology**, v. 175, n. 1, p. 303–13, 2009.
- 44 Zhen, G.; Xue, Z.; et al. Mesenchymal stem cell transplantation increases expression of vascular endothelial growth factor in papain-induced emphysematous lungs and inhibits apoptosis of lung cells. **Cytotherapy**, v. 12, n. 5, p. 605–14, 2010.
- 45 Weiss, D.J.; Casaburi, R.; et al. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. **Chest**, v. 143, n. 6, p. 1590–8, 2013.
- 46 Moore, B.B.; Hogaboam, C.M. Murine models of pulmonary fibrosis. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 294, n. 2, p. L152–60, 2008.
- 47 Adamson, I.Y. Pulmonary toxicity of bleomycin. **Environmental health perspectives**, v. 16, p. 119–26, 1976.
- 48 Liu, L.; Mao, Q.; et al. Intranasal versus Intraperitoneal Delivery of Human Umbilical Cord Tissue-Derived Cultured Mesenchymal Stromal Cells in a Murine Model of Neonatal Lung Injury. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 12, p. 3344–3358, 2014.
- 49 Abreu, S.C.; Antunes, M.A.; et al. Bone marrow-derived mononuclear cells vs. mesenchymal stromal cells in experimental allergic asthma. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 187, n. 2, p. 190–198, 2013.
- 50 Haafte, T. van; Byrne, R.; et al. Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents

- arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 180, n. 11, p. 1131–42, 2009.
- 51 Chang, Y.S.; Oh, W.; et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. **Cell transplantation**, v. 18, n. 8, p. 869–86, 2009.
- 52 Hansmann, G.; Fernandez-Gonzalez, A.; et al. Mesenchymal stem cell-mediated reversal of bronchopulmonary dysplasia and associated pulmonary hypertension. **Pulmonary circulation**, v. 2, n. 2, p. 170–81,
- 53 Chang, Y.S.; Choi, S.J.; et al. Intratracheal transplantation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells dose-dependently attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. **Cell transplantation**, v. 20, n. 11-12, p. 1843–54, 2011.
- 54 Donega, V.; Velthoven, C.T.J. van; et al. Intranasal Mesenchymal Stem Cell Treatment for Neonatal Brain Damage: Long-Term Cognitive and Sensorimotor Improvement. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e51253, 2013.
- 55 Munder, A.; Wölbeling, F.; et al. Acute intratracheal *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis mice is age-independent. **Respiratory research**, v. 12, n. 1, p. 148, 2011.
- 56 So, M.-K.; Xu, C.; et al. Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 339–43, 2006.
- 57 Lübbe, A.S.; Bergemann, C.; et al. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy. **Cancer research**, v. 56, n. 20, p. 4694–701, 1996.
- 58 Jain, T.K.; Reddy, M.K.; et al. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 316–327, 2008.
- 59 Lin, M.M.; Kim, D.K.; et al. Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation to clinical applications. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 7, n. 4, p. 298–305, 2008.
- 60 Cortajarena, A.L.; Ortega, D.; et al. Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings. **Nanobiomedicine**, v. 1, n. 2, p. 1, 2014.
- 61 Singh, N.; Jenkins, G.J.S.; et al. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). **Nano reviews**, v. 1, 2010.
- 62 Taboada, E.; Rodríguez, E.; et al. Relaxometric and magnetic characterization of ultrasmall iron oxide nanoparticles with high magnetization. Evaluation as potential T1 magnetic resonance imaging contrast agents for molecular imaging. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 23, n. 8, p. 4583–8, 2007.

- 63 Winter, E.M.; Hogers, B.; et al. Cell tracking using iron oxide fails to distinguish dead from living transplanted cells in the infarcted heart. **Magnetic resonance in medicine**, v. 63, n. 3, p. 817–21, 2010.
- 64 Hadjizadeh, A.; Doillon, C.J. Directional migration of endothelial cells towards angiogenesis using polymer fibres in a 3D co-culture system. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 4, n. 7, p. 524–531, 2010.
- 65 Chaudeurge, A.; Wilhelm, C.; et al. Can magnetic targeting of magnetically labeled circulating cells optimize intramyocardial cell retention? **Cell transplantation**, v. 21, n. 4, p. 679–91, 2012.
- 66 Yanai, A.; Häfeli, U.O.; et al. Focused magnetic stem cell targeting to the retina using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Cell transplantation**, v. 21, n. 6, p. 1137–48, 2012.
- 67 Huang, Z.; Pei, N.; et al. Deep magnetic capture of magnetically loaded cells for spatially targeted therapeutics. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2130–2140, 2010.
- 68 Huang, Z.; Shen, Y.; et al. The effect of nonuniform magnetic targeting of intracoronary-delivering mesenchymal stem cells on coronary embolisation. **Biomaterials**, 2013.
- 69 Nishida, K.; Tanaka, N.; et al. Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord: through cerebrospinal fluid. **Neuroreport**, v. 17, n. 12, p. 1269–72, 2006.
- 70 Hamasaki, T.; Tanaka, N.; et al. Magnetically labeled neural progenitor cells, which are localized by magnetic force, promote axon growth in organotypic cocultures. **Spine**, v. 32, n. 21, p. 2300–5, 2007.
- 71 Ito, A.; Hibino, E.; et al. Construction and delivery of tissue-engineered human retinal pigment epithelial cell sheets, using magnetite nanoparticles and magnetic force. **Tissue engineering**, v. 11, n. 3-4, p. 489–96,
- 72 Kyrtatos, P.G.; Lehtolainen, P.; et al. Magnetic Tagging Increases Delivery of Circulating Progenitors in Vascular Injury. **JACC: Cardiovascular Interventions**, v. 2, n. 8, p. 794–802, 2009.
- 73 Cores, J.; Caranasos, T.G.; et al. Magnetically Targeted Stem Cell Delivery for Regenerative Medicine. **Journal of functional biomaterials**, v. 6, n. 3, p. 526–46, 2015.
- 74 Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 66, n. 17, p. 2873–96, 2009.
- 75 Andreas, K.; Georgieva, R.; et al. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. **Biomaterials**, v.

33, n. 18, p. 4515–4525, 2012.

76 Tukmachev, D.; Lunov, O.; et al. An effective strategy of magnetic stem cell delivery for spinal cord injury therapy. **Nanoscale**, v. 7, n. 9, p. 3954–8, 2015.

77 **Polymer Dispersions and Their Industrial Applications**. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002.

78 Legrand, P.; Barratt, G.; et al. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. v. 9, n. 5, p. 411–418, 1999.

79 Schaffazick, S.R.; Guterres, S.S.; et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

80 Saraswathy, A.; Nazeer, S.S.; et al. Citrate coated iron oxide nanoparticles with enhanced relaxivity for in vivo magnetic resonance imaging of liver fibrosis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 216–224, 2014.

81 Nakamae, T.; Adachi, N.; et al. The effect of an external magnetic force on cell adhesion and proliferation of magnetically labeled mesenchymal stem cells. **Sports medicine, arthroscopy, rehabilitation, therapy & technology : SMARTT**, v. 2, n. 1, p. 5, 2010.

82 Schäfer, R.; Bantleon, R.; et al. Functional investigations on human mesenchymal stem cells exposed to magnetic fields and labeled with clinically approved iron nanoparticles. **BMC Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 22, 2010.

83 Kean, T.J.; Lin, P.; et al. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. **Stem cells international**, v. 2013, p. 732742, 2013.

84 Polyak, B.; Fishbein, I.; et al. High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 2, p. 698–703, 2008.

85 Cheng, K.; Malliaras, K.; et al. Magnetic Enhancement of Cell Retention, Engraftment, and Functional Benefit After Intracoronary Delivery of Cardiac-Derived Stem Cells in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion.

86 Huang, Z.; Shen, Y.; et al. The effect of nonuniform magnetic targeting of intracoronary-delivering mesenchymal stem cells on coronary embolisation. **Biomaterials**, v. 34, n. 38, p. 9905–9916, 2013.

87 Lau, A.N.; Goodwin, M.; et al. Stem Cells and Regenerative Medicine in Lung Biology and Diseases. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 6, p. 1116–1130, 2012.

88 Shen, Y.; Liu, X.; et al. Comparison of Magnetic Intensities for Mesenchymal Stem Cell

Targeting Therapy on Ischemic Myocardial Repair: High Magnetic Intensity Improves Cell Retention but Has no Additional Functional Benefit. **Cell transplantation**, v. 24, n. 10, p. 1981–97, 2015.

89 Sugioka, T.; Ochi, M.; et al. Accumulation of magnetically labeled rat mesenchymal stem cells using an external magnetic force, and their potential for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 85A, n. 3, p. 597–604, 2008.