



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

**MARCAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS COM
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS FUNCIONALIZADAS COM
ÁCIDO 2,3-DIMERCAPTOSUCCÍNICO (DMSA)**

LUÍSA HELENA ANDRADE DA SILVA

BRASÍLIA

2014

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

LUÍSA HELENA ANDRADE DA SILVA

**MARCAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS COM NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO 2,3-DIMERCAPTOSUCCÍNICO (DMSA)**

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
2014

Dissertação de Mestrado

LUÍSA HELENA ANDRADE DA SILVA

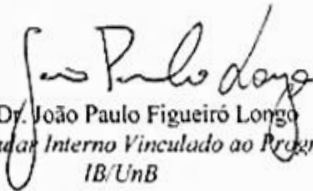
Título:

“Marcação de Células-tronco Mesenquimais com Nanopartículas Metálicas funcionalizadas com Ácido 2,3 – Dimercapto Succínico (DMSA).”

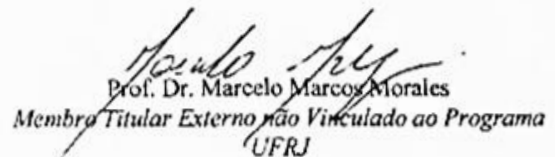
Comissão Examinadora:



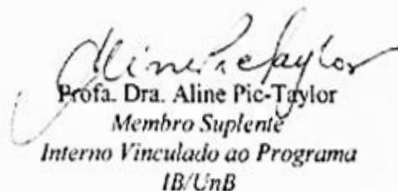
Profa. Dra. Daniela Mara de Oliveira
Presidente / Orientadora
IB/UnB



Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
IB/UnB



Prof. Dr. Marcelo Marcos Moraes
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
UFRJ



Profa. Dra. Aline Pic-Taylor
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
IB/UnB

Brasília, 01 de julho de 2014.

Dedico este trabalho a minha família, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Considerando esta dissertação como resultado de uma caminhada que não começou na UnB, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que, de alguma forma, passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

À minha família, por sua capacidade de acreditar em mim e investir em mim. Agradeço a minha mãe, Ma. Rita de Cássia da Silva, heroína que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu pai, Dr. Sidnei Luís Andrade, cuja presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

À minha irmã Aline Andrade, meu irmão de consideração Leonardo, à minha sobrinha Sophia e aos demais familiares que, apesar de todas as dificuldades, me fortaleceram e que para mim foram muito importantes. E que sempre me fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente!

Agradeço também a minha professora orientadora, Profa. Dra. Daniela de Oliveira, pela paciência na orientação e pelo incentivo que tornou possível a conclusão desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo pela disponibilização da sala de cultura, imprescindível para a realização deste trabalho.

À Sra. Zélia Ramos, pela sua competência, dedicação e empenho em administrar o nosso laboratório e auxiliar não somente a mim, mas a todos os estudantes com seus trabalhos.

Ao Prof. Dr. Luciano Paulino, por me apresentar a rotina do pesquisador e a me ensinar como construir um trabalho de pesquisa com responsabilidade e eficiência.

Ao Prof. Dr. Sacha Braun Chaves, pela valiosa orientação em todas as etapas dos testes com animais: desde os processamentos histológicos até as análises no microtomógrafo.

À Dra. Luciana Oliveira Pereira, por seus valiosos conselhos e ensinamentos sobre cultivo *in vitro* de células mesenquimais de polpa dental.

Ao Prof. Dr. Rafael Monteiro, às suas alunas do Hospital Veterinário da UnB e à mestrande Janaína Penteado por me ensinarem a manipular os camundongos com respeito, ética e responsabilidade.

Meus agradecimentos aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia e do Laboratório de Biologia de Células-Tronco que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pela oportunidade de fazer o curso.

Ao Instituto de Ciências Biológicas, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela pela qual hoje vislumbro um horizonte superior.

Aos professores Dr. João Paulo Longo, Dr. Marcelo Morales e Dra. Aline Pic-Taylor, que compuseram a banca examinadora dessa dissertação, pela leitura cuidadosa do meu trabalho e pelas valiosas observações e sugestões.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

*“Muitas pessoas devem a grandeza de suas
vidas aos desafios que tiveram de vencer”*

Robert Baden-Powell

RESUMO

Introdução: A marcação e o rastreamento de células-tronco *in vivo* são técnicas não invasivas que permitem visualizar o deslocamento das células dentro do organismo e o quanto efetivamente elas migram para locais patologicamente afetados, a fim de aperfeiçoar terapias celulares. Alguns materiais comumente usados como marcadores de células-tronco são nanopartículas metálicas; entretanto, sabe-se que estes componentes podem ser prejudiciais para as células receptoras, tornando-se importante a realização de estudos preliminares de biocompatibilidade antes de marcar e rastreá-las *in vivo*. **Objetivo:** Verificar se nanopartículas de óxido de ferro e de ouro, ambas funcionalizadas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), podem atuar como traçadores para células-tronco mesenquimais de polpa dental (pdCTMs), sem afetar sua fisiologia e, ao mesmo tempo, permitindo a visualização e rastreamento destas por microtomografia computadorizada em um modelo murino de fibrose pulmonar. **Métodos:** a) A toxicidade de ambas as nanopartículas sobre as pdCTMs foi avaliada através de ensaios de viabilidade celular com MTT e Azul de Tripan; das análises morfológicas das células marcadas em microscopia de luz; e da análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET). b) A visualização e mensuração da interiorização das nanopartículas Fe-DMSA foi realizada por meio da técnica de coloração “Azul da Prússia” e pela dosagem colorimétrica deste corante, respectivamente. A visualização e quantificação do *uptake* das nanopartículas Au-DMSA foi realizada por análise em microscopia confocal e por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), respectivamente. c) Verificou-se se houve alterações de parâmetros fisiológicos como: diferenciação osteogênica e adipogênica; taxas de proliferação; e supressão linfocitária nas pdCTMs marcadas com as nanopartículas. d) Empregou-se o modelo murino de fibrose pulmonar, induzida por bleomicina, para dar suporte teórico sobre a migração das pdCTMs marcadas quando inoculadas por duas vias de administração: intravenosa e intranasal. e) Testou-se o uso da Fe-DMSA e da Au-DMSA como traçadores de pdCTMs, verificando a eficiência de detecção destas, em microtomografia computadorizada. Após a inoculação de 5×10^5 células marcadas em camundongos, estes foram analisados diariamente no equipamento. **Resultados:** Não houve redução estatisticamente significativa da viabilidade das pdCTMs e não foram detectados, em microscopia de luz, sinais característicos de morte celular na presença do Fe-DMSA e Au-DMSA, em todas as concentrações testadas. Fotos obtidas por MET

comprovaram a presença destas nanopartículas no citoplasma celular: observou-se as Au-DMSA e as Fe-DMSA associadas a algumas organelas, principalmente mitocôndrias, provocando alterações ultraestruturais nestas. Assim, estas imagens sugerem toxicidade mitocondrial e formação de corpos apoptóticos, principalmente nas pdCTMs expostas ao Fe-DMSA. Os testes de mensuração de interiorização indicaram uma quantidade média de 17 picogramas (pg) de Fe-DMSA em cada célula e 4 pg de Au-DMSA/célula. Também não houve alterações significativas das taxas de adipogênese e osteogênese; das curvas de crescimento e da inibição de proliferação linfocitária entre pdCTMs marcadas e não marcadas. Apesar da biocompatibilidade entre as nanopartículas e as células, tanto o Au-DMSA quanto o Fe-DMSA não puderam ser detectados no microtomógrafo, após serem incorporados pelas pdCTMs. **Conclusões:** Embora assegurado, em termos de biocompatibilidade, o uso de Fe-DMSA e Au-DMSA como marcadores de pdCTMs, estas nanopartículas metálicas mostraram não ser adequadas para visualização e rastreamento *in vivo* das células por microtomografia, tendo em vista que não foram detectadas pelo equipamento, nas concentrações testadas.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais de polpa dental; nanopartículas de óxido de ferro; nanopartículas de ouro; biocompatibilidade; microtomografia computadorizada.

ABSTRACT

Introduction: Labeling and Tracking stem cells *in vivo* are noninvasive techniques that allow visualizing the movement of cells within the body and how effectively they migrate to pathologically affected sites, in order to improve cellular therapies. Some materials commonly used as stem cells markers are metallic nanoparticles; however, it is known that these components can be prejudicial to receptor cells, hence it is important to perform preliminary biocompatibility studies before label and track them *in vivo*. **Objective:** Assess if iron oxide and gold nanoparticles, both functionalized with 2,3-dimercaptosuccinic (DMSA) acid, can act as tracers for mesenchymal stem cells from dental pulp (dpMSCs), without affecting their physiology and, at the same time, allowing the visualization and tracking of these in a computed microtomography apparatus, based on an experimental model of pulmonary fibrosis. **Methodology:** a) The toxicity of both nanoparticles on dpMSCs was assessed by MTT and Trypan Blue viability assays; by morphological analysis of labeled cells under light microscopy; and by analysis in transmission electron microscopy (TEM). b) The visualization and measurement of nanoparticles Fe-DMSA uptake were performed by "Prussian Blue" staining technique and by colorimetric dosage of this dye, respectively. Visualization and uptake quantification of Au-DMSA nanoparticles were performed by confocal microscopy and analysis by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES), respectively. c) Changes in physiological parameters, such as osteogenic and adipogenic differentiation; proliferation rates; and lymphocyte suppression, were checked in labeled dpMSCs. d) A murine model of pulmonary fibrosis, induced by bleomycin, was employed to give theoretical support about the labeled dpMSCs' migration when inoculated by two routes of administration: intravenous and intranasal. e) After inoculation of 5×10^5 labeled cells in mice, these were analyzed daily in the microtomograph in order to detect uptaken Fe-DMSA and Au-DMSA, checking their efficiency as tracers of dpMSCs. **Results:** There was no statistically significant reduction in the dpMSCs viability and characteristic signs of cell death were not detected by light microscopy analysis, after Fe-DMSA and Au-DMSA uptake, at all concentrations tested. Photos obtained by TEM confirmed the presence of these nanoparticles in the cytoplasm: Fe-DMSA and Au-DMSA were observed associated to some organelles, especially mitochondria, causing structural changes there. Hence mitochondrial toxicity and formation of apoptotic bodies was observed, especially in dpMSCs exposed to Fe-

DMSA. The uptake measurement tests indicated an average amount of 17 picograms (pg) of Fe-DMSA per cell and 4 pg of Au-DMSA per cell. There were also no significant changes in adipogenesis and osteogenesis; growth curves and inhibition of lymphocyte proliferation between labeled and unlabeled dpMSCs. Although the biocompatibility between both nanoparticles and cells was proved, Fe-DMSA as well as Au-DMSA could not be detected in microtomograph after being incorporated by dpMSCs. **Conclusions:** In terms of biocompatibility, the use of Fe-DMSA and Au-DMSA as tracers for dpMSCs was assured. However, these metal nanoparticles shown to be not suitable for visualization and tracking of these cells *in vivo* by computed microtomography, considering that they were not detected by the equipment, at the concentrations tested.

Keywords: Dental pulp mesenchymal stem cells; iron oxide nanoparticles; gold nanoparticles; biocompatibility; computed microtomography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (A)** Representação de técnica não-cirúrgica de instilação intratraqueal em camundongos. Cateteres intravenosos atuam como sondas que permitem a administração de líquidos em região próxima à traquéia. Adaptado de Munder *et al* (2011). **(B)** Representação de instilação intranasal em camundongos. Adaptado de Munder *et al* (2011)..... **8**
- Figura 2.** Representação esquemática de uma nanopartícula de maghemita recoberta com DMSA (Fe-DMSA). Fonte: Vallois *et al* (2009). **15**
- Figura 3.** Teste de viabilidade celular pelo método MTT. Os dados expressam a porcentagem média, em relação ao grupo controle, e desvio-padrão de células-tronco mesenquimais que permaneceram viáveis após a exposição às nanopartículas de FE-DMSA, diluídas em DMEM-LG com soro, em quatro diferentes concentrações (15; 30; 60 e 80 µg/mL), durante três diferentes tempos de exposição (02, 06 e 24 horas). Não foram detectadas diferenças significativas entre grupos controle e grupos experimentais (valor $P > 0,05$). Foram realizados três ensaios independentes (n=16). **41**
- Figura 4. (A)** Testes de viabilidade celular pelo método MTT. Os dados expressam a porcentagem média, em relação ao grupo controle, e desvio-padrão de células-tronco mesenquimais que permaneceram viáveis após 24 horas de exposição às nanopartículas de Au-DMSA, diluídas em DMEM-LG com soro, em três diferentes concentrações (52; 90; e 130 µg/mL). (*) Houve diferenças significativas entre células submetidas aos três tratamentos e as do grupo controle ($p < 0,01$). Foram realizados três ensaios independentes (n=17). **(B)** Testes de viabilidade celular pelo método MTT. Células-tronco mesenquimais foram expostas às nanopartículas de Au-DMSA (90 µg/mL) durante 24 horas, sendo possível notar valores crescentes de viabilidade celular com o decorrer do tempo, isto é, 48 e 72 horas após a exposição (n=8). (*) Houve diferenças significativas entre células controle e células 4 e 24 horas após a exposição ($p < 0,05$). **42**
- Figura 5.** Teste de viabilidade celular de coloração com Azul-tripan. Os dados expressam a porcentagem média e desvio-padrão de células-tronco mesenquimais que permaneceram vivas após 24 horas de exposição a duas concentrações de Au-DMSA e de Fe-DMSA, diluídas em DMEM-LG com soro (52 e 90 µg/mL e 60 e 80 µg/mL,

respectivamente). Foram realizados três ensaios independentes, cada qual em quadruplicata (n=12).43

Figura 6. Análise de morfologia das pdCTMs por coloração com kit *Instant Prov.* As células foram expostas a 80 µg/mL de Fe-DMSA **(C)** e a 90 µg/mL de Au-DMSA **(D)** durante 24 horas e mantiveram seu formato característico, semelhantemente ao grupo controle negativo **(A)** e não apresentaram picnose nuclear, observados nas células apontadas com setas azuis no grupo controle positivo (células em regime de depleção de soro) **(B)**. Barras: 50 µm. Aumento de 200x.....45

Figura 7. Curva-padrão elaborada para quantificação de ferro em soluções aquosas. No eixo das abcissas estão valores de absorbância a 630nm, enquanto que os valores no eixo das ordenadas se referem à concentração de ferro (em µg/mL) na amostra analisada. Equação da reta: $y = 0,0289x + 0,0013$. Índice de regressão linear $R^2 = 0,9994$46

Figura 8. Teste de dosagem de ferro intracelular por coloração com Azul da Prússia. Os dados referem-se à média e desvio-padrão da quantidade de ferro presente em CTM após exposição a duas concentrações de Fe-DMSA (60 e 80 µg/mL) durante três tempos (2, 6 e 24 horas). (*) Houve diferença estatisticamente significativa entre CTM tratadas com nanopartículas diluídas a 80 µg/mL durante 24 horas, em comparação a seu grupo controle ($p < 0,05$). n=3.....47

Figura 9. Teste de detecção de ferro associado por técnica de coloração Azul da Prússia. As pdCTMs foram contracoradas com vermelho rápido nuclear, assim, o metal está evidenciado na cor azul, em contraste ao citoplasma rosado e núcleo avermelhado. As pdCTMs foram incubadas apenas com DMEM-LG suplementado **(A)**, ou com o meio contendo nanopartículas diluídas a 80 µg/mL por 02 horas **(B)** ou por 24 horas **(C)**. Barra: 50 µm. Aumento 200x.....48

Figura 10. **(A)** Imagem de microscopia confocal de pdCTMs controle **(B)** Imagem de microscopia confocal de pdCTMs expostas ao Au-DMSA, diluído a 8 µg/mL, durante 24 horas. Em ambos os grupos, as pdCTMs foram coradas com DAPI, evidenciando os núcleos celulares em azul. Barras: 10 µm..49

Figura 11. Análise de uptake de nanopartículas metálicas em microscopia eletrônica de transmissão. **(A)** pdCTMs “controle”, **(B)** pdCTMs marcadas com Fe-DMSA, **(C)** pdCTMs

marcadas com Au-DMSA. Em **(B)**, as setas brancas evidenciam algumas das nanopartículas de maghemita interiorizadas; enquanto em **(C)** as setas pretas apontam exemplos de nanopartículas de ouro interiorizadas. Nu: núcleo celular; M: mitocôndrias. Barras: 1µm.51

Figura 12. Exemplos de características de pdCTMs não marcadas, evidenciadas por microscopia eletrônica de transmissão. **(A)** formato oval, com núcleos irregulares e cromatina dispersa; **(B)** projeções microvilares; **(C)** em detalhe, retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e mitocôndrias alongadas; **(D)** presença de vesículas de gordura. Nu: Núcleo celular; Mv: Microvilosidades; M: Mitocôndrias; RER: Retículo Endoplasmático Rugoso; Li: gotículas lipídicas. Aumentos variados.52

Figura 13. Análise em microscopia eletrônica de transmissão da interiorização de Fe-DMSA e de sinais de toxicidade decorrentes. **(A)** O *uptake* de nanopartículas na pdCTM se dá por endocitose, sendo possível visualizar projeções citoplasmáticas as envolvendo e, em seguida, estas foram armazenadas em vesículas (setas pretas). **(B)** Toxicidade mitocondrial provocada pelo acúmulo de ferro: mitocôndrias com o metal estão inchadas e degeneradas (setas pretas), em comparação às organelas sem este (setas brancas). **(C)** Observou-se estruturas semelhantes à corpos apoptóticos (*) e figuras de mielina (setas pretas) no citoplasma.53

Figura 14. Análise em microscopia eletrônica de transmissão de pdCTMs expostas ao Au-DMSA a 90 µg/mL durante 24 horas. Em ambas as fotos, alguns exemplos de ouro interiorizado são apontados por setas brancas. **(A)** Foi possível observar muitas figuras de mielina no citoplasma, como as evidenciadas pelas setas pretas. **(B)** Muitas pdCTMs apresentaram mais estruturas eletrólucidas, como as representadas pelos asteriscos (*) em em comparação às pdCTMs do grupo controle.54

Figura 15. Ensaio de diferenciação osteogênica. Análise em microscópio óptico de monocamadas de pdCTMs não diferenciadas **(A,B,C)** e pdCTMs diferenciadas **(D,E,F)**, coradas com Vermelho de Alizarina. Evidencia-se assim a formação de nódulos mineralizados, os quais estiveram presentes tanto em pdCTMs não marcadas **(D)**, pdCTMs marcadas com Fe-DMSA (80µg/mL) **(E)** e pdCTMs marcadas com Au-DMSA (90µg/mL) **(F)**. Barras: 100 µm.56

Figura 16. Ensaio de diferenciação osteogênica. Análise em lupa de monocamadas de pdCTMs não diferenciadas **(A,B,C)** e pdCTMs diferenciadas **(D,E,F)** , coradas com

Vermelho de Alizarina. Evidencia-se assim a formação de nódulos mineralizados, os quais estiveram presentes tanto em pdCTMs não marcadas **(D)** pdCTMs marcadas com Fe-DMSA (80µg/mL) **(E)** e pdCTMs marcadas com Au-DMSA (90µg/mL) **(F)**. Barras: 5 mm.....56

Figura 17. Ensaio de diferenciação osteogênica. Os dados expressam a média e desvio-padrão da quantidade de Vermelho de Alizarina, em microgramas, incorporados nas monocamadas de CTMs diferenciadas e não diferenciadas. **(*)** Houve diferença estatística significativa entre as médias do grupo “CTM + Au-DMSA diferenciadas” em comparação às do grupo “controle diferenciadas” e grupo “CTM + Fe-DMSA diferenciadas” ($p < 0,05$). Foram realizados dois ensaios independentes ($n=12$).57

Figura 18. Ensaio de diferenciação osteogênica. Os dados expressam a média da relação entre atividade de fosfatase alcalina (ALP) e conteúdo proteico total, com os respectivos desvios-padrão. Não houve diferença significativa entre grupo controle e grupos experimentais ($p > 0,05$). Foram realizados dois ensaios independentes ($n=16$).58

Figura 19. Ensaio de diferenciação adipogênica. Análise em microscópio óptico de monocamadas de pdCTMs não diferenciadas **(A,B,C)** e pdCTMs diferenciadas **(D,E,F)**, coradas com Oil Red O. Evidencia-se assim a formação de vesículas lipídicas intracelulares, os quais estiveram presentes tanto em pdCTMs não marcadas **(D)** pdCTMs marcadas com Fe-DMSA (80µg/mL) **(E)** e pdCTMs marcadas com Au-DMSA (90µg/mL) **(F)**. Barras: 100 µm.59

Figura 20. Ensaio de diferenciação adipogênica. Os dados expressam a média e desvio-padrão da quantidade de Oil Red O, em microgramas, incorporados nas monocamadas de CTMs diferenciadas e não diferenciadas. Não houve diferença significativa entre grupo controle e grupos experimentais ($p > 0,05$). Foram realizados dois ensaios independentes ($n=12$).59

Figura 21. Curvas de proliferação de células-tronco mesenquimais de polpa dental. pdCTMs, expostas durante 24 horas ao DMEM-LG suplementado **(•)**, ou ao mesmo meio com nanopartículas de Fe-DMSA **(◻)** diluídas a 80 µg/mL, foram semeadas e contadas após diferentes tempos de incubação. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) em quaisquer tempos de contagem. Foram testadas células oriundas de três amostras biológicas diferentes e cada ensaio foi realizado em triplicata ($n=9$).60

Figura 22. Curvas de proliferação de células-tronco mesenquimais de polpa dental. pdCTMs, expostas durante 24 horas ao DMEM-LG suplementado (●), ou ao mesmo meio com nanopartículas de Au-DMSA (■) diluídas (90 µg/mL), foram semeadas e contadas após diferentes tempos de incubação. (*) Houve aumento significativa das médias do grupo Au-DMSA em comparação ao grupo controle apenas no tempo 2 ($p < 0,05$). (■) Dados analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Foram testadas células oriundas de três amostras biológicas diferentes e cada ensaio foi realizado em triplicata (n=9).61

Figura 23. Análise em citometria de fluxo de linfócitos marcados com CFSE, cocultivados com pdCTMs marcadas e pdCTMs não marcadas. Os espectros mostrados são representativos de ensaios realizados em triplicata.62

Figura 24. Análise histológica de pulmões murinos corados pela técnica de tricrômico de Gomori (A) Tecido pulmonar de um indivíduo após 7 dias de tratamento com dose 4UI/Kg de bleomicina, via intratraqueal. (B) Animal tratado com dose 6UI/Kg de bleomicina, eutanasiado 7 dias após a administração. (C) Animal tratado com dose 8UI/Kg, 4 dias após a administração. Barras: 100µm.64

Figura 25. Análise histológica de pulmões murinos corados com Hematoxilina e Eosina. (A) tecido pulmonar de um indivíduo controle, saudável, que não recebeu bleomicina. (B) tecido pulmonar de animal tratado com dose 6UI/Kg de bleomicina, eutanasiado 4 dias após a administração. Foram observados infiltrados linfocitários no local, indicados pelo asterisco branco. (C) tecido pulmonar de animal tratado com dose 6UI/Kg de bleomicina, eutanasiado 7 dias após a administração. Barras: 100µm.....65

Figura 26. Análise histológica de pulmões murinos, corados pela técnica de Azul da Prússia e contracorados com vermelho neutro. Os animais receberam administração intratraqueal de bleomicina (6UI/Kg) e, 24 horas depois, foram tratados intranasalmente com $5 \cdot 10^5$ pdCTMs marcadas com Fe-DMSA. Algumas das células presentes no tecido pulmonar estão evidenciadas em azul (setas pretas). Barra: 50 µm..66

Figura 27. Análise histológica de linfonodos murinos associados aos pulmões, corados pela técnica de Azul da Prússia e contracorados com vermelho neutro. Os animais receberam administração intratraqueal de bleomicina (6UI/Kg) e foram tratados

intravenosamente **(A)** ou intranasalmente **(B)** com 5×10^5 células-tronco mesenquimais/animal. Barra: 50 μm67

Figura 28. Análise histológica de pulmões murinos, corados com hematoxilina e eosina. Os animais receberam administração intratraqueal de bleomicina (6UI/Kg) e, 24 horas após, foram tratados intranasalmente **(A)** e **(B)** ou intravenosamente **(C)** e **(D)** com 5×10^5 células-tronco mesenquimais/animal. Barra: 200 μm67

Figura 29. Monitoramento dos pesos dos camundongos durante o tratamento com bleomicina e pdCTMs, por duas rotas de administração: intravenosa e intranasal. **(A)** Os dados se referem às médias e desvios-padrão dos pesos dos animais ao longo dos dias de tratamento (n=4). **(B)** Os valores foram submetidos aos testes de normalidade e, em seguida a uma análise individualizada pelo teste T-student. (*) Houve uma redução significativa da média do grupo “controle fibrose”, em comparação ao grupo “controle saudável” (p<0,05). (♦) Houve uma redução significativa da média do grupo “CTM venosa”, em comparação ao grupo “controle saudável” (p<0,05).....69

Figura 30. Análise em microtomografia computadorizada. As imagens mostram secções transversais, na altura da sexta costela, de camundongos saudáveis **(A,C,E,G)** e de camundongos com fibrose pulmonar **(B,D,F,H)**. Os animais foram analisados 1 **(A e B)**, 3 **(C e D)**, 5 **(E e F)** e 7 **(G e H)** dias após a administração de bleomicina. Co: coração ; V: vértebra; Es: osso esterno.....71

Figura 31. Análise de dados de microtomografia computadorizada no software CT Analyser. Os gráficos representam o perfil de frequência de valores na escala de cinza em imagens tridimensionais dos pulmões de animais saudáveis (linha preta) e de animais com fibrose pulmonar (linha vermelha). Os animais foram analisados 1 **(A)**, 3 **(B)**, 5 **(C)** e 7 **(D)** dias após a administração de bleomicina/solução salina.....72

Figura 32. Análise de precipitados de pdCTMs em microtomógrafo Sky-Scan 1640. Estão representadas acima secções transversais das amostras em tubos tipo eppendorf para mensuração destas em unidades Hounsfield. **(A)** água **(B)** pdCTMs não marcadas. **(C)** pdCTMs marcadas com Fe-DMSA. **(D)** pdCTMs marcadas com Au-DMSA.73

Figura 33. Análise em microtomografia computadorizada. As imagens mostram secções longitudinais de camundongos saudáveis **(A,C)** e de camundongos com fibrose pulmonar, nos quais foram inoculadas 10^6 pdCTMs marcadas com Fe-DMSA **(B,D)**. Os

animais foram analisados logo após a administração intranasal das células-tronco (A,B) e sete dias após a inoculação (C,D). B: brônquio; Co: coração ; F: fígado; T: traquéia.....74

Figura 34. Análise em microtomografia computadorizada. As imagens mostram secções longitudinais de camundongos saudáveis (A,C,E) e de camundongos com fibrose pulmonar, nos quais foram inoculadas 10^6 pdCTMs marcadas com Au-DMSA (B,D,F). Os animais foram analisados logo após a administração intranasal das células-tronco (A,B), cinco dias (C,D) e sete dias após a inoculação (E,F). B: brônquio; Co: coração ; F: fígado; T: traquéia.....75

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Monitoramento dos pesos dos camundongos durante o tratamento com bleomicina e pdCTMs, por duas rotas de administração: intravenosa e intranasal. Foram escolhidos 4 animais para cada grupo experimental, de modo randômico. No dia 1, administrou-se 50 µl do fármaco diluído a 6UI/Kg, ou de solução fisiológica estéril (grupo controle saudável), por instilação intratraqueal. No dia 2, inoculou-se 5×10^5 pdCTMs nos animais dos grupos “CTMs venosa” e “CTMs nasal”. O peso dos animais também foi mensurado no dia seguinte (dia 3) à inserção das células e 24 horas antes destes serem eutanasiados (dia 7).....**68**
- Tabela 2.** Análise de dados de microtomografia computadorizada no software CT Analyser. Os dados representam a a média dos índices de cinza em imagens tridimensionais de pulmões murinos saudáveis ou com fibrose. Houve diferença estatística entre os dois grupos no sétimo dia de análise.....**72**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **A** Ampère
- **adCTMs** Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo
- **ALP** Fosfatase Alcalina (do inglês *Alkaline Phosphatase*)
- **ARS** Vermelho de Alizarina (do inglês *Alizarin Red Stain*)
- **Au-DMSA** Nanopartículas de ouro revestidas por DMSA
- **Au-NPs** Nanopartículas de ouro
- **CFSE** *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
- **CTAd** Célula-tronco adulta
- **CTM** Célula-tronco mesenquimal
- **DAPI** 4'6'-diamidino-2-fenilindol
- **DMEM-LG** *Low Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **DMSA** Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico
- **Fe-DMSA** Nanopartículas de óxido de ferro revestidas por DMSA
- **Fe-NPs** Nanopartículas de óxido de ferro
- **FPI** Fibrose pulmonar idiopática
- **ICP-OES** Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
- **M** Molar
- **MET** Microscopia Eletrônica de Transmissão
- **moCTMs** Células-tronco mesenquimais da medula óssea
- **MTC** Microtomografia computadorizada
- **MTT** 3-(4,5 dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- **N** Normalidade
- **PBS** Tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate Saline Buffer*)
- **pdCTMs** Células-tronco mesenquimais da polpa dental
- **RM** Ressonância Magnética
- **RPM** Rotações por minuto
- **TC** Tomografia computadorizada
- **UI** Unidades Internacionais
- **V** Volts
- **Z** Número Atômico
- **μ** Micro
- **\cong** Aproximadamente igual a

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs)	2
1.1.1. Propriedades migratórias e imunomodulatórias das CTMs.....	5
1.2. CTMs E FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA	6
1.3. MARCAÇÃO E RASTREAMENTO IN VIVO DE CTMs	9
1.3.1. Técnicas para rastreamento in vivo de células-tronco.....	9
1.3.2. As nanopartículas como marcadores para visualização de CTMs in vivo.....	11
1.4. MARCAÇÃO DE CTMs COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO	13
1.5. NANOPARTÍCULAS DE OURO COMO POTENCIAIS MARCADORES PARA RASTREAMENTO IN VIVO DE CTMs POR TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA.....	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CTMs.....	21
3.2. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	21
3.2.1. Preparo e caracterização de nanopartículas Fe-DMSA	22
3.2.2. Preparo e caracterização de nanopartículas Au-DMSA.....	23
3.3. TESTES IN VITRO	23
3.3.1. Análise da toxicidade in vitro das nanopartículas	23
3.3.2. Quantificação e visualização de ferro/ouro intracelular	26
3.3.3. Análise dos efeitos das nanopartículas sobre a fisiologia das pdCTMs	29
3.4. TESTES IN VIVO	34
3.4.1. Animais	34
3.4.2. Indução de fibrose pulmonar com bleomicina	35
3.4.3. Verificação da migração de pdCTMs em resposta à fibrose pulmonar	35
3.4.4. Análise dos pulmões murinos em microscopia de luz.....	36
3.4.5. Microtomografia computadorizada	37

4. RESULTADOS.....	39
4.1 TESTES IN VITRO	40
4.1.1 Análise da toxicidade in vitro das nanopartículas	40
4.1.2 Quantificação e visualização de ferro/ouro intracelular.....	46
4.1.3 Análise dos efeitos das nanopartículas sobre a fisiologia das pdCTMs	55
4.2 TESTES IN VIVO	63
4.2.1. Indução de fibrose pulmonar com bleomicina	63
4.2.2. Verificação da migração de pdCTMs em resposta à fibrose pulmonar	66
4.2.3. Análises em microtomografia computadorizada.....	70
5. DISCUSSÃO	77
5.1 ANÁLISE DA TOXICIDADE IN VITRO DAS NANOPARTÍCULAS	77
5.1.1. Nanopartículas Fe-DMSA	77
5.1.2. Nanopartículas Au-DMSA	79
5.2 EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS SOBRE A FISIOLOGIA DAS CTMs.....	83
5.2.1. Indução de diferenciação	84
5.2.2. Verificação da proliferação de CTMs marcadas	86
5.3 ENSAIOS IN VIVO	88
5.4 PERSPECTIVAS	90
6. CONCLUSÕES	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs)

Células-tronco, por definição, são células indiferenciadas capazes de se autorrenovar e de se transformar (em um processo conhecido por diferenciação celular) em células especializadas^{1,2}. Diante disso, as funções fisiológicas das células-tronco no organismo são: promover o crescimento e maturação do organismo; e atuar como “reservatórios”, ou seja, repor as perdas celulares naturais ou causadas por injúrias, mantendo, até certo ponto, a homeostase normal dos tecidos².

A partir do estudo da biologia das células-tronco, surgiu uma hipótese conhecida por “Populações hierárquicas”: as células-tronco estão funcionalmente organizadas por meio de um sistema, o qual se origina a partir de uma célula indiferenciada e com grande capacidade de diferenciação; ao mesmo tempo em que sua progênie torna-se cada vez mais especializada e apta a desempenhar funções específicas, esta perde gradativamente a habilidade de proliferar e transformar em tipos celulares diferentes².

Diante disso, os vários tipos de células-tronco são classificados de acordo com seu potencial de autorrenovação/diferenciação em: totipotentes, pluripotentes e multipotentes^{1,3,4}. As células totipotentes (zigoto e as células da mórula) podem se diferenciar em todas as células embrionárias e extraembrionárias. As células pluripotentes, ou embrionárias, são derivadas a partir da massa interna do blastocisto sendo capazes de originar todos os tipos celulares do embrião, mas não originam um novo indivíduo, por não poderem se diferenciar em todas as células extraembrionárias. Por fim, as multipotentes, ou adultas, geram células dos tecidos do qual são provenientes, portanto, um número limitado de células especializadas; são responsáveis também pela constante renovação celular que ocorre em nossos órgãos.

Devido a tais propriedades, as potencialidades das células-tronco são enormes e seu uso potencial tem gerado uma série de expectativas para tratamento de doenças antes incuráveis, por exemplo. Pode-se esperar um novo tipo de Medicina a partir da evolução das pesquisas atuais⁵. Entretanto, ao mesmo tempo em que as células-tronco ganharam destaque devido aos seus benefícios, o uso de alguns tipos ainda causa muita polêmica devido à forma de como elas são isoladas. Este é o caso das chamadas células-tronco embrionárias, as quais são capazes de se transformar em qualquer célula do

corpo, mas que são obtidas a partir da “massa interna” de blastocistos humanos, destruídos durante o procedimento^{1,6}.

Ao mesmo tempo em que alguns grupos de pesquisa do mundo todo buscam obter um tipo celular com potencial próximo ao das células-tronco embrionárias, outros vislumbram a possibilidade de desenvolver novas alternativas terapêuticas com as chamadas células-tronco adultas (CTAd), ou residentes⁷. As CTAd em geral podem ser pluripotentes, multipotentes, oligopotentes ou unipotentes. Estas têm sido isoladas de diversas partes do corpo, sendo possível, em alguns casos, expandir seu número *in vitro*, permitindo que sejam estudadas. Ao longo dos anos, diversos centros de pesquisa têm testado o potencial terapêutico das diferentes células-tronco adultas, tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos com pacientes^{1,7}.

Durante a década de 70, Friedestein *et al* isolaram uma linhagem de células precursoras multipotentes, aderentes e fusiformes, a partir de amostras de medula óssea⁸⁻¹¹. Experimentos seguintes, realizados *in vitro*, demonstraram uma capacidade formadora de colônias associada a estas, as quais foram então definidas como “unidades formadoras de colônias de fibroblastos”. Além disso, estas células tinham o potencial de se diferenciar em condrócitos, adipócitos e osteoblastos na presença de indutores específicos. Foi sugerido que estas células formariam uma camada estromal que é essencial para a manutenção da hematopoese; no entanto, foi a capacidade de diferenciação que atraiu maior interesse¹¹.

Anos mais tarde, vários grupos também isolaram tais células; fato que resultou em uma variação da nomenclatura utilizada na literatura para referir-se a estas: “células estromais multipotentes”, “células-tronco não hematopoiéticas”, “células progenitoras estromais”, entre outros¹². A fim de padronizar uma nomenclatura para estas células, a Sociedade Internacional de Terapia Celular então as definiu como células-tronco mesenquimais (CTMs), e estabeleceu que elas deveriam satisfazer os seguintes critérios mínimos: 1) serem aderentes ao plástico quando mantidas em cultura; 2) expressar um conjunto de antígenos de superfície celular, tais como CD13 (Gp150), CD29 (1 integrin), CD44 (hyaluronate receptor), CD49e (5 integrin), CD54 (ICAM-1), CD73 (SH3, SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (endoglina) e HLA classe 1, bem como a não expressão (ou expressão em baixos níveis) de marcadores de monócitos, macrófagos, células B e de células hematopoiéticas e endoteliais como CD14 (LSP-R), CD31 (endotelial related antigen), CD34 (Gp105-120), CD45 (LCA) e CD133 (AC133) e HLA-DR (G46-6); e 3)

serem capazes de diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* na presença de indutores¹³. Outros marcadores de superfície observados nas CTMs são o STRO-1 e o CD146, fato que sustenta a hipótese de que as CTMs tenham origem perivascular e fornecem um microambiente que permite que outras células mantenham-se num estado indiferenciado¹⁴⁻¹⁶.

Nos anos seguintes, outras propriedades das CTMs foram descritas, tornando-as cada vez mais atraentes para os pesquisadores. Primeiramente, estas células são bastante apreciadas pelo fácil isolamento, pela rapidez de proliferação e pela multipotencialidade. Em segundo lugar, as CTMs são descritas como positivas para MHC I, e negativas para as moléculas co-estimulatórias CD40, CD80 e CD86, sendo consideradas portanto não-imunogênicas, ou seja, a implantação em um hospedeiro pode não desencadear uma resposta imunossupressora¹⁷.

Entretanto, cabe ressaltar que há certa dificuldade de se obter células de medula óssea originadas de pacientes saudáveis. Além disso, como o procedimento necessário para extrair CTMs humanas a partir da medula óssea é a aspiração, as desvantagens associadas a esta técnica devem ser levadas em consideração: desconforto, dor e/ou estresse podem ser provocados no paciente durante a coleta do tecido; além do risco de provocar infecções no local. Por causa destas e outras complicações, buscou-se e descobriram-se novas fontes de CTMs: tecido adiposo, cordão umbilical, âmnio, placenta e tecidos orais. No entanto, parecem existir diferenças entre os fenótipos, assim como a qualidade e quantidade das células coletadas em diferentes sítios¹⁸; assim, a medula óssea continua sendo o padrão de referência de CTMs para estudos básicos e clínicos.

Entre as fontes mencionadas acima, os tecidos orais apresentam CTMs em relativa abundância. Isso resultou, a partir dos anos 2000, no isolamento de várias linhagens de células-tronco: células precursoras do folículo dental, células-tronco da polpa dental, células-tronco de ligamentos periodontais, células progenitoras de ligamentos periodontais, células-tronco da papila apical e células-tronco de dentes decíduos¹⁹. A origem desta riqueza de células baseia-se no fato de que células-tronco contribuem para a formação da papila e do folículo dentais, dentina, polpa, cemento, ligamentos periodontais e gengiva²⁰⁻²⁶, tecidos estes que podem ser obtidos simplesmente por meio da extração de um dente. Estas linhagens de células-tronco apresentam marcadores típicos dos tecidos ósseo, cartilaginoso e nervoso^{26,27}.

Além da facilidade de obtenção, as CTMs provenientes de tecidos orais têm apresentado um potencial promissor para a medicina regenerativa. Graças à sua função biológica de formação de tecidos mineralizados durante o desenvolvimento dental, as CTMs dentais apresentam uma excelente atividade osteogênica, tornando-as excelentes fontes para a fabricação de tecidos ósseos em 3D²⁶. Além disso, foi provado que as CTMs orais podem regenerar lesões no sistema nervoso, devido à sua capacidade de se diferenciar em células neuronais²⁷. Assim, estas células um dia poderão ser utilizadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Em resumo, as características das CTMs as tornam candidatas ideais para o uso em terapias celulares: elas podem ser isoladas a partir de vários tecidos; são facilmente cultiváveis e possuem um grande potencial de diferenciação. Em termos de aplicações clínicas, as CTMs tem sido testadas em quatro áreas principais: regeneração tecidual; agentes para terapia gênica; melhora da enxertia de células-tronco hematopoiéticas e tratamento de doenças imunes^{5,11,28,29}.

1.1.1. Propriedades migratórias e imunomodulatórias das CTMs

Sabe-se que o uso de células-tronco em geral para o reparo tecidual requer que estas se enxertem facilmente no órgão alvo. Diante disso, tem sido descrito que as CTMs são capazes de migrar em resposta a várias quimiocinas, tendendo a se deslocar e a se estabelecer em locais injuriados, onde auxiliam na recuperação funcional, processo conhecido como “homing” (migração seguido de enxertia). A capacidade migratória depende de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator derivado de células estromais (SDF-1) e fator de célula-tronco (SCF), que estão expressos em grande quantidade em tecidos lesados em geral³⁰⁻³³.

Cabe destacar ainda que os mecanismos de ação das CTMs baseiam-se em: 1) fusão com as células do tecido lesionado; 2) liberação de exossomos, vesículas que contém microRNAs de interferência; 3) transdiferenciação; e 4) liberação de fatores parácrinos/endócrinos que, sobretudo, recrutam células progenitoras do tecido injuriado para sua reestruturação³⁴. Ou seja, além do seu potencial de reparo tecidual, as CTMs possuem atividade anti-inflamatória. O efeito imunomodulatório destas tem sido demonstrado recentemente a partir da observação que CTMs oriundas da medula óssea são capazes de suprimir a proliferação de linfócitos T^{11,35,36}. Atualmente, sabe-se que

este efeito está relacionado à redução da produção de fator de necrose tumoral (TNF)- α e de interferon (INF)- γ e ao estímulo de interleucina (IL)-10 provocados pelas CTMs; o que pode influenciar outras células da imunidade inata e da adaptativa. A maturação de células dendríticas a partir de monócitos, células do cordão umbilical e progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ é inibida, assim como a proliferação e atividade das células Natural Killer (em conjunto com a prostaglandina E2); e a proliferação e diferenciação dos linfócitos B^{11,36,37}.

Na última década, esta propriedade imunomodulatória das CTMs atraiu o interesse de pesquisadores, resultando em muitos ensaios experimentais e estudos clínicos que têm demonstrado o efeito terapêutico/adjuvante destas células-tronco para o tratamento de diversas condições clínicas, injúrias e doenças autoimunes, por exemplo: doença do enxerto versus hospedeiro; artrite reumatoide; doença de Crohn; esclerose múltipla; diabetes tipo 1; fibrose pulmonar; entre outros^{31,37}.

1.2. CTMs E FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA

O pulmão é um órgão complexo cuja função crítica é a promoção das trocas gasosas. Dessa forma, ele é organizado de modo a formar dois sistemas interdependentes tubulares: um que carrega sangue e outro que carrega ar, os quais precisam estar integralmente ligados. Neste contexto, tem destaque os alvéolos, estruturas delicadas que são vulneráveis a uma variedade de fatores³⁸.

Alguns tipos de doenças reumáticas (como a esclerodermia e a artrite reumatoide), o uso de certos medicamentos e a exposição a agentes químicos, ao mofo e ao fumo provocam pequenas lesões nos alvéolos. Um quadro clínico que surge como consequência de sucessivas lesões é a Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI): numa tentativa de reparar estes danos, ocorre a proliferação de fibroblastos, miofibroblastos e pneumócitos do tipo II; deposição de matriz extracelular rica em colágeno e inflamação crônica. Em outras palavras, ocorre uma reparação anormal das pequenas injúrias resultando na substituição de tecido pulmonar normal por cicatrizes fibróticas, as quais diminuem a capacidade do pulmão em transferir gás para o sangue, levando conseqüentemente à perda da função pulmonar^{38,39}.

A FPI é a mais comum e também a mais severa das chamadas pneumonias intersticiais, que, ao contrário das outras inflamações e doenças fibróticas pulmonares,

não responde ao tratamento com esteroides e outros potentes agentes imunossupressivos. Dessa forma, o único tratamento com chances reais de cura no momento é o transplante de pulmão; caso contrário, a sobrevida do paciente dura em média 3 a 4 anos. Esta falta de tratamentos eficazes para a FPI pode ser uma consequência da compreensão limitada da sua patogenia, apesar do grande número de estudos e teorias propostas^{34,38,39}.

Para melhor compreender a evolução das doenças fibróticas pulmonares, foram desenvolvidos modelos animais que permitiram a identificação de células-chave, mediadores e processos metabólicos provavelmente envolvidos nestas patologias. Existem várias técnicas que levam a indução de fibrose pulmonar em murinos, cada qual com suas vantagens e desvantagens: administração de isotiocianato de fluoresceína (FITC); exposição à irradiação; instilação de sílica; introdução permanente de genes de modo a criar animais transgênicos; administração de bleomicina, entre outros⁴⁰.

O modelo murinho de fibrose pulmonar induzido por bleomicina é o melhor caracterizado e mais utilizado atualmente⁴⁰. Este modelo tem sido utilizado em estudos sobre o potencial terapêutico de CTMs para fibrose pulmonar, os quais têm demonstrado que estas células são capazes de migrar em direção aos locais injuriados e atenuar a evolução da doença^{34,39,41-46} por meio de seus mecanismos parácrinos, anti-inflamatórios e imunomodulatórios.

Estes efeitos são descritos em detalhes por vários trabalhos na literatura. Por exemplo, Rojas *et al* verificaram *in vitro* que, células oriundas de tecidos pulmonares injuriados secretam fatores que promovem a migração de CTMs da medula óssea em direção ao órgão lesionado; sugerindo-se assim que as células-tronco desempenham um efeito protetor e reparador³⁰. Ortiz *et al*, verificaram que além do efeito protetor, as CTMs eram capazes de impedir a deposição de colágeno e de assumir um fenótipo semelhante ao das células epiteliais pulmonares⁴² e, anos mais tarde, 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 respiratório³⁴.

Tem sido reportada também a diferenciação das CTMs em células alveolares epiteliais (também conhecidas como pneumócitos) do tipo 1 (CAE1) e tipo 2 (CAE2) *in vivo*^{30,47}. Estudos em modelos de fibrose pulmonar induzida por bleomicina demonstraram que, após a administração intratraqueal e intravenosa de CTMs, uma

pequena porção de células transplantadas migraram para o pulmão afetado e diferenciaram-se em CAE1 e CAE2, seguido por uma melhora da fibrose pulmonar^{30,47}. CTMs humanas são capazes de diferenciar-se *in vitro* em células similares a CAE2 que expressam a proteína surfactante C, quando cultivadas com células mesenquimais pulmonares fetais⁴⁸. Os resultados desses trabalhos comprovam que CTMs são candidatas promissoras para terapias regenerativas para FPI, entretanto há ainda preocupações remanescentes quanto aos possíveis efeitos pró-fibróticos das CTMs, que podem agravar a condição patológica de fibroses pulmonares crônicas⁴⁴.

Apesar dos vários estudos na área, não existe um consenso sobre a quantidade de CTMs que chegam e permanecem no pulmão após sua administração; seja ela via intravenosa, intra-arterial ou intratraqueal (figura 1A), as mais utilizadas⁴⁹.

Este fato gera muitas dúvidas a respeito da melhor via de administração de CTMs para tratamentos em pneumologia. Além disso, não há nenhum relato na literatura sobre a eficácia da administração intranasal de CTMs (figura 1B), uma via que em pneumologia seria a mais direta e com pouca chance de causar complicações; porém feita anteriormente por alguns grupos de pesquisa em modelos de lesões e doenças do sistema nervoso central⁵⁰.

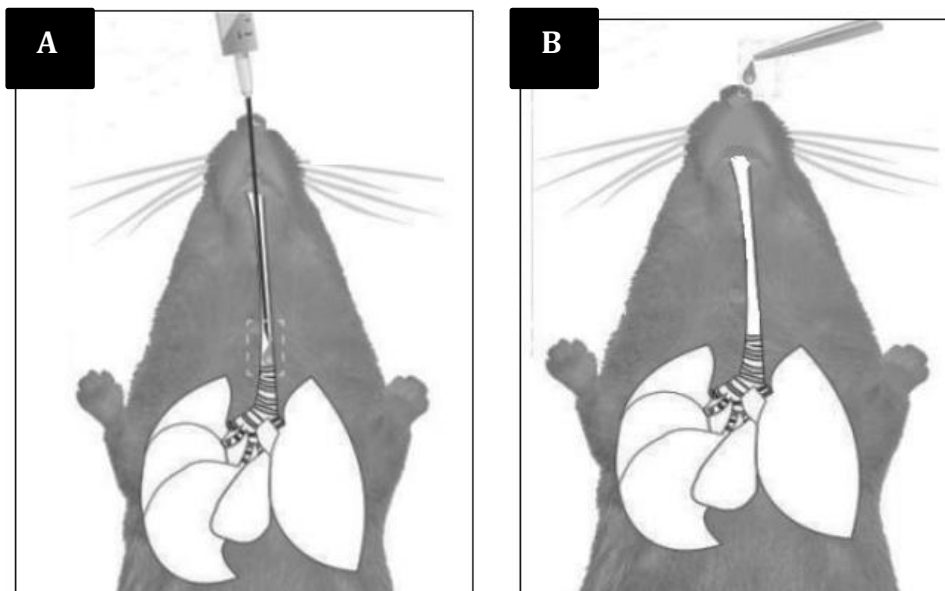


Figura 1. (A) Representação de técnica não-cirúrgica de instilação intratraqueal em camundongos. Cateteres intravenosos atuam como sondas que permitem a administração de líquidos em região próxima à traquéia. Adaptado de Munder *et al* (2011)⁵¹. (B) Representação de instilação intranasal em camundongos. Adaptado de Munder *et al* (2011)⁵¹.

1.3. MARCAÇÃO E RASTREAMENTO *IN VIVO* DE CTMs

Um dos obstáculos enfrentados na medicina regenerativa é a falta de dados consistentes e imparciais sobre distribuição e sobrevivência de células-tronco *in vivo*, o que leva a uma frequente dificuldade de interpretação dos resultados pós-terapêuticos. Diante disso, para que o tratamento da FPI (e de várias outras doenças) por meio de terapias baseadas em células-tronco tenha êxito, é imprescindível que se saiba: 1) a melhor rota de administração das células para o sítio da lesão para uma dada condição; 2) como estas células se distribuem depois que são implantadas; 3) e o quão efetivamente elas migram em direção aos sítios patologicamente afetados⁵².

Os métodos que eram comumente utilizados para responder tais questões eram a análise post-mortem e biópsias seguidas por técnicas histopatológicas; sendo a última extremamente invasiva e pouco eficiente, por não oferecer informações sobre o comportamento das células ao longo do tempo⁵².

Uma nova abordagem – marcação e visualização de células-tronco *in vivo* – surgiu e logo se tornou em um campo de pesquisa bastante ativo. Afinal é uma técnica não invasiva, que permite a avaliação da migração e função das células depois de inseridas em um organismo, aprimorando os tratamentos. Uma visualização *in vivo* bem sucedida requer que um agente contrastante seja inserido ou associado às CTMs e exerça um efeito que possa ser detectado por um sistema de aquisição de imagens. Os agentes de contraste mais atrativos seriam componentes presentes naturalmente nas células, no entanto, não foi identificado até então algum que seja detectável. Diante disso, são utilizados agentes contrastantes exógenos, cujos efeitos são detectáveis e controláveis⁵³.

1.3.1. Técnicas para rastreamento *in vivo* de células-tronco

As técnicas comumente utilizadas para o rastreamento *in vivo* de células-tronco, marcadas com traçadores, são: análise em tomografia computadorizada, com emissão de raios X (TC); análise por bioluminescência e/ou fluorescência; ultrassom; tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT); tomografia por emissão de pósitrons; ressonância magnética (RM); ou uma combinação destes métodos. A migração de CTMs tem sido analisada por RM, cintilografia e por fluorescência⁵³.

A RM surgiu no cenário clínico como uma ferramenta essencial para o diagnóstico de distúrbios no sistema nervoso central, sendo utilizado para a visualização de órgãos de outros sistemas, anos mais tarde. O princípio físico desta técnica envolve os núcleos positivamente carregados de átomos de hidrogênio, constituídos por um único próton, cujos spins giram em uma direção contrária à do campo magnético; o retorno destes à direção original gera os sinais que são detectados pelo equipamento⁵⁴. Tais átomos de hidrogênio são abundantes em tecidos que contêm água, proteínas, lipídios e outras macromoléculas. Assim, a RM é um exame que fornece imagens com grande resolução e clareza de qualquer parte do interior do corpo humano. Devido a estas particularidades, esta técnica é uma das mais utilizadas para o rastreamento *in vivo* de células-tronco marcadas e o uso do óxido de ferro como agente contrastante permite determinar a posição exata destas após sua inserção. A interpretação de imagens, no entanto, é complexa⁵⁴⁻⁵⁶.

A microtomografia computadorizada de alta resolução (MTC) tem proporcionado uma abordagem prática para a determinação da estrutura tridimensional de uma amostra radiolúcida, cuja resolução parte da escala micrométrica e se estende até a submicrométrica⁵⁷⁻⁵⁹. Isso se dá pela emissão de raios-X de modo a adquirir imagens bidimensionais sequencialmente, ao mesmo tempo em que a fonte é girada. Em seguida, estas imagens submetidas à transformação de Fourier⁶⁰. A metodologia já é considerada promissora para aplicações nos órgãos do sistema nervoso central, nos ossos e dentes e nos pulmões⁵⁹⁻⁶¹.

Os raios-X emitidos pelo equipamento interagem com os elétrons das amostras resultando em: interferência de fase, emissão de fluorescência, ou absorção dos elétrons. Dessa forma, tanto estruturas pobres em elétrons quanto as elétron-densas podem ser visualizadas na imagem⁵⁹.

Sabe-se que os tecidos moles biológicos são constituídos por elementos de números atômicos pequenos – hidrogênio, carbono, oxigênio e nitrogênio - os quais produzem pouco contraste em uma imagem de MTC. Para visualizá-los efetivamente, é preciso utilizar soluções contrastantes que contêm elementos de alto número atômico (Z entre 67 e 83), os quais absorvem os raios-X eficientemente; entre estes se destacam o ósmio, a platina, o mercúrio, o tungstênio, o chumbo e o ouro⁵⁹.

É possível observar também, da mesma forma, microestruturas presentes nestes tecidos moles marcando especificamente seus constituintes com elementos de alto

número atômico. A partir dessa metodologia, pode-se acompanhar por MTC eventos como o crescimento tumoral - com uma acurácia semelhante à da RM⁶²⁻, além de estruturas e órgãos específicos⁶²⁻⁶⁷.

Mas, diferentemente da RM, os protocolos para visualização de células-tronco em geral por MTC ainda estão sendo estabelecidos. A marcação e visualização de CTMs por MTC seria uma nova abordagem prática a qual beneficiaria várias pessoas, afinal, a RM é mais cara e menos disponível na rede pública de saúde em comparação a TC⁶⁸. Além disso, vale destacar que já foram relatadas a inserção de prata⁶⁹, gadolínio⁷⁰ e de ouro⁷¹ em CTMs, o que pode representar um primeiro passo em direção à consolidação dessa metodologia no cenário clínico.

1.3.2. As nanopartículas como marcadores para visualização de CTMs *in vivo*

Frangioni & Hajjar (2004) sugerem quais seriam as características de um método ideal para rastreamento *in vivo* de células-tronco em geral: 1) os marcadores a serem usados devem ser biocompatíveis e não serem tóxicos, seja ao nível celular, seja ao nível tecidual; 2) os marcadores não podem provocar perturbações ou alterações genéticas nas células-tronco; 3) o agente de contraste deve permitir a visualização de uma única célula em qualquer parte do corpo do receptor; 4) A divisão das células inseridas não pode ocasionar a “diluição” do marcador; 5) Não deve haver transferência do marcador a partir das células-tronco para outras de linhagens diferentes; 6) o marcador deve permitir a visualização do material mesmo depois de meses ou anos; 7) o método deve possibilitar a quantificação das células em um dado sítio⁵³.

Tradicionalmente são utilizados em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* moléculas fluorescentes, isótopos radioativos, imunoenaios e métodos colorimétricos para melhorar a compreensão de processos fisiológicos e fisiopatológicos. Muitos destes métodos envolvem a conjugação de moléculas a superfície das células para rastreamento em tempo real ou a incubação de tais moléculas após processamento dos tecidos.

Como mencionado anteriormente, o rastreamento *in vivo* de CTMs requer o uso de agentes de contraste, que permitem a visualização em longo prazo das mesmas e que não sejam tóxicos. Os radioisótopos eram comumente utilizados para este fim, no entanto, por apresentar um tempo de meia vida curto, sua aplicação limita-se apenas a

poucos procedimentos^{72,73}. Outros marcadores tradicionalmente usados não satisfazem os sete critérios listados acima, cada um apresentando suas vantagens e desvantagens⁵³.

Diante do avanço da nanotecnologia, na década de 90, surgiram novos materiais em escala manométrica que possibilitaram melhorias nas terapias baseadas com células-tronco em geral. Dentre estes materiais, pode-se citar nanofibras que formam pequenas estruturas que suportam a regeneração tecidual; carreadores de DNA e proteínas que auxiliam a indução da diferenciação celular; nanopartículas metálicas e quantum dots, cujas propriedades químicas, ópticas e magnéticas permitem a visualização das células que os incorporam⁷⁴. Estes últimos logo se tornaram novas opções de marcadores para o rastreamento de células-tronco em geral; afinal, além de biocompatíveis, estas nanopartículas permitem o monitoramento dos padrões de migração e do impacto destas na regeneração em longo prazo^{72,74,75}.

No entanto, alguns potenciais impactos das nanopartículas metálicas sobre as funções *in vivo* ou *in vitro* das CTMs são desconhecidos. Sabe-se que metais de transição, como o ferro e o cobre, quando acumulados em excesso no citoplasma celular de uma forma não complexada (e não em uma proteína ou outro complexo de metal de proteção) atuam como catalisadores de reações de oxidação de biomoléculas, logo aumentam a velocidade da geração de radicais livres, aumentando significativamente o nível de estresse oxidativo na célula^{76,77}. Estes radicais livres contribuem para modificar aminoácidos (de modo irreversível), degradar ou agregar proteínas, oxidar bases nucleotídicas e promover a peroxidação lipídica⁷⁷. Assim, avaliações nanotoxicológicas precisas e preditivas tornam-se cada vez mais importantes^{78,79}. Algumas reações entre células e nanomateriais comumente exploradas são: captura celular e mecanismo de degradação; efeitos na sinalização celular; perturbações de membrana; influencia na cadeia transportadora de elétrons; produção de citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio; alterações na regulação gênica; necrose e apoptose; alterações na capacidade de diferenciação. Tais efeitos podem comprometer a atividade das CTMs, por exemplo, *in vivo*.

Existem várias técnicas que permitem caracterizar a interiorização (*uptake*) de nanomateriais pelas células e avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo*. A Microscopia Eletrônica de Transmissão e a Espectroscopia de Fluorescência, por exemplo, possibilitam a visualização da captação de alguns tipos de nanomateriais. A viabilidade celular (preservação de estruturas/propriedades celulares) pode ser avaliada *in vitro*

por ensaios como o MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol- 2)-2,5-difeniltetrazólio), Azul-Tripan e coloração com rodamina⁷⁸⁻⁸⁰. Entretanto, deve-se ter cautela na escolha dos métodos a serem utilizados, pois algumas propriedades destes nanopartículas - absorvância e fluorescência - podem causar interferências^{79,80}.

Por fim, é importante destacar que a diluição de nanopartículas em meio de cultivo pode afetar sua estabilidade e favorecer sua agregação^{79,81}. Este evento pode influenciar a via de sinalização da endocitose e as trajetórias percorridas pelas nanopartículas no interior das células, favorecendo ou impedindo a ligação a alvos intracelulares.

1.4. MARCAÇÃO DE CTMs COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO.

Os materiais comumente utilizados para a produção de nanopartículas magnéticas são bastante tóxicos para aplicações *in vivo*. Mas, dentre estes materiais, os óxidos de ferro - magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) - são tidos como componentes mais seguros. Além disso, por possuírem ferro em um estado oxidado (Fe^{+3}), as nanopartículas magnéticas de maghemita provocam menos danos ao organismo em comparação às de magnetita⁸².

Para minimizar a agregação e favorecer a solubilidade em meio aquoso e em pH fisiológico, as nanopartículas de óxido de ferro (uma estrutura mista, que geralmente apresenta os íons Fe^{+2} e Fe^{+3}), são revestidas por substâncias biocompatíveis: dextran, carboxidextran, polietileno glicol, poliestireno, sílica, entre outros^{52,81}. Vale lembrar que a agregação, conforme mencionado no item anterior, pode ser prejudicial às células receptoras.

Considera-se que partículas magnéticas de diâmetro menor que 30 nm são consideradas superparamagnéticas: uma propriedade bastante apreciada para aplicações biológicas, que consiste na magnetização do material apenas na presença de um campo magnético externo; após a retirada deste campo este não permanece magnetizado. Diante disso, nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (Fe-NPs) se tornaram uns dos agentes contrastantes mais utilizados para marcação e rastreamento de células-tronco em geral, devido ao forte sinal que geram em imagens de ressonância magnética. Estes sinais permitem a visualização das células a níveis microscópicos e fornecem informações específicas sobre sua distribuição *in vivo*. No

entanto, é importante ter cautela ao interpretar a migração de células marcadas em longo prazo, pois os sinais emitidos persistem apesar da morte de células transplantadas e ainda, estas células marcadas podem ser fagocitadas por outras^{82,83}.

Além de visualização e rastreamento *in vivo*, as características magnéticas das nanopartículas de óxido de ferro podem ser aplicadas para direcionar as células marcadas após sua implantação: por meio da utilização de imãs externos posicionados sobre o órgão-alvo, é possível aprimorar o *homing* destas células nestes locais de interesse⁸⁴⁻⁸⁶.

Como mencionado anteriormente, a aprovação para o rastreamento *in vivo* de CTMs marcadas depende de se as nanopartículas utilizadas não são tóxicas a estas ou provocam qualquer efeito adverso – se há uma marcação eficiente sem alterações no fenótipo. Diante disso, a inserção de Fe-NPs em CTMs tem sido estudada por vários grupos ao longo dos anos; embora não haja algum trabalho completo, estes grupos têm sugerido que algumas nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro são facilmente internalizadas, biocompatíveis e não interferem na proliferação e diferenciação de CTMs⁸⁷⁻⁹¹.

Além da eficiência de marcação, é fácil visualizar e determinar a posição de células-tronco marcadas após sua implantação em um animal por RM. Vale destacar o trabalho de Jasmin *et al* (2011), no qual foi feita uma correlação entre a concentração de células marcadas e a intensidade do sinal detectado pelo aparelho de ressonância magnética⁸⁷. O sucesso dessa técnica é descrito por Berman *et al* (2011) que sintetizam as principais contribuições desta em estudos clínicos voltados para o tratamento de doenças cardiovasculares e lesões no sistema nervoso⁵². Mas não há relatos do uso dessa técnica no tratamento de doenças do sistema respiratório, como a fibrose pulmonar.

Entretanto, é importante mencionar que em muitos destes trabalhos foram utilizadas duas Fe-NPs disponíveis comercialmente - *Feridex/Endorem* (BerlexPharmaceuticals, US/Guerbet France); e *Ferucarbotran/Resovist®* (Bayer Schering Pharma AG). A primeira é uma Fe-NP revestida por dextrano, cujo tamanho varia entre 50-180 nm; enquanto o *Ferucarbotran* é uma Fe-NP menor (cujo diâmetro varia entre 45-60 nm) revestida por carboxidextrano. Kostura *et al* (2004) reportaram um bloqueio da atividade condrogênica associada à marcação de CTMs com *Feridex*, sem afetar sua viabilidade e proliferação⁹². Além disso, há relatos de que o *Ferucarbotran* exerceu um efeito inibidor sobre o mecanismo de sinalização promotor da diferenciação

osteogênica⁹³. Estes dois fatos reforçam a importância da realização de ensaios de biocompatibilidade com CTMs antes dos experimentos *in vivo*.

Uma Fe-NP comumente utilizada em nosso grupo de pesquisa é revestida por ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) (figura 2), uma molécula que oferece grandes vantagens devido aos seus grupamentos químicos disponíveis (especialmente os tióis) que permitem a formação de complexos fortes com a superfície das nanopartículas e a imobilização de outras moléculas na superfície, como proteínas e fármacos^{94,95}. Poucos trabalhos relatam a marcação de CTMs com nanopartículas magnéticas funcionalizadas por DMSA; recentemente, Wang *et al* (2011) relataram que estas nanopartículas são facilmente incorporadas pelas CTMs e o processo de marcação não provoca morte celular/apoptose, não tem efeito sobre a capacidade de crescimento das células e não há redução da atividade magnética com o passar do tempo⁹⁶.

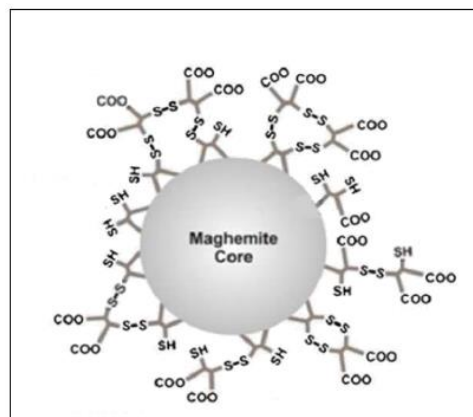


Figura 2. Representação esquemática de uma nanopartícula de maghemita recoberta com DMSA (Fe-DMSA). Fonte: Vallois *et al* (2009)⁹⁵.

1.5. NANOPARTÍCULAS DE OURO COMO POTENCIAIS MARCADORES PARA RASTREAMENTO *IN VIVO* DE CTMs POR TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA.

Sabe-se que soluções coloidais de partículas de ouro têm sido utilizadas, desde o período medieval, para colorir vitrais e outras peças de vidro. Mas foi somente na última década que as propriedades ópticas destes materiais têm sido exploradas em diferentes áreas de investigação relacionadas às Ciências Biológicas: como agente de contraste para células, tecidos e tumores; como veículo de entrega de genes e fármacos a alvos celulares; como promotores de tratamentos hipertérmicos; e como sensores/sondas⁹⁷.

As propriedades ópticas exclusivas do ouro em escala nanométrica baseiam-se na ocorrência de um fenômeno conhecido como plásmons de superfície: ao incidir luz nas nanopartículas de ouro (Au-NPs), os elétrons livres na superfície do metal são excitados, de modo a provocar uma oscilação coletiva destes, gerando uma onda – o plásmon de superfície. Como consequência desta oscilação, observa-se na nanopartícula a extinção da luz incidente – uma soma do espalhamento e da absorção desta. É esta extinção da luz que torna as Au-NPs tão atraentes para as aplicações biológicas mencionadas acima⁹⁷.

Diante do fato de que as Au-NPs absorvem fortemente a luz visível e a espalham, elas têm sido tradicionalmente utilizadas para marcação, podendo ser detectadas por uma grande variedade de técnicas: 1) Au-NPs de 20 nm podem ser diretamente visualizadas por microscopia ótica em contraste de fase ou de interferência; 2) a microscopia de campo escuro detecta a luz espalhada, sendo que sua cor varia de acordo com o tamanho e forma das Au-NPs; 3) a absorção de energia luminosa provoca o aquecimento das Au-NPs e a transferência de calor pode ser observada através de imagens fototérmicas (*photothermal*) e fotoacústicas (*photoacoustic*)^{98,99}; 4) pequenas Au-NPs emitem fluorescência, podendo então ser detectadas por microscopia de fluorescência. Todos os métodos mencionados são sensíveis o suficiente para permitir a detecção ao nível de uma única partícula⁹⁷. Além disso, devido ao elevado peso atômico, Au-NPs fornecem alto contraste em imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET)¹⁰⁰.

Por fim, estes materiais dispersam raios-X eficientemente, proporcionando assim contraste em radiografia e em tomografia¹⁰¹⁻¹⁰³. Conforme mencionado na seção 2.3.1, a TC proporciona melhor resolução espacial em comparação a outras modalidades de imagem. Esta vantagem torna-se atrativa quando esta técnica é utilizada para diagnosticar doenças no tórax, tais como o câncer de pulmão. Mas, devido à dificuldade de encontrar um agente de contraste adequado, a utilização de TC tem sido limitada¹⁰³.

Tendo em vista que é possível conjugar grupos funcionais, anticorpos ou biomarcadores específicos à superfície de Au-NPs, elas tem sido cada vez mais utilizadas para diagnóstico, visualização e tratamento de tumores, oferecendo ainda mais vantagens que a iodina e outros contrastes tradicionalmente utilizados em TC^{63,67,68,103-105}. Importante mencionar o trabalho de Astolfo *et al* (2013)⁶⁸, em que células F98 (células de glioma murino) foram marcadas *in vitro* com Au-NPs e inoculadas em animais que possuíam tumores em estágios iniciais. A MTC foi utilizada então para

visualizar como as células marcadas interagem com o tumor, monitorando e estudando seus padrões de crescimento. Este e o relato de Menk *et al* (2011)¹⁰⁶, os quais também trabalharam com CTMs, são uns dos poucos trabalhos publicados até o presente momento que envolvem a marcação exógena de células com Au-NPs e subsequente visualização por MTC.

Portanto, as propriedades ópticas das Au-NPs, em associação à melhor resolução espacial e temporal proporcionada pela MTC¹⁰⁷, podem dar origem a uma nova metodologia para rastreamento *in vivo* de CTMs durante o tratamento da fibrose pulmonar, havendo relatos na literatura que demonstram que essa proposta pode ser viável.

Primeiramente, Ricles *et al* (2012) reportaram a incorporação bem sucedida de Au-NPs de vários tamanhos e agentes de revestimento (citrato de sódio e poli-L-lisina) por CTMs, de modo a não causarem efeitos citotóxicos, não afetarem a viabilidade e a capacidade de diferenciação das células. No entanto, a retenção destes marcadores decai exponencialmente ao longo dos dias, devido à divisão celular⁷¹. Em segundo lugar, a visualização *in vivo* de CTMs marcadas com Au-NPs também já foi realizada, empregando-se a ultrassonografia e aquisição de imagens fotoacústicas/fototérmicas em modelos de infarto do miocárdio⁹⁸ ou após a implantação de células em músculos de roedores⁹⁹; trabalhos estes que avaliaram também a biocompatibilidade entre as Au-NPs e CTMs.

Por fim, o trabalho que mais se aproximou da proposta acima foi o de Menk *et al* (2011) os quais inseriram CTMs marcadas com Au-NPs via intravenosa e as localizaram em tumores cerebrais utilizando dois sistemas de MTC de contraste de fase (acoplados a uma fonte de radiação síncrotron)¹⁰⁶.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar se nanopartículas de ouro e de óxido de ferro revestidas por ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) podem ser utilizadas como traçadores de células-tronco mesenquimais de polpa dental (pdCTMs), de modo a não alterar a viabilidade das células e permitir o rastreamento *in vivo* destas por microtomografia computadorizada.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Objetivos dos ensaios *in vitro*

- ❖ Avaliar a toxicidade das nanopartículas de ferro e ouro funcionalizadas com DMSA, quando em contato com pdCTMs humanas;
- ❖ Verificar possíveis alterações morfológicas nas pdCTMs provocadas pelas nanopartículas interiorizadas;
- ❖ Avaliar a eficácia de marcação das pdCTMs, determinando a quantidade de nanopartículas interiorizadas pelas células;
- ❖ Identificar alterações de propriedades funcionais características das pdCTMs, como a capacidade de diferenciação e inibição de linfócitos T, após a marcação;

2.2.2. Objetivos dos ensaios *in vivo*

- ❖ Estabelecer um protocolo para indução de fibrose pulmonar em murinos por administração intratraqueal de bleomicina;
- ❖ Observar a migração das pdCTMs para tecidos pulmonares lesionados devido à ação da bleomicina;
- ❖ Avaliar a efetividade da inoculação de pdCTMs pela via intranasal para o tratamento da fibrose pulmonar, comparando seu efeito terapêutico com o de uma via comumente utilizada, a intravenosa;
- ❖ Verificar se as nanopartículas, interiorizadas pelas pdCTMs, emitem sinais detectáveis pelo microtomógrafo, possibilitando a visualização e o rastreamento *in vivo*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CTMs

As CTMs utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de tecidos pulparem sadios (pdCTMs) e doadas pela dentista Luciana Oliveira Pereira (Registro do projeto no CEP/Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília: 023/08). Estas células foram descongeladas e expandidas em meio de cultura Low Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-LG) (GIBCO), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), antibiótico-antimicótico (GIBCO – contendo 10000 UI/mL de penicilina, 10000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de Anfotericina B) e L-Glutamina (GIBCO - 10 µL/mL). As culturas de pdCTMs foram acondicionadas em estufa a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e 70% de umidade.

Foi determinado que, durante o cultivo ou os experimentos com as células-tronco, sua confluência não poderia ultrapassar os 80%. Além disso, as exposições às nanopartículas foram realizadas utilizando pdCTMs em terceira passagem, enquanto as análises de diferenciação, proliferação, morfologia, ultramorfologia e visualização *in vivo* (as etapas que representam as células após a inserção no animal) foram executadas com pdCTMs em quarta passagem.

3.2. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Os materiais utilizados para a marcação das pdCTMs foram: 1) fluido magnético contendo nanopartículas magnéticas de maghemita recobertas com DMSA (Fe-DMSA) e 2) uma dispersão em meio aquoso de nanopartículas de ouro revestidas por DMSA (Au-DMSA). Ambas foram produzidas e cedidas pela Prof^a. Dra. Emília Lima (Instituto de Química – Universidade Federal de Goiás).

A concentração de ferro presente na solução de Fe-DMSA é de 4,09 mg/mL e as partículas nesta apresentam um diâmetro hidrodinâmico médio estimado em 55,6 nm ± 0,4 e potencial zeta de -43 mV ± 0,7. Por outro lado, a concentração de ouro na solução de Au-DMSA é de 3 mg/mL, cujas partículas tem em média 48,8 nm ± 3,0 de diâmetro e -40,8 mV ± 3,7 de potencial zeta.

A fim de promover a marcação das pdCTMs, estes materiais foram diluídos em meio de cultivo. O Fe-DMSA foi diluído a 15, 30, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$ baseando-se concentrações utilizadas anteriormente no trabalho de Braz (2011)⁹⁴, a qual utilizou o mesmo material em macrófagos peritoneais. Já o Au-DMSA foi diluído a 52, 90 e 130 $\mu\text{g/mL}$, de acordo com o descrito por Menk *et al* (2011)¹⁰⁶, os quais usaram a primeira concentração em pdCTMs a fim de visualizá-las por tomografia computadorizada, e por Mironava *et al* (2010)¹⁰⁸, grupo que observou alterações em fibroblastos dermais após a marcação com nanopartículas de ouro.

3.2.1. Preparo e caracterização de nanopartículas Fe-DMSA

As nanopartículas de maghemita foram obtidas a partir da oxidação de precursores de magnetita, conforme descrito na literatura¹⁰⁹. Primeiramente, a síntese de nanopartículas de Fe_3O_4 foi feita por meio da mistura de soluções aquosas de cloreto férrico e ferroso (razão molar 2:1) com solução aquosa concentrada de amônia, sob agitação vigorosa. O precipitado preto resultante, constituído por magnetita, foi lavado várias vezes com água e recolhido com auxílio de um ímã. Em seguida, para oxidar a magnetita para maghemita, a amostra foi adicionada a uma solução contendo 0,16 Mol de ácido nítrico e 0,16 Mol de nitrato de ferro III ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) durante 2 horas a 96°C . O precipitado castanho obtido, constituído por maghemita, foi extensivamente lavado com solução de ácido clorídrico 1M e decantado com auxílio de um ímã. Por fim, a maghemita foi dispersa em água e dialisada contra água desmineralizada.

O ácido meso-2,3-dimercaptosuccinico (DMSA) foi adicionado então às nanopartículas de maghemita de acordo com protocolos descritos na literatura¹¹⁰. 5 mL da solução de estoque (0,3 Mol/L) de DMSA (Acros Chemicals) foi adicionada à 25 mL da dispersão de nanopartículas de maghemita em uma razão molar DMSA/Ferro de 11%. Esta mistura foi agitada durante 12 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a dispersão foi dialisada durante 12 horas contra água desmineralizada a fim de eliminar o DMSA livre. O pH foi ajustado para a 7,0-7,2 e grandes agregados presentes na dispersão foram removidos por centrifugação a 5000 RPM durante 10 minutos.

O teor total de ferro nas suspensões magnéticas foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica em um sistema Perkin-Elmer 5000 (Perkin-Elmer, Norwalk, EUA). A proporção $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ foi determinada pelo método

colorimétrico 1,10-fenantrolina. Dados de difração de raios-X (XRD) foram obtidos por um difratômetro XRD-6000 (Shimadzu, Kyoto, Japão). O diâmetro médio do domínio nanocristalino (d) foi estimado usando a equação de Scherrer¹¹¹. Micrografias eletrônicas de nanopartículas de maghemita foram obtidas com um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011.

3.2.2. Preparo e caracterização de nanopartículas Au-DMSA

A síntese de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DMSA foi realizada seguindo o método proposto por Gao *et al*¹¹². Primeiramente, 5 mL de uma solução aquosa de DMSA ($1,8 \times 10^{-3}$ M) foi adicionada rapidamente a 25 mL de uma solução aquosa de ácido cloroáurico (6×10^{-4} M) no ponto de ebulição. Este sistema foi mantido sob agitação constante durante 15 minutos. Após arrefecimento até a temperatura ambiente, a suspensão coloidal foi dispersa em água, dialisada contra água desmineralizada e armazenada no escuro.

O teor total de ouro nas suspensões foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica em um sistema Perkin-Elmer 5000 (Perkin-Elmer, Norwalk, EUA). Micrografias eletrônicas de nanopartículas de ouro foram obtidas com um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011.

3.3. TESTES *IN VITRO*

3.3.1. Análise da toxicidade *in vitro* das nanopartículas

3.3.1.1. Avaliação do metabolismo celular: teste com reagente MTT

A avaliação da viabilidade pelo ensaio de MTT (3-(4,5 dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), baseia-se na redução deste sal de tetrazólio amarelado a um produto de formazano insolúvel de cor azulada, que ocorre apenas em células viáveis devido à ação da enzima mitocondrial Succinato desidrogenase¹¹³. No estudo apresentado neste documento, o protocolo para o teste de MTT foi adaptado de Borenfreund *et al* (1988)¹¹⁴.

As pdCTMs, em uma concentração inicial de $8,5 \times 10^3$ células/200 μL , foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços e mantidas em estufa até atingirem 60-70% de confluência nos poços (37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO_2). Em seguida elas foram incubadas durante 24 horas com 200 μL de meio DMEM-LG suplementado (grupos controle) ou com 200 μL de soluções de nanopartículas diluídas neste meio nas concentrações mencionadas na seção anterior (Fe-DMSA diluído a 15, 30, 60 e 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e Au-DMSA diluído a 52, 90 e 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Após a incubação das pdCTMs com as diferentes soluções durante 02, 06 ou 24 horas, o sobrenadante da cultura foi removido e acrescentou-se 150 μL de solução de MTT (1 mg/mL) diluída em DMEM-LG suplementado (GIBCO). Como controle, alguns poços contendo células marcadas não receberam meio com MTT (verificando uma possível interferência das nanopartículas nos resultados do teste). Em seguida, a placa com células foi incubada novamente na estufa, por três horas, para que ocorresse a metabolização do sal. Depois, o meio com MTT foi removido e 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada poço, dissolvendo-se os cristais de formazan e resultando em uma solução arroxeadada, cuja absorbância a 595 nm foi medida. A cor mais escura da solução está diretamente relacionada à maior viabilidade celular. Calibrou-se como solução “branco” 200 μL de DMSO. Foram realizados quatro ensaios de forma independente, utilizando-se células oriundas de pacientes diferentes.

Tendo em vista que já foi descrito na literatura que dados de testes MTT, em células marcadas com nanopartículas de ouro, sugerem uma redução significativa da viabilidade apenas nas primeiras 24 horas de exposição¹¹⁵, realizou-se um segundo teste no qual as células foram incubadas durante 24 horas com Au-DMSA a 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a viabilidade foi avaliada logo após a incubação e também 24, 48 e 72 horas após a exposição.

3.3.1.2. Avaliação de citotoxicidade pela coloração com Azul de Tripán

O ensaio de coloração com o corante Azul de Tripán baseia-se na premissa de que células viáveis possuem membranas citoplasmáticas íntegras, impedindo a penetração do corante; assim, células mortas são vistas na cor azulada e células vivas, brancas¹¹⁶. Para a realização do presente trabalho, adotou-se o protocolo utilizado por Reich-Slotky *et al* (2008)¹¹⁷, com algumas modificações.

As pdCTMs, em uma concentração inicial de 5×10^4 células/mL, foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços e mantidas em estufa até atingirem 60-70% de confluência nos poços (37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂). Em seguida elas foram incubadas por 24 horas com 500 µL DMEM-LG puro (grupos controle) ou com 500 µL de soluções de nanopartículas diluídas em DMEM-LG em diferentes concentrações. Neste ensaio, apenas duas concentrações de cada material (Fe-DMSA e Au-DMSA) foram testados.

Após a incubação, o sobrenadante da cultura foi removido e as células foram soltas do fundo dos poços mediante tratamento com solução de tripsina-EDTA, contendo 2,5 g/L de tripsina (1:250) e 0,38 g/L de EDTA em solução salina balanceada de Hank, por cinco minutos a 37°C. A seguir, a suspensão de células foi transferida para um tubo de centrífuga contendo o sobrenadante da cultura (com eventuais células mortas) para inativação da tripsina e, em seguida, centrifugada por 3 minutos a 2000 RPM.

O sobrenadante foi descartado e as células, ressuspensas em 1 mL de DMEM-LG. Uma alíquota de 10 µL desta solução foi retirada e misturada a 40 µL de solução de corante Azul de Tripán a 0,4%. Por fim, 10 µL desta suspensão foram aplicadas em uma câmara de Neubauer (GIBCO) e procedeu-se a contagem em duplicata das células vivas e mortas. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e foram realizados três ensaios de forma independente, utilizando células oriundas de diferentes pacientes (n=12).

Análise estatística

Os gráficos que representam os dados obtidos nos ensaios de MTT e Azul de Tripán foram criados utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.), versão 6.0. A análise estatística destes dados foi realizada utilizando-se o programa SPSS (IBM) versão 17.0.

Para os ensaios com MTT, as absorbâncias de cada amostra foram transformadas em um valor, em porcentagem, a partir de uma comparação com as do grupo controle, cujo valor foi assumido como 100% (todas as células possuem metabolismo normal). Os valores obtidos a partir desta comparação foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para que então pudessem ser submetidos ao teste ANOVA one-way (no caso das amostras marcadas com Au-DMSA) ou two-way (para as marcadas com Fe-

DMSA). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Foram realizados os testes post-hoc de Tukey e de Dunnet nos casos em que foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Já nos ensaios com Azul de Tripán, as porcentagens de células vivas nos grupos controle e em cada grupo experimental foram comparadas. Os dados também foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA). Os testes de comparação Tukey e Dunnet também foram empregados, sendo o nível de significância adotado de $p < 0,05$.

3.3.1.3. *Análise morfológica das pdCTMs em microscópio ótico.*

As pdCTMs, em uma concentração inicial de 5×10^4 células/mL, foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços. Após atingir 60-70% de confluência, estas foram incubadas durante 24 horas com 500 μ L de DMEM-LG sem soro (grupo controle positivo), com 500 μ L de DMEM-LG com soro (grupo controle negativo) ou com 500 μ L de meio com nanopartículas diluídas (grupos tratamento). Cabe ressaltar que, no grupo controle positivo, as pdCTMs foram mantidas em um regime de depleção de soro, o que as leva a entrar em um estado apoptótico¹¹⁸.

Em seguida, os meios de cultivo foram removidos, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato salino (PBS) e coradas utilizando o kit Instant Prov (NEWPROV, Paraná - Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante; as CTMs foram lavadas novamente com PBS, uma vez coradas.

A forma celular, a presença de vacúolos, descontinuidade de membrana e outras características que possam indicar morte ou inviabilidade das células aderidas no fundo dos poços das placas foram verificadas utilizando-se um microscópio ótico invertido (Axiovert 100, Zeiss).

3.3.2. Quantificação e visualização de ferro/ouro intracelular

3.3.2.1. *Nanopartículas de Fe-DMSA*

A fim de verificar se as nanopartículas Fe-DMSA foram bem internalizadas pelas pdCTMs, foi realizada a coloração destas pela técnica do Azul da Prússia. As células

foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços, numa concentração inicial de 5×10^4 células por poço. Após atingir 60-70% de confluência, elas foram expostas à solução de Fe-DMSA, diluído a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em DMEM-LG suplementado durante 02 e 24 horas (mantidas a 37°C e 5% de CO_2).

Após a incubação, os sobrenadantes foram removidos, as pdCTMs fixadas com paraformaldeído a 4% (Vetec – Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) durante 15 minutos, e lavadas com PBS. Realizou-se em seguida a coloração expondo, durante trinta minutos, as células de cada poço à mistura de 250 μL de Ferrocianeto de potássio a 2% (Macron Chemicals, NC, EUA) e 250 μL de ácido clorídrico a 6% (Vetec), mistura essa realizada imediatamente antes do procedimento. Por fim, as pdCTMs foram contra coradas com vermelho rápido nuclear 0,5% (Sigma) por cinco minutos. Esta técnica evidencia o ferro corando-o em azul e contrastando-o nas células então avermelhadas/rosadas.

O método de coloração do Azul da Prússia foi empregado também para estimar a quantidade de Fe-DMSA interiorizado pelas pdCTMs, determinando-se assim o tempo e a concentração que resultam numa maior quantidade de ferro intracelular. A partir da elaboração de uma curva-padrão, seguindo o protocolo descrito por Boutry *et al* (2005)¹¹⁹, foi possível obter uma reta cuja função relaciona a absorvância a 630 nm da solução de azul da Prússia com a concentração de ferro na amostra, em mg/mL .

Após a obtenção da curva-padrão, as pdCTMs foram cultivadas em placas de 12 poços e expostas a soluções de Fe-DMSA (60 e a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 2, 6 e 24 horas, nas mesmas condições de incubação. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e guardados (em tubos tipo eppendorf, um para cada poço) e as células foram lavadas duas vezes com 500 μL de PBS, o qual também foi guardado. Em seguida, as células foram tripsinizadas, sedimentadas, redispersas em PBS e contadas por um contador automático (Scepter™, Millipore).

O sobrenadante inicial, o PBS utilizado nas lavagens e os *pellets* de células (todas em um volume de 100 μL) foram submetidos à dosagem de ferro pelo método de coloração com Azul da Prússia. Primeiramente, adicionou-se 100 μL de ácido clorídrico à 5N às amostras, mantendo-as a 80°C durante seis horas. Depois, transferiram-se as amostras para uma placa de 96 poços de poliestireno e adicionou-se a elas 100 μL de solução de Ferrocianeto de potássio a 5%, mantendo-as em agitação branda por 15 minutos. Por fim, a placa foi levada ao espectrofotômetro para medição da absorvância

das amostras a 630 nm. Um valor maior de absorbância indica uma maior concentração de ferro nas soluções.

Como controle, um grupo de células foi processado antes do Fe-DMSA ser adicionado aos demais grupos; este representa a quantidade fisiológica de ferro que havia nas pdCTMs ao início do experimento.

Análise estatística

Utilizou-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.), versão 6.0, para a elaboração de gráficos e a análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa SPSS (IBM) versão 17.0.

Os dados obtidos durante a elaboração da curva-padrão foram submetidos à regressão linear, sendo determinado, neste trabalho, o índice de correlação linear mínimo ideal como $R^2 = 0,99$. Nos ensaios de dosagem intracelular de ferro, as absorbâncias de cada amostra foram convertidas em quantidade de ferro, em mg/mL, a partir da equação da curva-padrão obtida. As mensurações foram realizadas em triplicata e a média dos valores de cada grupo (controles e experimentais) foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Nos casos em que foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, realizou-se o teste Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3.3.2.2. Nanopartículas de Au-DMSA

Tendo em vista que o ouro em escala nanométrica emite fluorescência¹²⁰, pode-se evidenciar a interiorização do metal nas células marcadas por meio de microscopia confocal, como feito por Castro-Longoria *et al*, por exemplo, os quais utilizaram esta metodologia para evidenciar a síntese intracelular de nanopartículas de ouro nas hifas do fungo *Neurospora crassa*¹²¹. Assim, as pdCTMs foram semeadas sobre lamínulas circulares de vidro estéreis depositadas ao fundo de poços de uma placa de poliestireno e expostas às nanopartículas de Au-DMSA diluídas a 8 µg/mL em DMEM-LG suplementado durante 24 horas. Após esse período, lavou-se os poços com PBS, fixou-se as células com paraformaldeído a 4%, e as lamínulas com células aderidas foram lavadas novamente com PBS, marcadas com o corante fluorescente DAPI (4'6'-diamidino-2-

fenilindol) (Life technologies), colocadas em uma lâmina e levadas para visualização em microscópio confocal (Leica TCS SP2, Leica Microsystems) (comprimento de onda de absorção: 543 nm; comprimento de onda de emissão: 574-691nm).

Para quantificação do ouro capturado pelas pdCTMs, estas foram cultivadas em placas de 12 poços e expostas a 1 mL de nanopartículas de Au-DMSA diluídas em DMEM-LG suplementado, a 90 µg/mL, durante 24 horas. Após o tempo de incubação, os sobrenadantes foram removidos e as células foram tripsinizadas, sedimentadas, redispersas em 1 mL de tampão, contadas por um contador automático (Scepter™, Millipore), sedimentadas novamente e ressuspensas em 500 µL de tampão.

As amostras foram encaminhadas para mensuração de ouro elemental em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) na central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

3.3.2.3. *Análise Ultraestrutural em Microscopia Eletrônica de Transmissão*

As pdCTMs marcadas foram analisadas em microscopia eletrônica de transmissão (JEOL 2011, STEM) não somente para confirmar a interiorização de ambas as nanopartículas, mas também para verificar alterações ultraestruturais decorrentes da presença dos metais. Após a exposição das células-tronco com Au-DMSA (90 µg/mL) e Fe-DMSA (80 µg/mL), elas foram tripsinizadas, sedimentadas, ressuspensas em fixador Karnovsky (1965) modificado (2% glutaraldeído; 2% paraformaldeído; 3% sacarose e 0,005 M de cloreto de cálcio diluído em tampão cacoalato de sódio 0,1M) e mantidas neste a 4°C por 24 horas. Após a retirada do fixador e lavagens em tampão cacoalato de sódio 0,01M, o pellet de células foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, subsequentemente desidratado em banhos de acetona com concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90%, 100% e 100%) e incluído em resina spurr (Sigma-Aldrich).

O espécimen, uma vez incluído no bloco de resina, foi cortado (cortes semi-finos e ultrafinos) em um ultramicrotomo (Leica EM UC7, Leica Microsystems). Por fim, colocaram-se os cortes obtidos em telinhas de cobre para observação no microscópio, o qual operou a 80 kV.

3.3.3. Análise dos efeitos das nanopartículas sobre a fisiologia das pdCTMs

3.3.3.1. *Teste de indução de diferenciação das pdCTMs*

Para verificar se ambas as nanopartículas têm influência em uma das propriedades mais fundamentais das CTMs – a capacidade de diferenciação – as células-tronco marcadas com Fe-DMSA e Au-DMSA foram estimuladas a diferenciar-se *in vitro* utilizando DMEM-LG suplementado enriquecido com indutores celulares. Como controle, células não marcadas também foram induzidas a diferenciar-se.

3.3.3.1.1. *Indução e quantificação de diferenciação osteogênica.*

O ensaio de diferenciação osteogênica foi realizado conforme protocolo já descrito¹²². Foram semeadas 5×10^4 pdCTMs para cada poço de duas placas de 24 poços contendo 0,6 μL de meio de cultivo. Depois de atingida a confluência celular, algumas pdCTMs foram expostas às nanopartículas de Fe-DMSA (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou de Au-DMSA (90 $\mu\text{g}/\text{mL}$), diluídas em DMEM-LG suplementado, durante 24 horas. Em seguida, células de alguns poços foram tratadas com 0,5 μL de meio osteogênico, cujos indutores são: dexametasona à 5×10^{-6} M (Sigma), ácido ascórbico à $2,8 \times 10^{-4}$ M (Sigma) e β -glicerol-fosfato à 10^{-2} M (Sigma). Os meios osteogênicos foram trocados a cada 72 horas, durante 24 dias. Como controle negativo, dois poços de cada grupo foram incubados apenas com DMEM-LG sem indutores.

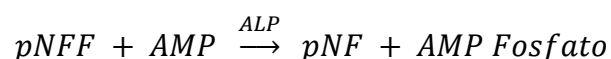
Após 24 dias de indução de diferenciação, as duas placas tiveram o meio de cultura removido e as células foram lavadas três vezes com 0,5 μL de PBS estéril. As psCTMs na primeira placa foram submetidas à coloração para detecção de calcificação na matriz extracelular em microscopia ótica convencional (ICS Standard 25, Zeiss). Estas então foram fixadas por 20 minutos com paraformaldeído 4% em PBS, lavadas três vezes com PBS, coradas por 25 minutos com 0,5 μL com Vermelho de Alizarina S (ARS) (Sigma) a 40 mM, pH 4.1 à temperatura ambiente, lavadas 5 vezes com 1 mL de água destilada (sob agitação) por 5 minutos cada.

Após fixação e coloração com vermelho de alizarina, procedeu-se a análise morfológica ao microscópio invertido, com objetiva de 10X e 20X e sistema de captura digital. Em seguida, quantificou-se o corante aderido ao tecido calcificado de cada

amostra desta placa seguindo o protocolo descrito por Gregory *et al* (2004)¹²³, com pequenas modificações. Primeiramente, adicionou-se 1 mL de ácido acético a 10% (v / v) a cada poço. Depois, a placa foi mantida sob agitação constante durante 30 minutos. Após este tempo as monocamadas de pdCTMs, fracamente aderidas ao plástico, foram raspadas com auxílio de *cell scraper* e transferidas com o ácido acético a um tubo de centrifuga de 1,5 mL. Depois de homogeneizar as amostras em vórtex, durante 30 segundos, estas foram aquecidas a 85 ° C por 10 minutos, transferidas para o gelo e ali mantidas durante 5 minutos. A suspensão foi então centrifugada a 20.000 g durante 15 minutos e 500 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifuga de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 100-200 µL de hidróxido de amônio a 10% (v / v) para neutralizar o ácido nas amostras. Por fim, alíquotas (150 µL) do sobrenadante foram lidas em triplicata a 405 nm, em placas de poliestireno de 96 poços. A quantidade de corante presente na solução de descoloração foi determinada por comparação da absorbância de soluções-padrão com concentrações conhecidas de ARS. Foram realizados dois ensaios independentes.

A fim de evidenciar a diferenciação osteogênica e comparar os resultados das diferentes amostras, as pdCTMs da segunda placa foram submetidas ao teste de atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP), pelo método colorimétrico do par-nitrofenol¹²⁴. Primeiramente, os poços contendo células foram lavados três vezes com PBS. Em seguida, adicionou-se aos poços um 1 mL de solução de lise, Triton x-100 (Sigma) a 0,2% em água destilada, e incubou-se a placa por 20 minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante. As células então foram coletadas com auxílio do *cell scraper* e transferidas para tubos de centrifuga de 1,5 mL, juntamente com o tampão de lise. As amostras foram então homogeneizadas em vórtex durante 30 segundos, centrifugadas a 2500 RPM durante 15 minutos a 4°C e mantidas em gelo por 30 minutos.

Os sobrenadantes foram colhidos para mensuração da atividade enzimática da ALP, utilizando-se o kit *SIGMAFAST p-Nitrophenyl phosphate Tablets* (Sigma) de acordo com as recomendações do fabricante. Esta enzima catalisa a transferência do grupo fosfato do substrato p-Nitrofenilfosfato (p-NFF) para o 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), formando o p-Nitrofenol (p-NF) de acordo com a equação abaixo:



A velocidade de liberação do p-Nitrofenol, que possui elevada absorvância a 405 nm, é proporcional a atividade enzimática da Fosfatase alcalina na amostra. O cálculo de atividade da ALP foi realizado mediante a seguinte equação:

$$\text{Atividade enzimática} \left(\frac{UI}{mL} \right) = \frac{A}{V \cdot T}$$

Em que: A= Concentração, em micromolar, de p-Nitrofenol na amostra analisada;

V= Volume da reação;

T= Tempo de reação;

Uma curva padrão, com concentrações conhecidas de p-NF, foi obtida a fim de mensurar a atividade enzimática. Por fim, os dados obtidos de cada amostra foram normalizados com a quantidade de proteínas totais nestas, determinada pelo método de Lowry¹²⁵. Foram realizados dois ensaios independentes.

3.3.3.1.2. *Indução e quantificação de diferenciação adipogênica.*

As pdCTMs marcadas e não marcadas (conforme descrito no item anterior), também foram submetidas à diferenciação adipogênica *in vitro*, de acordo com protocolos estabelecidos^{71,126}. Neste caso, foram utilizados como indutores dexametasona à $5 \times 10^{-6} M$ (Sigma); 3-isobutil-metilxantina à $4,5 \times 10^{-4} M$ (Sigma); insulina à $5 \mu g/mL$ (Sigma) e indometacina à $3 \times 10^{-4} M$ (Sigma). O meio adipogênico foi trocado a cada 72 horas, durante 24 dias. Como controle negativo, dois poços de cada grupo foram incubados apenas com DMEM-LG sem indutores.

Posteriormente ao período de indução, procedeu-se a análise citoquímica das pdCTMs diferenciadas por microscopia ótica convencional (ICS Standard 25, Zeiss). As células foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 4% (Vetec) durante 20 minutos, lavadas duas vezes com água destilada, coradas com uma solução de “Oil Red O” (Sigma) a 0,6% (massa/volume) durante aproximadamente 25 minutos e lavadas novamente para remover o excesso de corante. A marcação citoquímica por “Oil Red O” evidencia a presença do acúmulo intracelular de lipídeos.

Por fim, adicionou-se isopropanol a aproximadamente 100% a fim de extrair o corante e medir sua absorvância a 510 nm, uma mensuração indireta de adipogênese. A

absorbância de cada amostra foi medida em triplicata. Foram realizados dois ensaios independentes, utilizando-se células oriundas de diferentes pacientes.

Análise estatística

Para comparar a produção de tecido calcificado pelas pdCTMs marcadas ou não-marcadas, os valores de vermelho de alizarina presentes em cada amostra (em μg) foram primeiramente submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk. Nos casos de distribuição anormal dos valores em qualquer um dos grupos, procedeu-se a transformação destes. Obtida a normalização, os dados foram então submetidos à análise de variância (ANOVA). Nos casos em que foram detectadas diferenças entre os tratamentos foram aplicados o teste Tukey e o teste de Dunnet, sendo o nível de significância adotado de $p < 0,05$.

Os mesmos procedimentos de análise de normalidade, transformação de dados, análise de variância e testes post-hoc foram realizados para verificar diferenças na atividade da enzima fosfatase alcalina e na adipogênese (quantificação do corante Oil Red O, em μg) de pdCTMs marcadas e não marcadas. A análise estatística destes dados foi realizada utilizando-se o programa SPSS (IBM) versão 17.0.

3.3.3.2. Verificação da proliferação de pdCTMs marcadas

As pdCTMs, em três frascos de cultura de 75 cm^2 , inicialmente receberam os seguintes tratamentos: no primeiro frasco, o sobrenadante foi removido e adicionou-se meio de cultivo DMEM-LG suplementado (grupo controle); em outro, adicionou-se Fe-DMSA diluído ($80 \mu\text{g}/\text{mL}$) no meio suplementado; no último, Au-DMSA diluído ($90 \mu\text{g}/\text{mL}$). Após 24 horas de incubação, as células de cada frasco foram tripsinizadas, lavadas com PBS, sedimentadas e contadas. Em seguida, estas foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços sendo que foram adicionados 10^4 células e 2 mL de meio de cultivo DMEM-LG suplementado em cada.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO_2 e após 02, 04, 06, 08 e 10 dias de incubação, células vivas e mortas de determinados poços foram tripsinizadas, sedimentadas, ressuspensas em $100 \mu\text{L}$ de DMEM-LG. Uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ desta solução foi retirada e misturada a $40 \mu\text{L}$ de solução de corante

Azul de Tripan a 0,4% e, em seguida, procedeu-se a contagem destas. Não houve troca do meio de cultivo das placas durante o experimento. Os experimentos foram realizados em triplicata e foram realizados três ensaios de forma independente, utilizando células de diferentes origens biológicas.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando-se o programa SPSS (IBM) versão 17.0. Os valores foram analisados de forma individualizada, ou seja, realizou-se o teste *T-student* (amostras não pareadas) ou o teste não paramétrico Mann-Whitney (no caso de distribuição não normal dos dados) entre grupo controle e grupo experimental, com as médias dos dados correspondentes de cada tempo pré-determinado. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

3.3.3.3. Efeito de inibição da proliferação de linfócitos

Linfócitos humanos marcados com o éster fluorescente CFSE (CellTrace™ CFSE dye, Life Technologies), o qual liga-se ao citoplasma celular, foram co-cultivados em placas de poliestireno de 24 poços juntos com pdCTMs marcadas ou não marcadas. O protocolo utilizado para marcação e análise de proliferação dos linfócitos foi adaptado do trabalho de Quah et al (2007)¹²⁷. Primeiramente, estas células foram isoladas utilizando a técnica do gradiente de Ficoll, na qual amostras de sangue foram misturadas a PBS, depositadas sobre Ficoll-Paque (Ficoll-Paque PLUS, GE healthcare) e centrifugadas a 2000 RPM durante 25 minutos. Uma vez isolados, os linfócitos foram lavados duas vezes com PBS e ressuspendidos em uma solução de albumina sérica bovina a 0,1% em PBS. Em seguida, adicionou-se a solução de CFSE à suspensão celular de acordo com as recomendações do fabricante.

Uma quantidade de $2,5 \times 10^5$ linfócitos marcados foram semeados em cada poço, sendo que alguns destes havia CTMs não marcadas, marcadas com Fe-DMSA ou marcadas com Au-DMSA. O co-cultivo foi mantido durante cinco dias em estufa, utilizando-se como meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com SFB, antibiótico-antimicótico, L-Glutamina e fitohemaglutinina (lectina da espécie *Phaseolus vulgaris*) (Sigma-Aldrich), para ativação da proliferação linfocitária. Após o tempo de

incubação, o sobrenadante contendo linfócitos foi removido e submetido à análise em citometria de fluxo (Cyflow Space, Partec GmbH). Os dados obtidos foram analisados nos softwares Flowmax® (Partec) e FlowJo® (TreeStar Inc, USA).

3.4. TESTES *IN VIVO*

3.4.1. Animais

Camundongos C57BL/6 machos, 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).

3.4.2. Indução de fibrose pulmonar com bleomicina

Uma injeção única (50-60 µL) de Sulfato de Bleomicina (Cinaleo 15 UI, Meizler), diluído em soro fisiológico estéril a 4, 6 ou 8 UI/Kg, foi administrada via intratraqueal nos camundongos sob efeito de anestesia (solução composta por ketamina a 50 mg/kg e xilazina a 5 mg/kg inserida via intraperitoneal). 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 traquéia (figura 1). Dessa forma, dispensaram-se procedimentos cirúrgicos tradicionalmente empregados.

A fim de verificar a eficácia da técnica, o peso dos animais foi monitorado e procedeu-se a análise histológica dos pulmões murinos 4, 7 e 14 dias após a administração do fármaco.

3.4.3. Verificação da migração de pdCTMs em resposta à fibrose pulmonar

Este experimento teve como objetivo verificar a eficácia do modelo adotado, ou seja, se as células-tronco marcadas migram para tecidos pulmonares lesionados para

que, subsequentemente, estas pudessem ser rastreadas por microtomografia computadorizada. Para tal, pdCTMs expostas à Fe-DMSA (80 µg/mL) durante 24 horas foram tripsinizadas, sedimentadas, lavadas em PBS e administradas em camundongos por duas vias de administração: 1) via intravenosa, na qual 200µL de suspensão de células foram injetadas pela veia caudal, sob anestesia; 2) via intranasal (figura 2), na qual o animal foi mantido fixo em uma posição e 30 µL da solução foi administrada nas narinas.

Foram inoculadas 5×10^5 pdCTMs em cada camundongo, no máximo 24 horas após a administração intratraqueal de bleomicina. Seus pesos foram monitorados. Os animais foram eutanasiados 7 dias após a inoculação das pdCTMs e seus pulmões foram submetidos à análise histológica.

3.4.4. Análise dos pulmões murinos em microscopia de luz

3.4.4.1. 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.

3.4.4.2. 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.

3.4.4.3. 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 evidenciar ferro), as lâminas foram lavadas em água destilada por 1 minuto, depois coradas em uma solução 1:1 de ferrocianeto de potássio a 4% e ácido clorídrico a 4% (concentrações finais de 2% para cada um deles), durante 30 minutos, sob agitação suave, seguido por duas lavagens em água destilada; coradas na solução vermelho rápido por 10 minutos; água corrente por 3 minutos. Para a coloração pelo método de tricrômico de Gomori (para evidenciar, sobretudo, deposição de colágeno nos alvéolos), as lâminas foram lavadas em água corrente; coradas durante 13 minutos, mergulhadas rapidamente em uma solução de ácido acético 0,5% e levadas ao álcool 90% para início do procedimento de montagem.

3.4.4.4. 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 Laminas foram analisadas e fotografadas em microscópios Axioskop da Zeiss pertencentes ao laboratório de Microscopia Eletrônica (CEL-IB-UnB)

3.4.5. Microtomografia computadorizada

A técnica de microtomografia computadorizada (MCT) foi adotada neste estudo como potencial ferramenta de detecção e rastreamento *in vivo* de células-tronco

marcadas com as nanopartículas metálicas Fe-DMSA e Au-DMSA. Para a realização desta técnica foi utilizado o aparelho de microtomografia Skyscan 1076 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica), presente no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (GEM-IB-UnB).

Os camundongos foram tomografados diariamente, desde o momento da administração da Bleomicina, até o sétimo dia após a inoculação das pdCTMs marcadas, sendo anestesiados (conforme descrito na seção 4.4.2) para a realização deste procedimento. O microtomógrafo utilizado tem como acessórios uma câmera de vídeo e diversos aparelhos para monitoramento do animal durante o escaneamento, possibilitando a sincronização da frequência respiratória deste com a aquisição das imagens.

As imagens foram adquiridas utilizando voltagem de 50 kV, corrente de 180 mA, filtro de alumínio 0,5 mm e com tamanhos de voxel isotrópico de 35 x 35 x 35 μ m ou 18 x 18 x 18 μ m . Para a reconstrução bidimensional das imagens, foi utilizado o software NRecon (V 1.6.9, versão 64 bit com aceleração GPU, Skyscan, Kontich, Bélgica) e para as reconstruções tridimensionais, os softwares CTVox (V 1.5.0, versão 64 bit, Skyscan, Kontich, Bélgica) e CTVol (V 2.2, versão 64 bit, Skyscan, Kontich, Bélgica). As análises das reconstruções foram realizadas utilizando-se o software CTAnalyzer (V 1.5.0, versão 64 bit, Skyscan, Kontich, Bélgica). Foram utilizados os parâmetros mais adequados de smoothing, correção de artefatos de anel e correção de beam-hardening. Todos os parâmetros de aquisição e reconstrução foram iguais para todos os camundongos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 TESTES *IN VITRO*

4.1.1 Análise da toxicidade *in vitro* das nanopartículas

4.1.1.1 Avaliação do metabolismo celular: teste com reagente MTT

Para analisar a biocompatibilidade entre as nanopartículas metálicas e as células-tronco mesenquimais de polpa dental humana, foi necessário primeiramente verificar se estas conseguem suportar a exposição aos traçadores, diluídos em meio de cultivo a concentrações pré-determinadas (conforme descrito na seção 3.2), sem o comprometimento de sua viabilidade. Diante disso, realizaram-se ensaios com o reagente MTT, cujos resultados estão descritos a seguir.

Os valores de “atividade mitocondrial relativa” (em porcentagem) obtidos nos testes com pdCTMs expostas ao Fe-DMSA, foram submetidos ao teste ANOVA two-way, de modo a verificar se os fatores “tempo de incubação” e/ou “concentração de nanopartículas” exerciam efeitos significativos. Pelo menos 93% das células expostas ao Fe-DMSA permaneceram viáveis, não havendo diferenças entre grupos experimentais e seus respectivos grupos controle (figura 3), em quaisquer tempos de incubação. Interessante ressaltar que, de acordo com o teste *Tukey*, houve uma redução da viabilidade de pdCTMs após as primeiras 02 horas de exposição ao Fe-DMSA a 80 µg/mL, em comparação às células tratadas por 24 horas ($p=0,011$). Apesar disso, estes resultados ainda sugerem que as nanopartículas de óxido de ferro não exercem efeitos tóxicos sobre as pdCTMs.

Por outro lado, constataram-se diferenças significativas entre a atividade mitocondrial de pdCTMs controle e de pdCTMs expostas ao Au-DMSA durante 24 horas, de acordo com o teste ANOVA one-way ($F(3,63)=25,685$; $p\cong 0,000$). A atividade mitocondrial relativa das células dos grupos experimentais esteve em torno de 80-85%, menor se comparado a das células não expostas ao Au-DMSA (100%). Portanto, os dados do ensaio MTT sugerem que as nanopartículas de ouro testadas exercem pequenos efeitos nas mitocôndrias das pdCTMs receptoras (figura 4A).

Entretanto, vale ressaltar que já fora descrito na literatura que dados de testes MTT, em células marcadas com nanopartículas de ouro, sugerem uma redução significativa da viabilidade apenas nas primeiras 24 horas de exposição¹¹⁵. Diante disso, decidiu-se fazer um novo ensaio, no qual foi possível observar, de acordo com o teste *Tukey*, que a viabilidade celular aumentava com o passar do tempo após a incubação, inclusive, as diferenças entre pCTMs controle e pCTMs marcadas passaram a ser irrelevantes (Figura 4B). Em outras palavras, os *p*-valores das análises individuais entre grupo controle e grupo experimental 04, 24, 48 ou 72 horas foram, respectivamente: $\cong 0,000$; $\cong 0,000$; 0,554; e 0,724. Diante disso, demonstrou-se aqui que os efeitos do Au-DMSA sobre a atividade mitocondrial das pdCTMs não são permanentes, ou seja, dias após a retirada do meio contendo nanopartículas, as pdCTMs restauram sua atividade mitocondrial aos níveis iniciais.

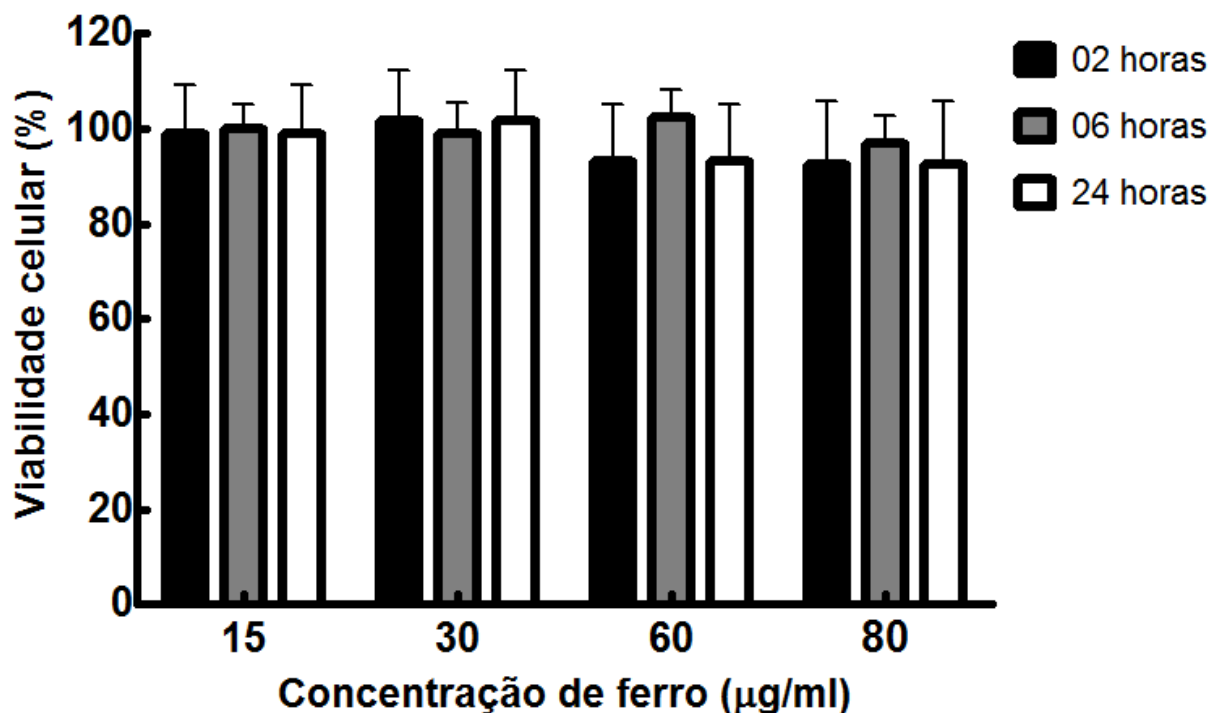


Figura 3. Teste de viabilidade celular pelo método MTT. Os dados expressam a porcentagem média, em relação ao grupo controle, e desvio-padrão de células-tronco mesenquimais que permaneceram viáveis após a exposição às nanopartículas de FE-DMSA, diluídas em DMEM-LG com soro, em quatro diferentes concentrações (15; 30; 60 e 80 µg/mL), durante três diferentes tempos de exposição (02, 06 e 24 horas). Não foram detectadas diferenças significativas entre grupos controle e grupos experimentais (valor $P > 0,05$). Foram realizados três ensaios independentes ($n=16$).

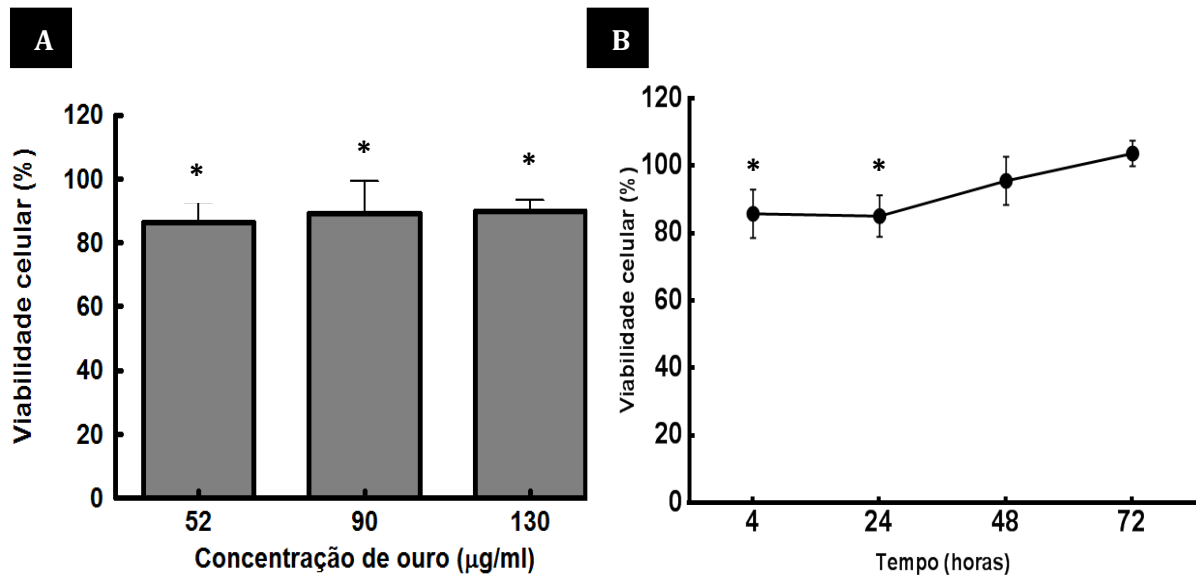


Figura 4. **(A)** Testes de viabilidade celular pelo método MTT. Os dados expressam a porcentagem média, em relação ao grupo controle, e desvio-padrão de células-tronco mesenquimais que permaneceram viáveis após 24 horas de exposição às nanopartículas de Au-DMSA, diluídas em DMEM-LG com soro, em três diferentes concentrações (52; 90; e 130 µg/mL). (*) Houve diferenças significativas entre células submetidas aos três tratamentos e as do grupo controle ($p < 0,01$). Foram realizados três ensaios independentes ($n=17$). **(B)** Testes de viabilidade celular pelo método MTT. Células-tronco mesenquimais foram expostas às nanopartículas de Au-DMSA (90 µg/mL) durante 24 horas, sendo possível notar valores crescentes de viabilidade celular com o decorrer do tempo, isto é, 48 e 72 horas após a exposição ($n=8$). (*) Houve diferenças significativas entre células controle e células 4 e 24 horas após a exposição ($p < 0,05$).

4.1.1.2 Avaliação de citotoxicidade pela coloração com Azul de Tripán

Como mencionado anteriormente, alguns dos testes de citotoxicidade comumente utilizados não são adequados para um tipo de nanopartícula e pode, às vezes, proporcionar resultados “falsos-positivos”. Além disso, tendo em vista que cada nanopartícula é única, com características exclusivas, torna-se importante realizar diferentes ensaios que se baseiam em diferentes mecanismos/parâmetros celulares para superar estes problemas. Diante disso, a fim de confirmar os testes com o reagente MTT, ensaios com o corante vital Azul de Tripán foram realizados.

Para a realização dos testes com azul de tripan, foram escolhidas as duas concentrações mais altas de Fe-DMSA (60 e 80 µg/mL) e, diante dos resultados com o reagente MTT, as duas concentrações mais baixas de Au-DMSA foram avaliadas (52 e 90

$\mu\text{g/mL}$). As pdCTMs foram expostas às nanopartículas durante 24 horas. De acordo com a análise de variância, não houve diferenças significativas entre a quantidade (em porcentagem) de células vivas do grupo controle e dos grupos experimentais ($F_{(4,59)}=1,545$; $p= 0,202$) (figura 5).

Em relação às pdCTMs marcadas com Fe-DMSA, o teste com corante Azul de Tripán confirmou o que fora observado nos ensaios com MTT: que o Fe-DMSA não é tóxico para as pdCTMs. Grande parte das células (aproximadamente 98%) permaneceu viva após a exposição, diferença esta que, de acordo com os testes *Tukey* e *Dunett*, não foi significativa. O mesmo também foi verificado nos grupos experimentais tratados com Au-DMSA, nos quais maioria das pdCTMs marcadas também sobreviveu (pelo menos 97,6% das células).

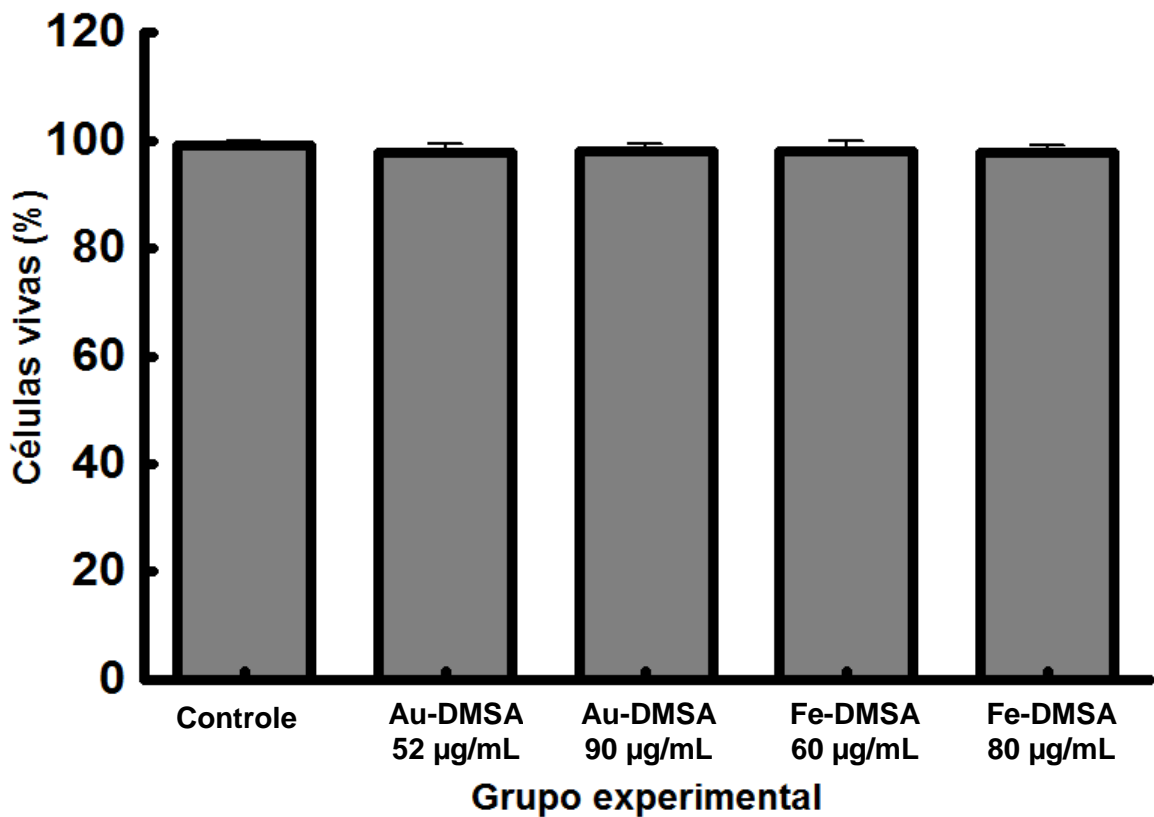


Figura 5. Teste de viabilidade celular de coloração com Azul-tripán. Os dados expressam a porcentagem média e desvio-padrão de células-tronco mesenquimais que permaneceram vivas após 24 horas de exposição a duas concentrações de Au-DMSA e de Fe-DMSA, diluídas em DMEM-LG com soro (52 e 90 $\mu\text{g/mL}$ e 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Foram realizados três ensaios independentes, cada qual em quadruplicata ($n=12$).

4.1.1.3 Análise morfológica das pdCTMs em microscópio ótico.

Morfologicamente, as células-tronco mesenquimais têm corpos celulares longos e finos, ou seja, um formato fusiforme. Além disso, estas apresentam um grande núcleo. Estas características foram observadas no grupo controle negativo, o qual representa células mantidas em meio DMEM-LG com soro, em condições normais de cultivo (figura 6A). Por sua vez, no grupo controle positivo, as pdCTMs foram mantidas em um regime de depleção de soro, o que as leva a entrar em um processo de morte celular¹¹⁸: em 24 horas nestas condições, houve retração das células, causando perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas; em alguns casos foi possível visualizar também a picnose nuclear, uma evidência de morte celular (figura 6B – setas azuis). Poucas células permaneceram normais nestas condições (figura 6B – setas pretas). Dessa forma, os grupos correspondentes às pdCTMs expostas às nanopartículas foram comparados com os dois grupos controle.

Após a exposição das pdCTMs ao Fe-DMSA (figura 6C), diluído a 80 µg/mL, durante 24 horas, estas mantiveram o tamanho e o formato fusiforme e não foram observados sinais característicos de morte celular: prolongamentos de membranas, presença de corpos apoptóticos, retração celular e núcleos picnóticos. Neste grupo foi possível observar ainda a deposição do Fe-DMSA como pequenas manchas de cor alaranjada associadas às CTMs (figura 6C). As mesmas características morfológicas foram observadas nas CTMs expostas ao Au-DMSA (figura 6D), o qual foi diluído a 90 µg/mL e exposto às células também durante 24 horas. Neste caso, entretanto, não foi possível observar o acúmulo de nanopartículas.

Assim, estes primeiros resultados nos levam a concluir que as exposições ao Fe-DMSA e ao Au-DMSA, nas concentrações testadas, não provocam efeitos tóxicos sobre as pdCTMs.

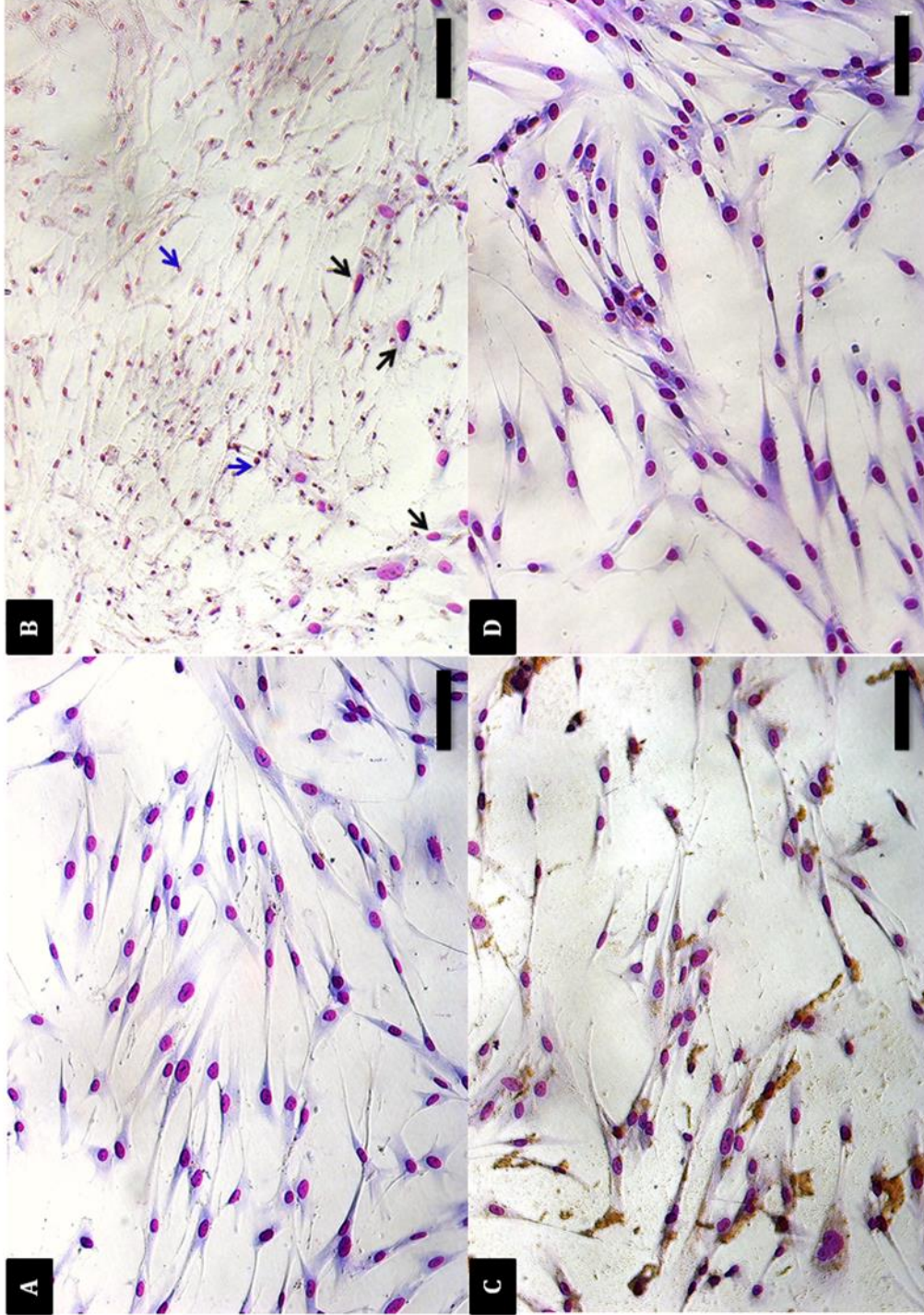


Figura 6. Análise de morfologia das pdCTMs por coloração com kit *Instant Prov*. As células foram expostas a 80 µg/mL de Fe-DMSA (C) e a 90 µg/mL de Au-DMSA (D) durante 24 horas e mantiveram seu formato característico, semelhantemente ao grupo controle negativo (A) e não apresentaram picnose nuclear, observadas nas células apontadas com setas azuis no grupo controle positivo (células em regime de depleção de soro) (B). Barras: 50 µm. Aumento de 200x.

4.1.2 Quantificação e visualização de ferro/ouro intracelular

4.1.2.1. Nanopartículas de Fe-DMSA

A mensuração do *uptake*, ou interiorização, de nanopartículas de óxido de ferro pelas CTMs foi realizada conforme descrito por Boutry *et al*, os quais, primeiramente, elaboraram uma curva-padrão que relaciona a absorvância de Azul da Prússia (OD₆₃₀) das amostras analisadas com a quantidade de ferro presente nesta. No presente trabalho, foi obtida uma reta com índice de correlação linear adequado ($R^2 = 0,9994$) e cuja equação pôde ser utilizada para estimar a concentração deste metal presente em soluções com valores de OD₆₃₀ entre 0,14 e 1,06 (figura 7).

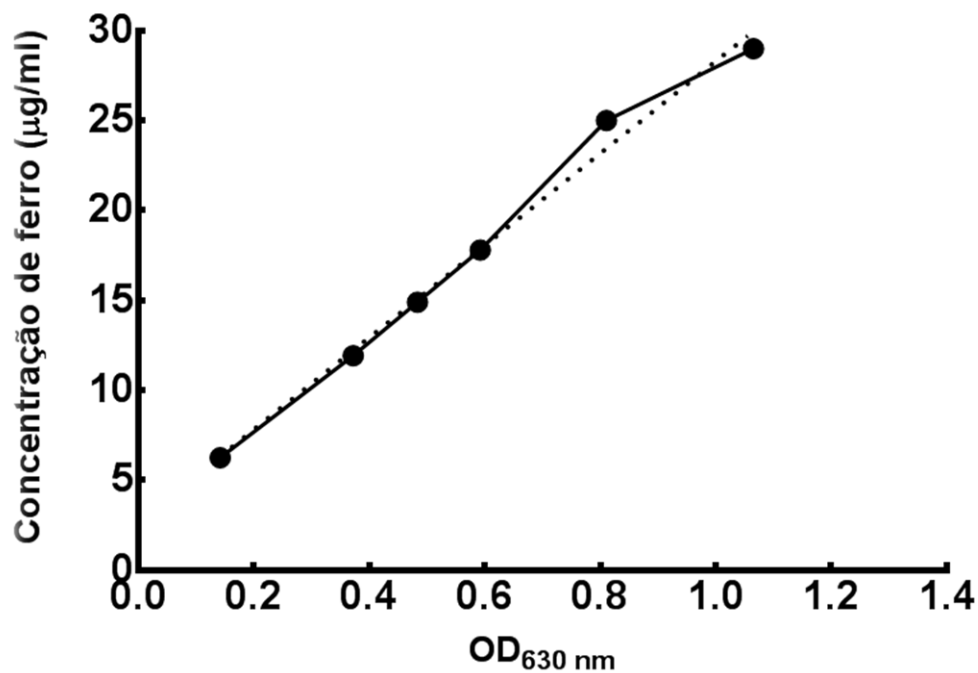


Figura 7. Curva-padrão elaborada para quantificação de ferro em soluções aquosas. No eixo das abcissas estão valores de absorvância a 630nm, enquanto que os valores no eixo das ordenadas se referem à concentração de ferro (em µg/mL) na amostra analisada. Equação da reta: $y = 0,0289x + 0,0013$. Índice de regressão linear $R^2 = 0,9994$.

Em seguida, com auxílio desta curva-padrão, precipitados (pellets) de pdCTMs marcadas com Fe-DMSA e de pdCTMs “controle” foram analisados (figura 8). Nas pdCTMs expostas durante duas e seis horas, independente da concentração utilizada, não houve diferenças significativas entre a quantidade de ferro fisiológico (representado nas barras brancas) e de ferro oriundo das nanopartículas (representado pelas barras cinza e preta). Sugerindo-se que tempos maiores de incubação com o material testado

são necessários para a marcação eficiente das células. Dessa forma, foi possível notar uma quantidade significativa deste metal (em relação ao respectivo controle), em pdCTMs expostas a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Fe-DMSA, durante vinte e quatro horas; havia em cada célula, em média, 17 picogramas (pg) de ferro, dos quais apenas 5 pg correspondiam a ferro fisiológico. Tendo em vista que esta foi a única que resultou em um *uptake* significativo, as pdCTMs passaram a ser marcadas apenas nesta condição (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24h) para a realização dos testes seguintes.

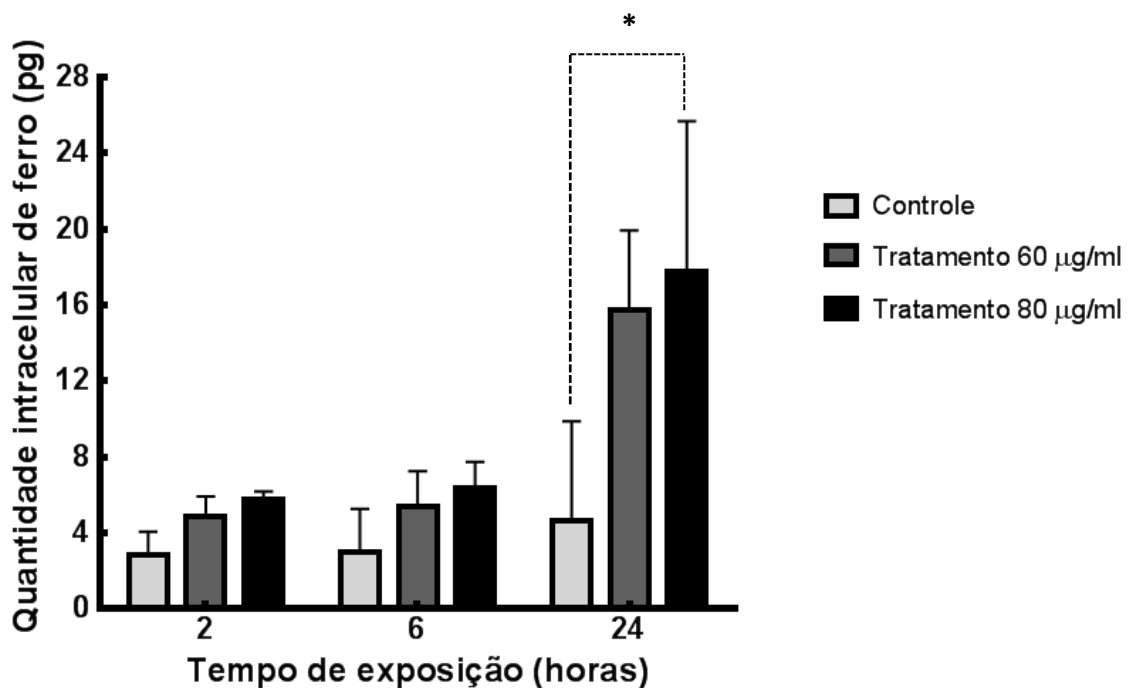


Figura 8. Teste de dosagem de ferro intracelular por coloração com Azul da Prússia. Os dados referem-se à média e desvio-padrão da quantidade de ferro presente em CTM após exposição a duas concentrações de Fe-DMSA (60 e 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante três tempos (2, 6 e 24 horas). (*) Houve diferença estatisticamente significativa entre CTM tratadas com nanopartículas diluídas a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas, em comparação a seu grupo controle ($p < 0,05$). $n = 3$.

Ao mesmo tempo, foram realizados ensaios de coloração de monocamadas de pdCTMs com a técnica do Azul da Prússia e contraste com vermelho rápido nuclear, os quais corroboraram com os dados obtidos anteriormente (figura 9): células incubadas durante vinte e quatro horas com 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Fe-DMSA (figura 9C) apresentaram ferro associado (em azul) em maior quantidade comparado à pdCTMs expostas apenas por duas horas (figura 9B). Cabe apontar ainda uma distribuição preferencial do metal ao redor do núcleo celular.

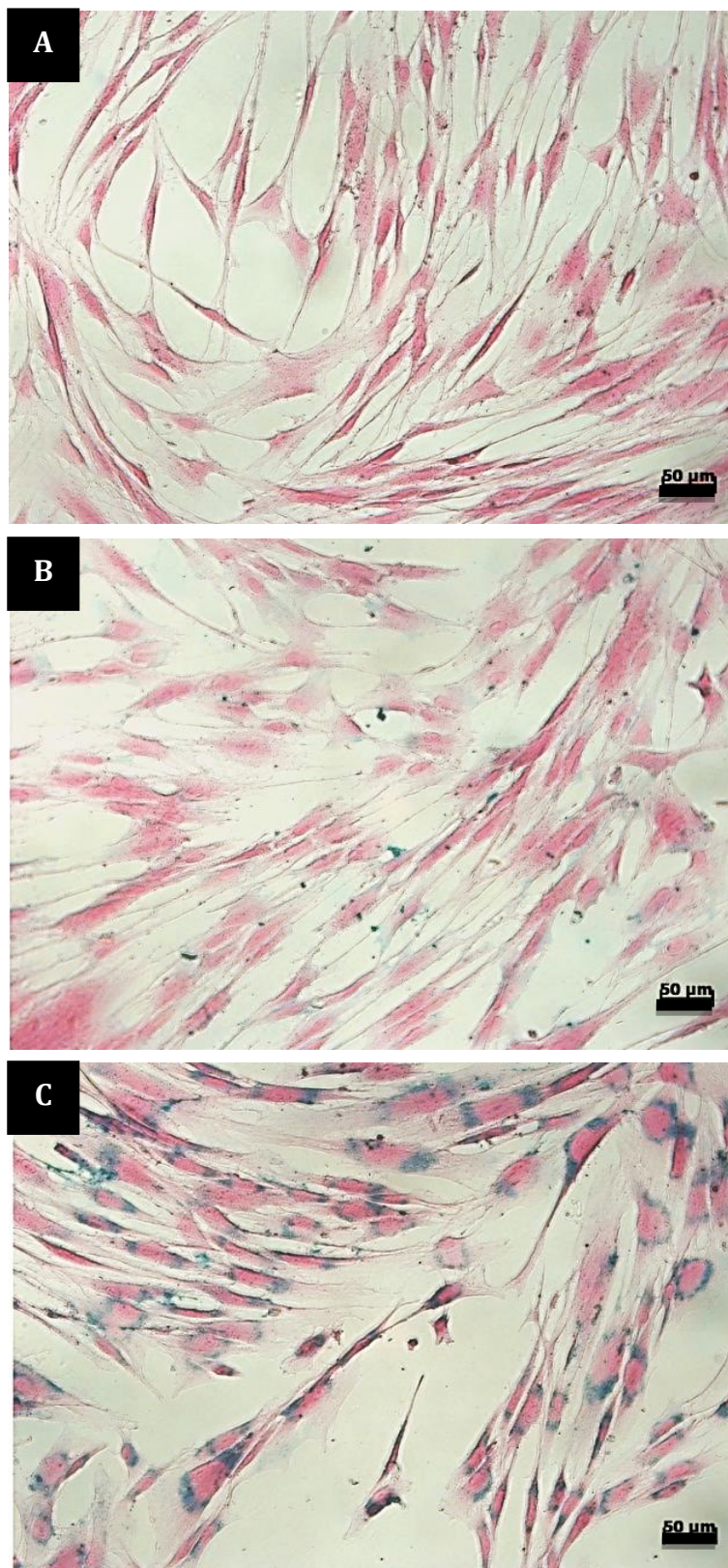


Figura 9. Teste de detecção de ferro associado por técnica de coloração Azul da Prússia. As pdCTMs foram contracoradas com vermelho rápido nuclear, assim, o metal está evidenciado na cor azul, em contraste ao citoplasma rosado e núcleo avermelhado. As pdCTMs foram incubadas apenas com DMEM-LG suplementado **(A)**, ou com o meio contendo nanopartículas diluídas a 80 µg/mL por 02 horas **(B)** ou por 24 horas **(C)**. Barra: 50 µm. Aumento 200x.

4.1.2.2. Nanopartículas de Au-DMSA

A fim de demonstrar que as nanopartículas Au-DMSA são interiorizadas pelas pdCTMs, foi realizada primeiramente a análise de pdCTMs marcadas por microscopia confocal, sabendo-se das propriedades ópticas características do ouro. Nas imagens obtidas durante a análise, foi possível evidenciar pontos fluorescentes, de cor vermelha, próximos aos núcleos celulares, evidenciados em azul pelo corante acidófilo DAPI (o qual se liga preferencialmente a moléculas de DNA dupla) (figura 10B). Tais pontos não foram vistos em células controle (figura 10A), fato que sugere que estes representem ouro oriundo do Au-DMSA. Por fim, diante dos resultados acima, precipitados de células expostas durante 24 horas ao Au-DMSA à 8 µg/mL, foram enviados para análise em ICP-OES para mensurar a quantidade de metal interiorizado: em cada pdCTM havia $4,045 \pm 1,065$ picogramas de ouro.

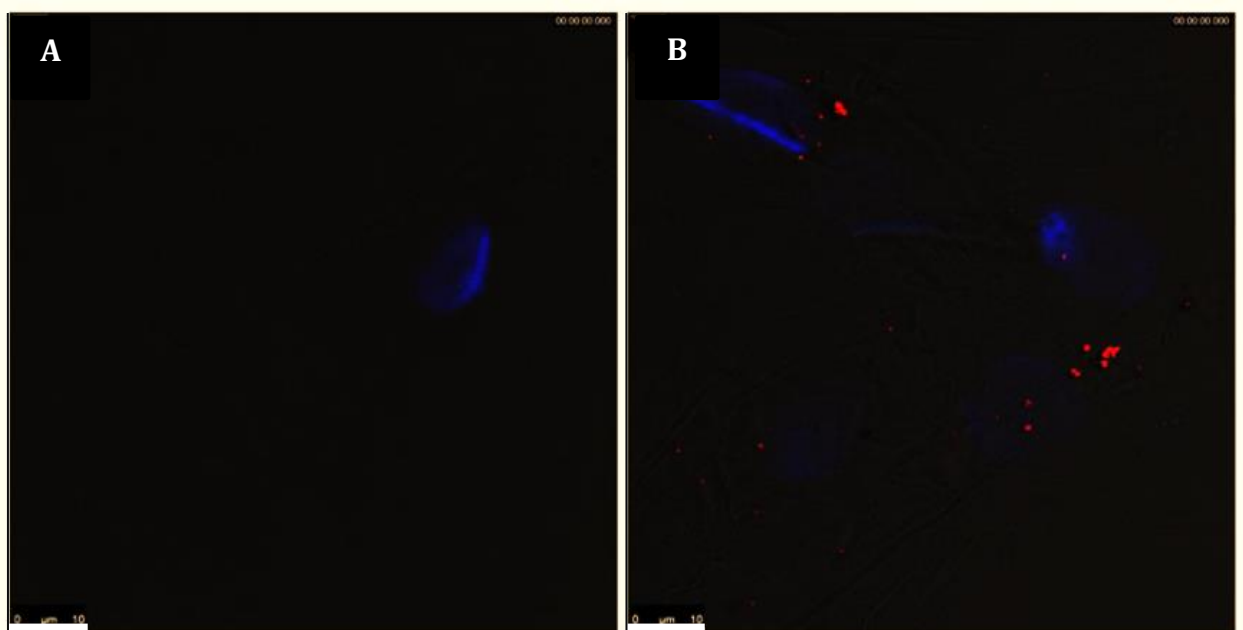


Figura 10. (A) Imagem de microscopia confocal de pdCTMs controle (B) Imagem de microscopia confocal de pdCTMs expostas ao Au-DMSA, diluído a 8 µg/mL, durante 24 horas. Em ambos os grupos, as pdCTMs foram coradas com DAPI, evidenciando os núcleos celulares em azul. Barras: 10 µm.

4.1.2.3. Análise Ultraestrutural em Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises por microscopia eletrônica de transmissão confirmam a internalização de ambas as nanopartículas pelas pdCTMs (figura 11) sendo possível visualizar nas imagens pequenos pontos electrón-densos no citoplasma das células expostas ao Fe-DMSA (figura 11B) e ao Au-DMSA (figura 11C). Cabe destacar que, após a internalização, tanto o Fe-DMSA, quanto o Au-DMSA formam agregados presentes em diversos compartimentos celulares, principalmente nas mitocôndrias (figura 11B e figura 11C).

Nas imagens, as pdCTMs “controle” (figura 12) apresentam núcleos irregulares, com cromatina dispersa e nucléolos visíveis (figura 12A). Na superfície da célula, visualizou-se algumas projeções microvilares com poucos contatos célula-célula (figura 12B). Em seus citoplasmas há retículo endoplasmático liso e rugoso bem desenvolvidos, mitocôndrias alongadas (figura 12C), ribossomos livres e gotículas lipídicas (figura 12D). As mitocôndrias apresentaram cristas periférica e transversal e, geralmente, estavam associadas com o retículo endoplasmático e as gotículas lipídicas. As cisternas de Golgi foram frequentemente observadas ao lado do núcleo celular. Por fim, foram identificadas também grandes quantidades de grânulos de glicogênio.

Entretanto, após incubação com Fe-DMSA durante 24 horas, as pdCTMs (figura 13) apresentaram sinais de toxicidade mitocondrial, especialmente naquelas com grandes quantidades de vesículas citoplasmáticas contendo nanopartículas de ferro (figura 13A). Foram observados: mitocôndrias inchadas e degeneradas, repletas de ferro nas cristas (figura 13B); grandes quantidades de figuras de mielina; e estruturas elétrondensas semelhantes à corpos apoptóticos no citoplasma (figura 13C).

Por fim, as pdCTMs tratadas durante 24 horas com Au-DMSA diluído a 90 µg/mL apresentaram ultra-estrutura similar às células não tratadas, no entanto, detectou-se algumas diferenças (figura 14). Em primeiro lugar, observaram-se muitas figuras de mielina concêntricas eletrondensas (figura 14A), em comparação inclusive com CTMs tratadas com Fe-DMSA. Observou-se também perda de cristas mitocondriais em algumas dessas organelas e inchaço em outras; e uma maior quantidade de vesículas eletronalucentes (figura 14B).

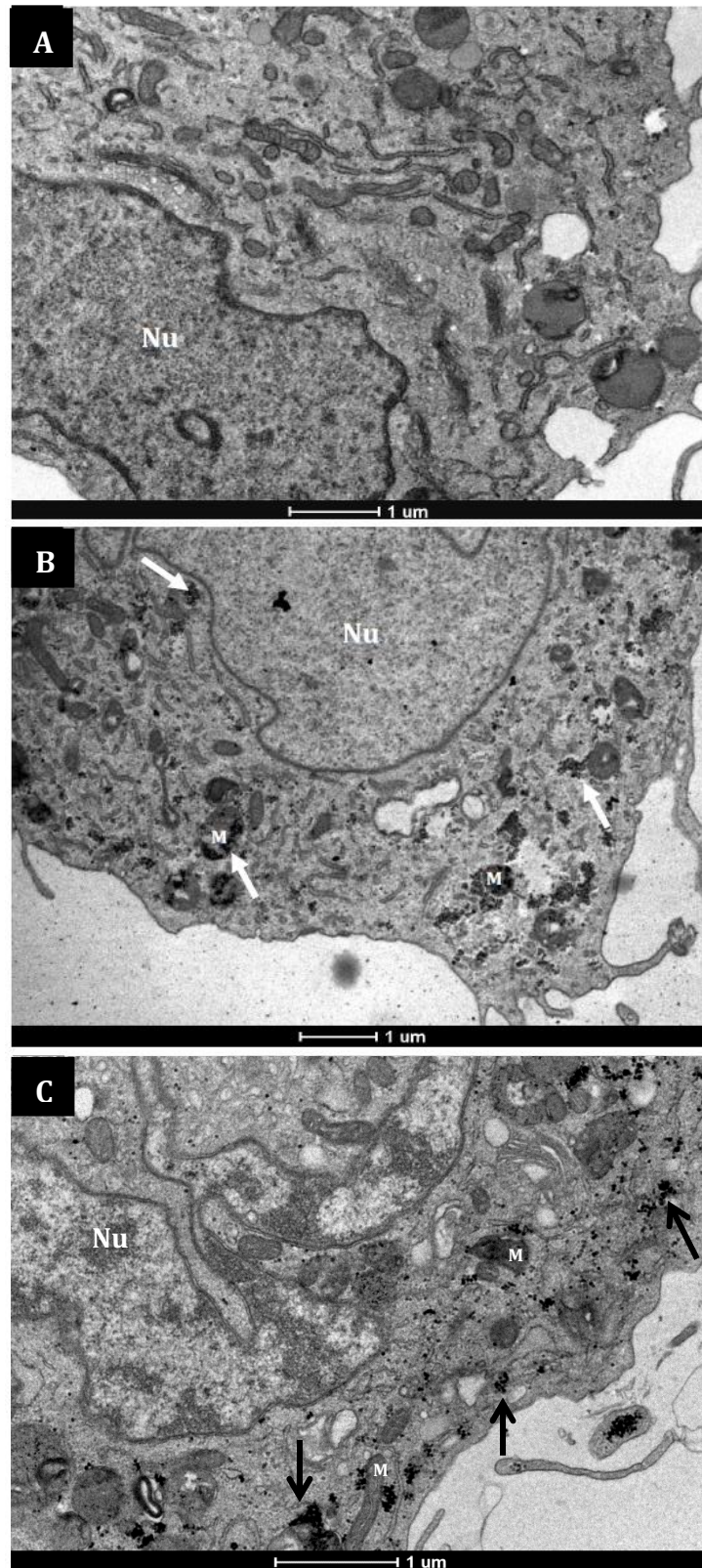


Figura 11. Análise de uptake de nanopartículas metálicas em microscopia eletrônica de transmissão. **(A)** pdCTMs “controle”, **(B)** pdCTMs marcadas com Fe-DMSA, **(C)** pdCTMs marcadas com Au-DMSA. Em **(B)**, as setas brancas evidenciam algumas das nanopartículas de maghemita interiorizadas; enquanto em **(C)** as setas pretas apontam exemplos de nanopartículas de ouro interiorizadas. Nu: núcleo celular; M: mitocôndrias. Barras: 1µm.

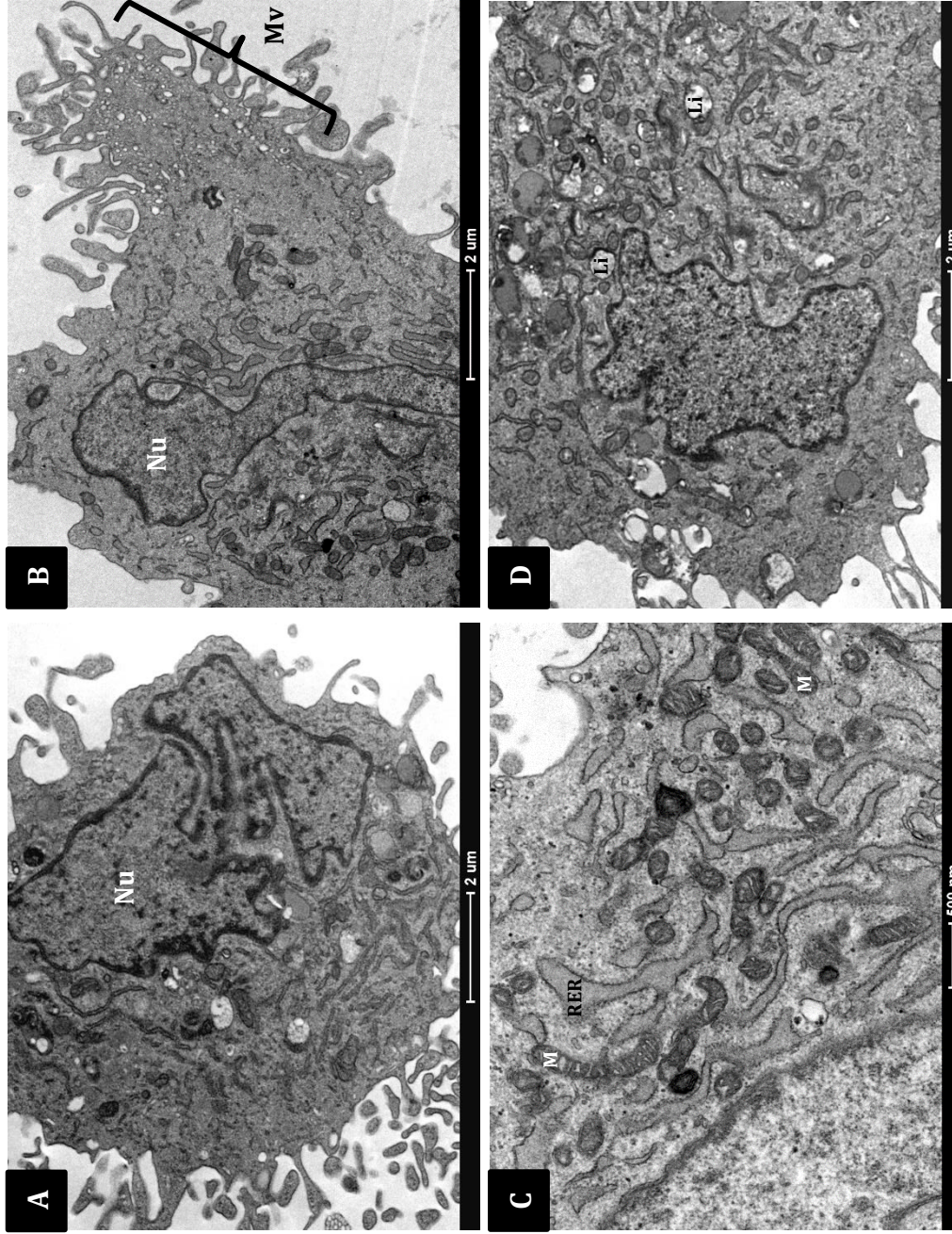


Figura 12. Exemplos de características de pdCTMs não marcadas, evidenciadas por microscopia eletrônica de transmissão. **(A)** formato oval, com núcleos irregulares e cromatina dispersa; **(B)** projeções microviliares; **(C)** em detalhe, retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e mitocôndrias alongadas; **(D)** presença de vesículas de gordura. Nu: Núcleo celular; Mv: Microvilosidades; M: Mitocôndrias; RER: Retículo Endoplasmático Rugoso; Li: gotículas lipídicas. Aumentos variados.

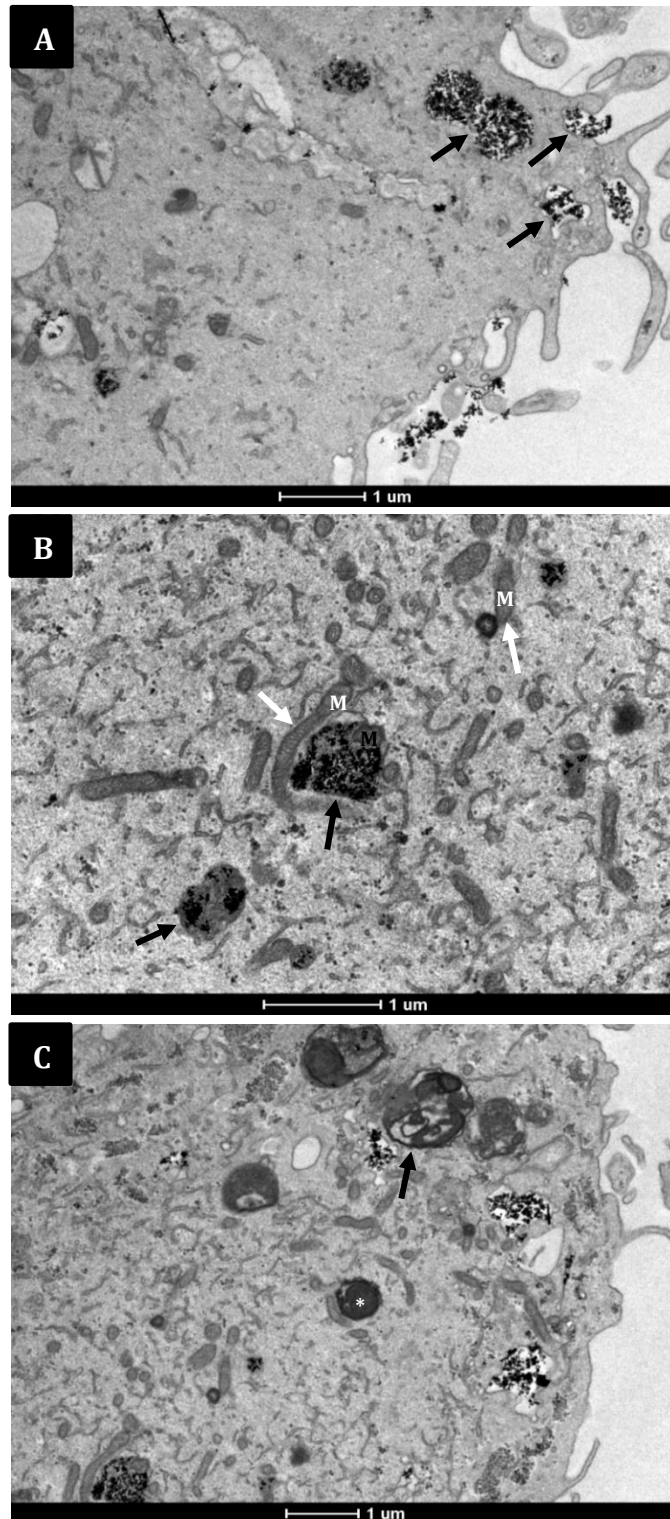


Figura 13. Análise em microscopia eletrônica de transmissão da interiorização de Fe-DMSA e de sinais de toxicidade decorrentes. **(A)** O *uptake* de nanopartículas na pdCTM se dá por endocitose, sendo possível visualizar projeções citoplasmáticas as envolvendo e, em seguida, estas foram armazenadas em vesículas (setas pretas). **(B)** Toxicidade mitocondrial provocada pelo acúmulo de ferro: mitocôndrias com o metal estão inchadas e degeneradas (setas pretas), em comparação às organelas sem este (setas brancas). **(C)** Observou-se estruturas semelhantes à corpos apoptóticos (*) e figuras de mielina (setas pretas) no citoplasma.

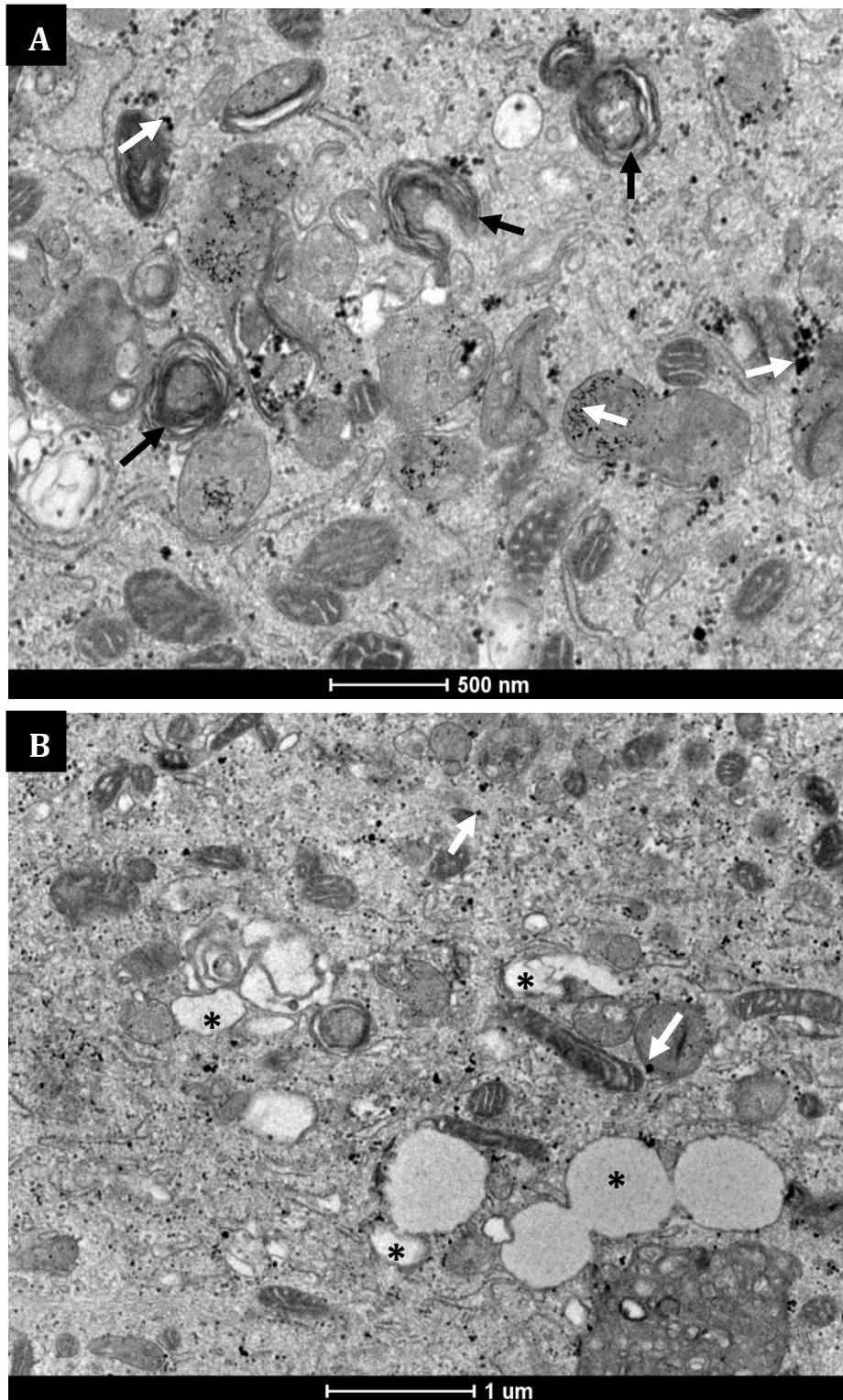


Figura 14. Análise em microscopia eletrônica de transmissão de pdCTMs expostas ao Au-DMSA a 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas. Em ambas as fotos, alguns exemplos de ouro interiorizado são apontados por setas brancas. **(A)** Foi possível observar muitas figuras de mielina no citoplasma, como as evidenciadas pelas setas pretas. **(B)** Muitas pdCTMs apresentaram mais estruturas eletrônicas, como as representadas pelos asteriscos (*) em comparação às pdCTMs do grupo controle.

4.1.3 Análise dos efeitos das nanopartículas sobre a fisiologia das pdCTMs

4.1.3.1. Teste de indução de diferenciação das pdCTMs

Diferenciação osteogênica

Após 24 dias de tratamento com meio osteogênico, observou-se a formação de nódulos de calcificação, mostrando que houve diferenciação de células de todas as amostras do grupo controle e de ambos os grupos experimentais - “CTM + Fe-DMSA a 80 µg/mL” e “CTM + Au-DMSA a 90 µg/mL” - (figura 15D, 15E e 15F, respectivamente), ao contrário do que ocorreu nos respectivos grupos controle negativo (figura 15A, 15B e 15C). Cabe destacar que havia menos pontos de mineralização em células marcadas com Au-DMSA, sendo possível verificar uma diferença qualitativa entre este grupo e os demais, tanto em imagens de microscopia de luz, quanto em análises macroscópicas com lupa (figuras 15 e 16).

Esta diferença entre pdCTMs marcadas com Au-DMSA e pdCTMs “controle” foi confirmada após a mensuração de Vermelho de Alizarina (ARS) absorvido pelos nódulos mineralizados (figura 17). De acordo com este ensaio, a massa média de corante incorporada pelo grupo controle foi de 67,9 µg ± 19,2, enquanto que, pelo grupo Au-DMSA, 49,9 µg ± 24,9. Houve, portanto, uma redução média de 21,6% nas taxas de osteogênese de pdCTMs marcadas com ouro.

Os valores (massa de ARS) foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA one-way), o qual acusou efeitos significativos entre os grupos ($F_{(2,23)}=27,068$; $p \cong 0,000$). De acordo com o teste *post hoc* Tukey, a quantidade do corante incorporado pelas células do grupo Au-DMSA foi muito menor, se comparado ao grupo controle e ao grupo Fe-DMSA ($p \cong 0,000$). Diante disso, estas análises sugerem uma redução significativa da atividade osteogênica das pdCTMs marcadas com ouro.

Por outro lado, foi possível verificar visualmente mais nódulos de calcificação em monocamadas de pdCTMs marcadas com Fe-DMSA (figuras 15 e 16). A mensuração de vermelho de alizarina indicou um aumento de 19,6% da taxa de osteogênese, em comparação ao grupo controle, havendo em média, em cada amostra analisada, 68,2 µg ± 17,7 (figura 17). Entretanto, de acordo com as análises estatísticas, este efeito não foi significativo (teste Tukey $p = 0,615$; teste Dunnett $p = 0,545$).

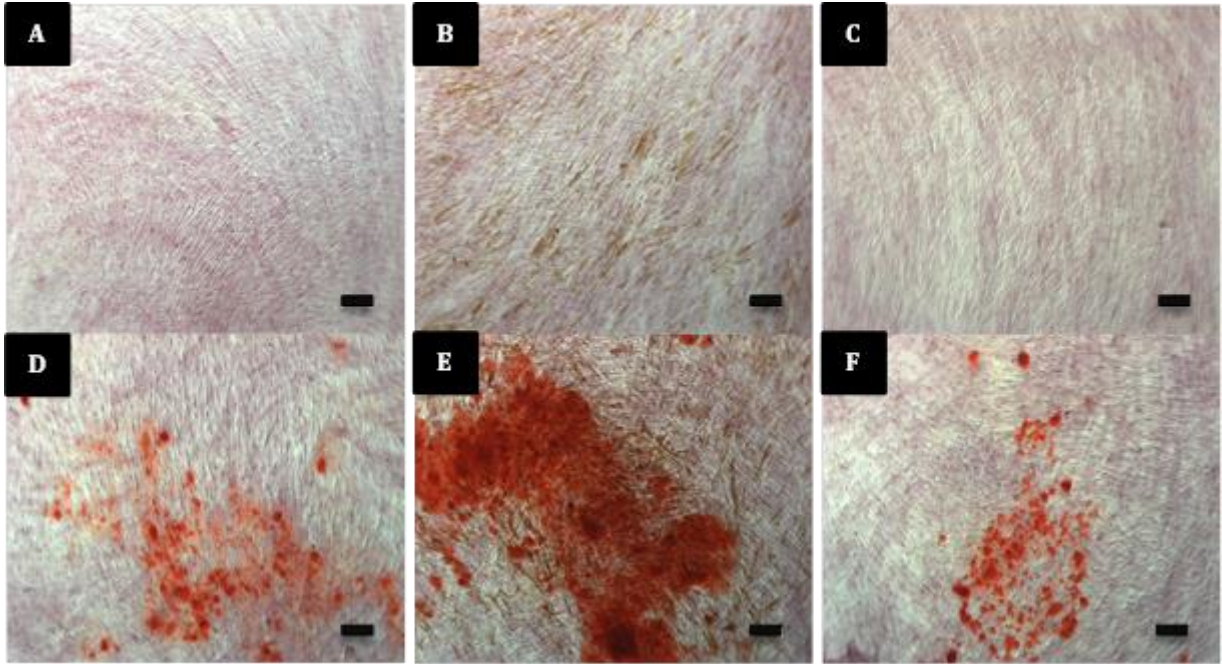


Figura 15. Ensaio de diferenciação osteogênica. Análise em microscópio óptico de monocamadas de pdCTMs não diferenciadas (A,B,C) e pdCTMs diferenciadas (D,E,F), coradas com Vermelho de Alizarina. Evidencia-se assim a formação de nódulos mineralizados, os quais estiveram presentes tanto em pdCTMs não marcadas (D), pdCTMs marcadas com Fe-DMSA (80 μ g/mL) (E) e pdCTMs marcadas com Au-DMSA (90 μ g/mL) (F). Barras: 100 μ m.

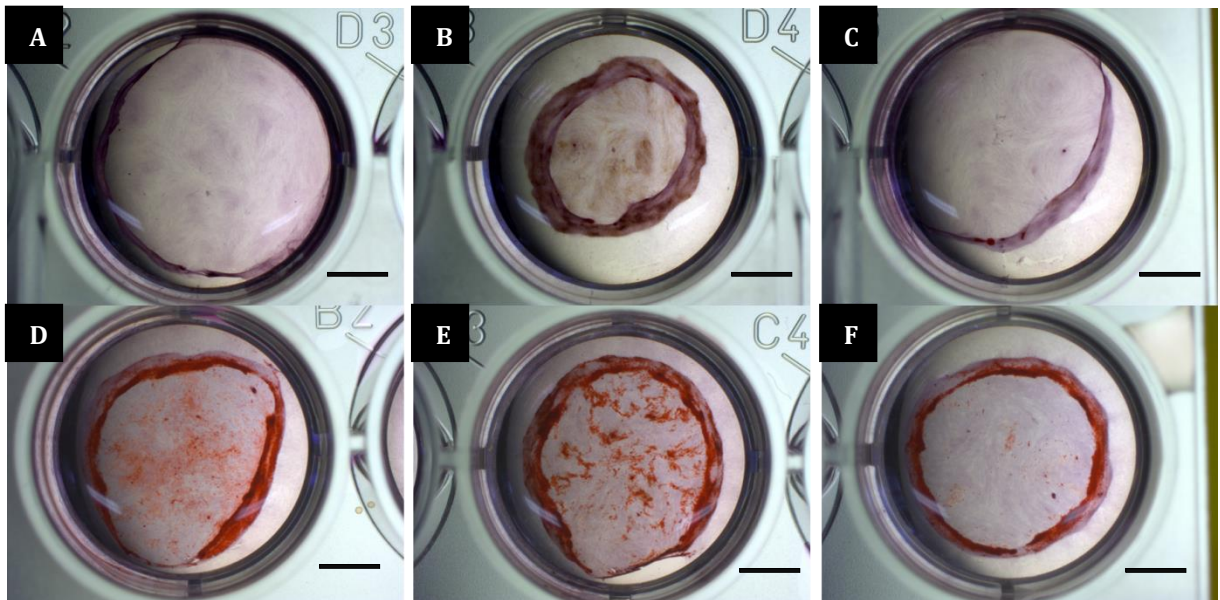


Figura 16. Ensaio de diferenciação osteogênica. Análise em lupa de monocamadas de pdCTMs não diferenciadas (A,B,C) e pdCTMs diferenciadas (D,E,F), coradas com Vermelho de Alizarina. Evidencia-se assim a formação de nódulos mineralizados, os quais estiveram presentes tanto em pdCTMs não marcadas (D) pdCTMs marcadas com Fe-DMSA (80 μ g/mL) (E) e pdCTMs marcadas com Au-DMSA (90 μ g/mL) (F). Barras: 5 mm.

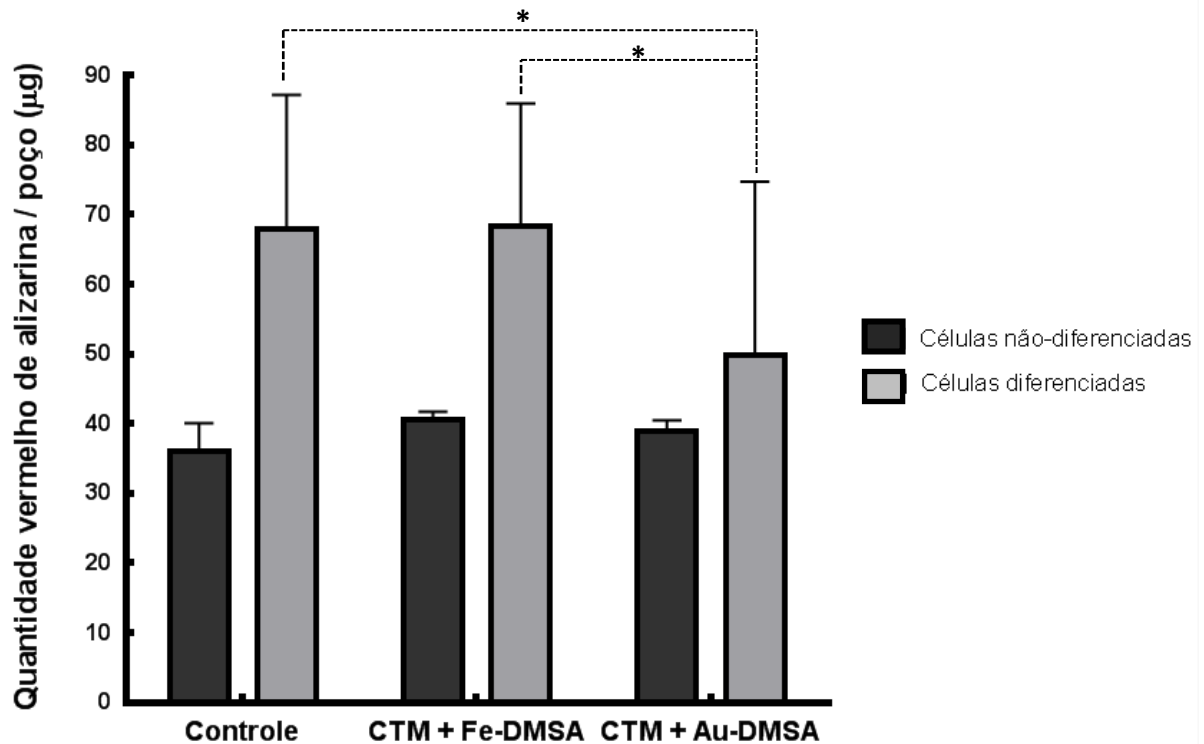


Figura 17. Ensaio de diferenciação osteogênica. Os dados expressam a média e desvio-padrão da quantidade de Vermelho de Alizarina, em microgramas, incorporados nas monocamadas de CTMs diferenciadas e não diferenciadas. (*) Houve diferença estatística significativa entre as médias do grupo “CTM + Au-DMSA diferenciadas” em comparação às do grupo “controle diferenciadas” e grupo “CTM + Fe-DMSA diferenciadas” ($p < 0,05$). Foram realizados dois ensaios independentes ($n=12$).

A fim de corroborar estes dados, realizou-se em seguida a avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP), em pdCTMs marcadas e não marcadas, utilizando-se p-nitrofenilfosfato como substrato. Após 24 dias de tratamento, realizou-se a mensuração da densidade óptica de cada monocamada, sendo possível obter (conforme descrito na seção 3.3.3.1.1) valores correspondentes de atividade enzimática, em miliunidades (mUI) por mililitro. Estes valores foram então divididos pelo conteúdo proteico total (em µg) da monocamada, estimado pelo método de Lowry, de modo a obter uma relação entre o total de ALP e uma quantidade relativa de pdCTMs presente na amostra - quanto mais proteínas, mais células (figura 18).

Ao contrário do que fora visto no ensaio de mensuração de ARS, não houve diferença estatística significativa entre células controle e ambos os grupos experimentais ($F_{(2,44)} = 0,072$; $p = 0,931$). Diante disso, os resultados obtidos neste teste sugerem que não houve variação das taxas de osteogênese entre pdCTMs marcadas e pdCTMs não marcadas.

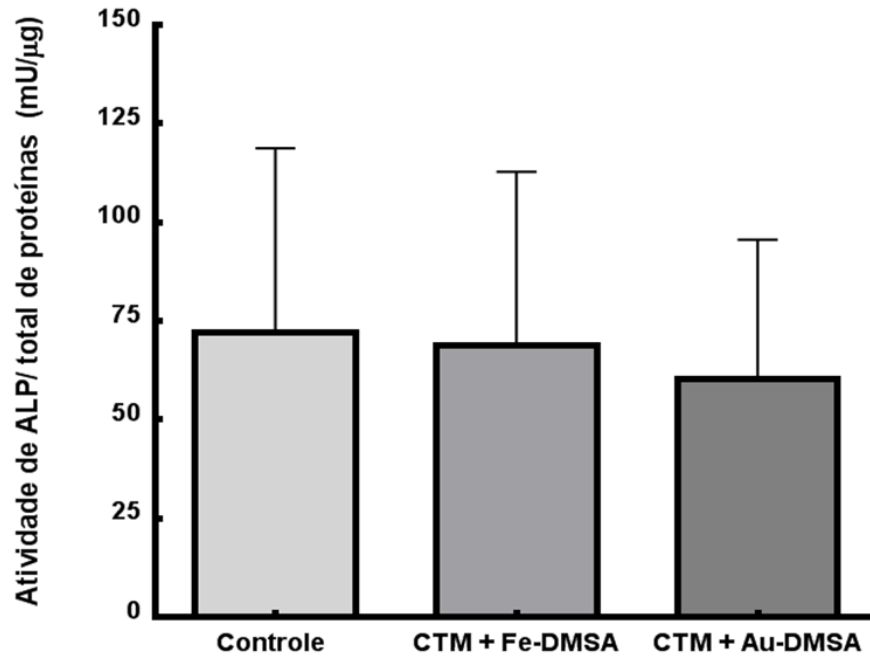


Figura 18. Ensaio de diferenciação osteogênica. Os dados expressam a média da relação entre atividade de fosfatase alcalina (ALP) e conteúdo proteico total, com os respectivos desvios-padrão. Não houve diferença significativa entre grupo controle e grupos experimentais ($p > 0,05$). Foram realizados dois ensaios independentes ($n=16$).

Diferenciação adipogênica

Após 24 dias de tratamento com meio adipogênico, verificou-se a presença de células contendo vacúolos de lipídios (figura 19), mostrando que houve diferenciação de todas as amostras do grupo controle positivo e de ambos os grupos experimentais, ao contrário do que ocorreu nos respectivos grupos controle negativo.

Realizou-se também a mensuração de corante Oil Red O incorporado pelas monocamadas de pdCTMs diferenciadas, mediante auxílio de uma curva-padrão que relaciona a densidade óptica do corante com a concentração deste na amostra ($\mu\text{g/mL}$). Em média, as pdCTMs não marcadas apresentaram $34,0\text{mg} \pm 12,3$ de Oil Red O em cada poço; as células marcadas com Fe-DMSA, $32,2\text{mg} \pm 10,2$; e as pdCTMs com Au-DMSA $34,2\text{mg} \pm 9,4$. Estes dados indicam uma redução de 1,5% da atividade adipogênica das pdCTMs quando marcadas com Fe-DMSA e um aumento de 3,8% da adipogênese nas células com Au-DMSA (figura 20). Os valores de massa de corante incorporado foram submetidos ao teste ANOVA one-way, o qual não detectou diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle e experimentais ($F_{(2,39)} = 0,141$; $p=0,869$).

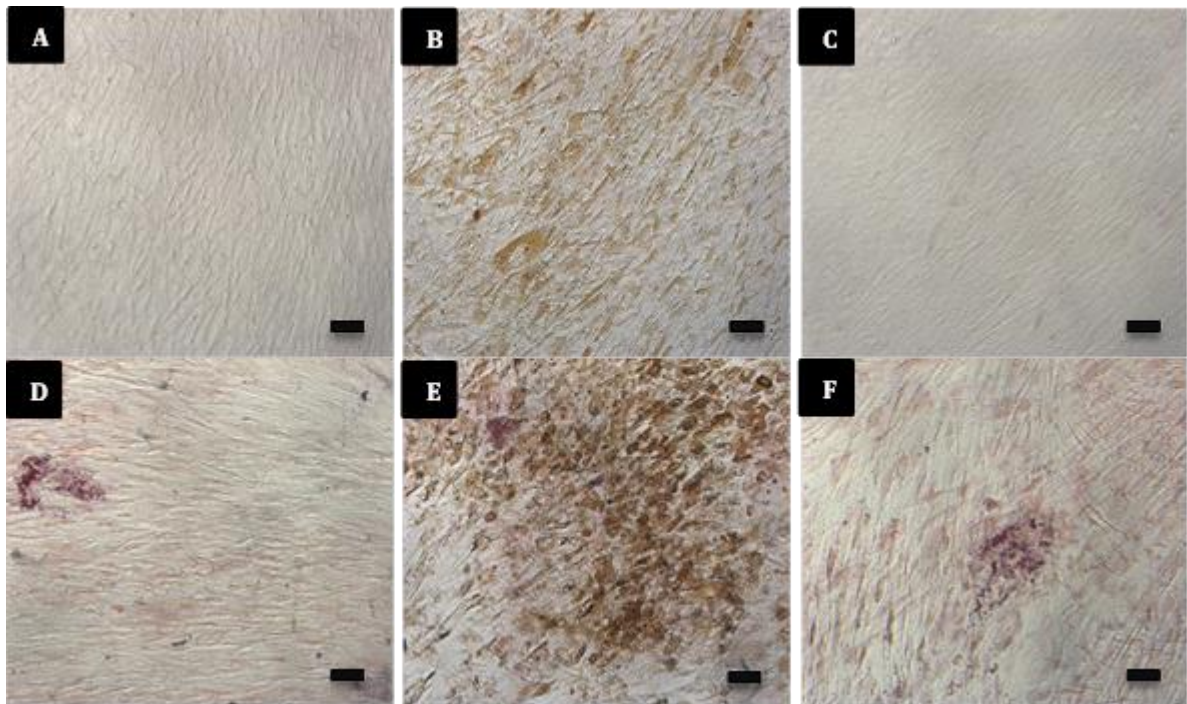


Figura 19. Ensaio de diferenciação adipogênica. Análise em microscópio óptico de monocamadas de pdCTMs não diferenciadas (A,B,C) e pdCTMs diferenciadas (D,E,F), coradas com Oil Red O. Evidencia-se assim a formação de vesículas lipídicas intracelulares, os quais estiveram presentes tanto em pdCTMs não marcadas (D) pdCTMs marcadas com Fe-DMSA (80 μ g/mL) (E) e pdCTMs marcadas com Au-DMSA (90 μ g/mL) (F). Barras: 100 μ m.

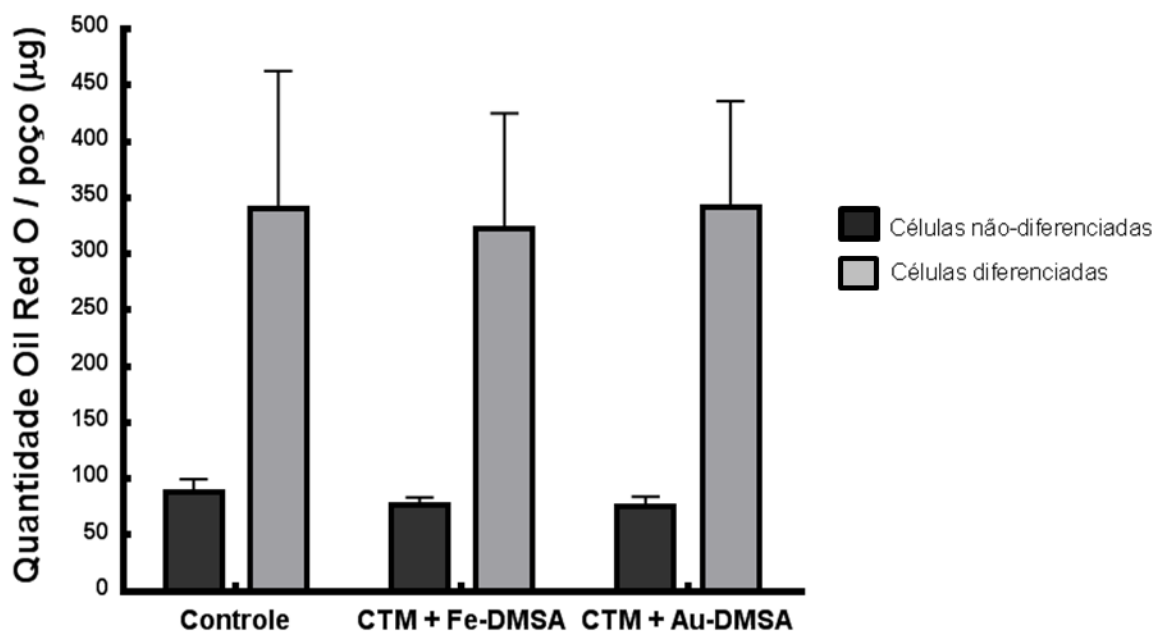


Figura 20. Ensaio de diferenciação adipogênica. Os dados expressam a média e desvio-padrão da quantidade de Oil Red O, em microgramas, incorporados nas monocamadas de CTMs diferenciadas e não diferenciadas. Não houve diferença significativa entre grupo controle e grupos experimentais ($p > 0,05$). Foram realizados dois ensaios independentes ($n=12$).

4.1.3.2. Verificação da proliferação de pdCTMs marcadas

Os resultados da contagem de células (vivas e mortas) por exclusão de azul de tripan, a fim de avaliar o potencial proliferativo das pdCTMs, estão expressos nas figuras 21 e 22.

De acordo com a análise individualizada dos dados, não houve diferenças significativas entre o número de pdCTMs marcadas com Fe-DMSA e pdCTMs controle em quaisquer tempos de contagem (figura 21). Durante a análise dos dados, pelo teste T-student, *p*-valores dos dias 2,4,6,8 e 10 obtidos foram, respectivamente: 0,220 ; 0,274 ; 0,772 ; 0,483 ; 0,777.

De acordo com esta mesma análise, houve um aumento significativo de pdCTMs marcadas com Au-DMSA no dia 2 (*p*=0,004). Cabe destacar que esta diferença foi observada apenas neste tempo (figura 22). Os *p*-valores dos dias 4,6,8 e 10 obtidos foram, respectivamente: 0,656 ; 0,148 ; 0,391 ; 0,793.

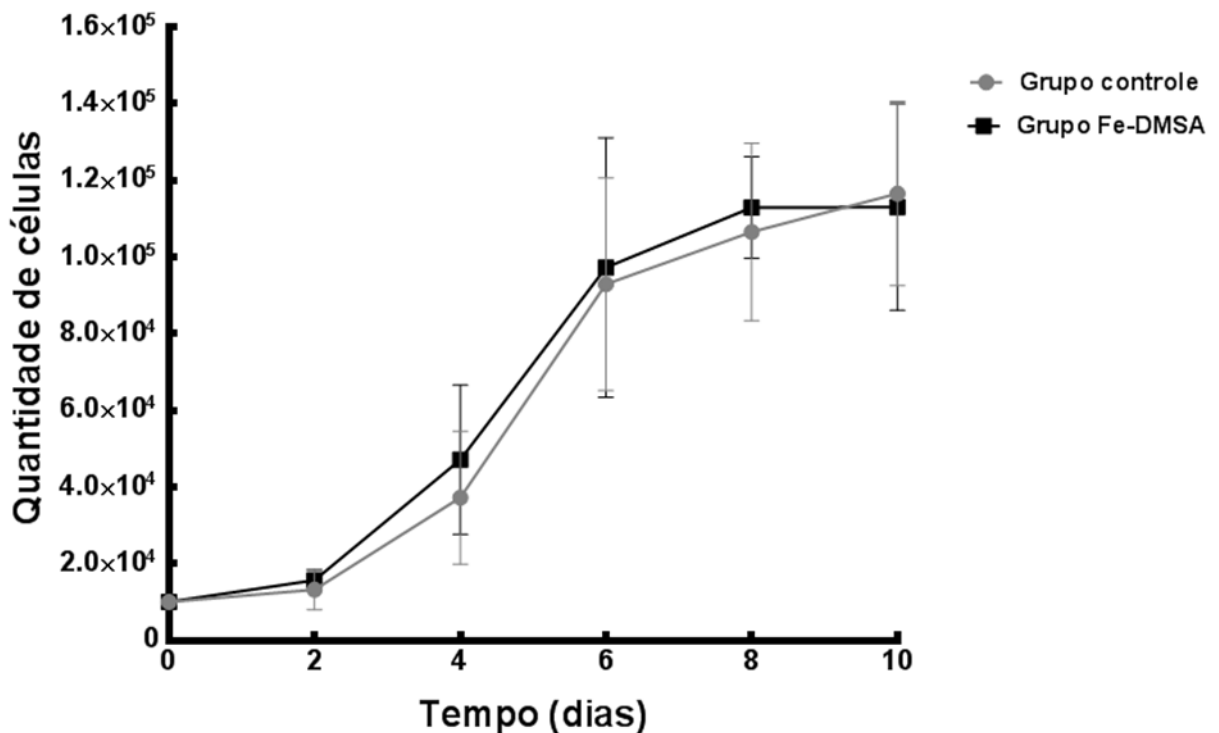


Figura 21. Curvas de proliferação de células-tronco mesenquimais de polpa dental. pdCTMs, expostas durante 24 horas ao DMEM-LG suplementado (•), ou ao mesmo meio com nanopartículas de Fe-DMSA (■) diluídas a 80 µg/mL, foram semeadas e contadas após diferentes tempos de incubação. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (*p* > 0,05) em quaisquer tempos de contagem. Foram testadas células oriundas de três amostras biológicas diferentes e cada ensaio foi realizado em triplicata (n=9).

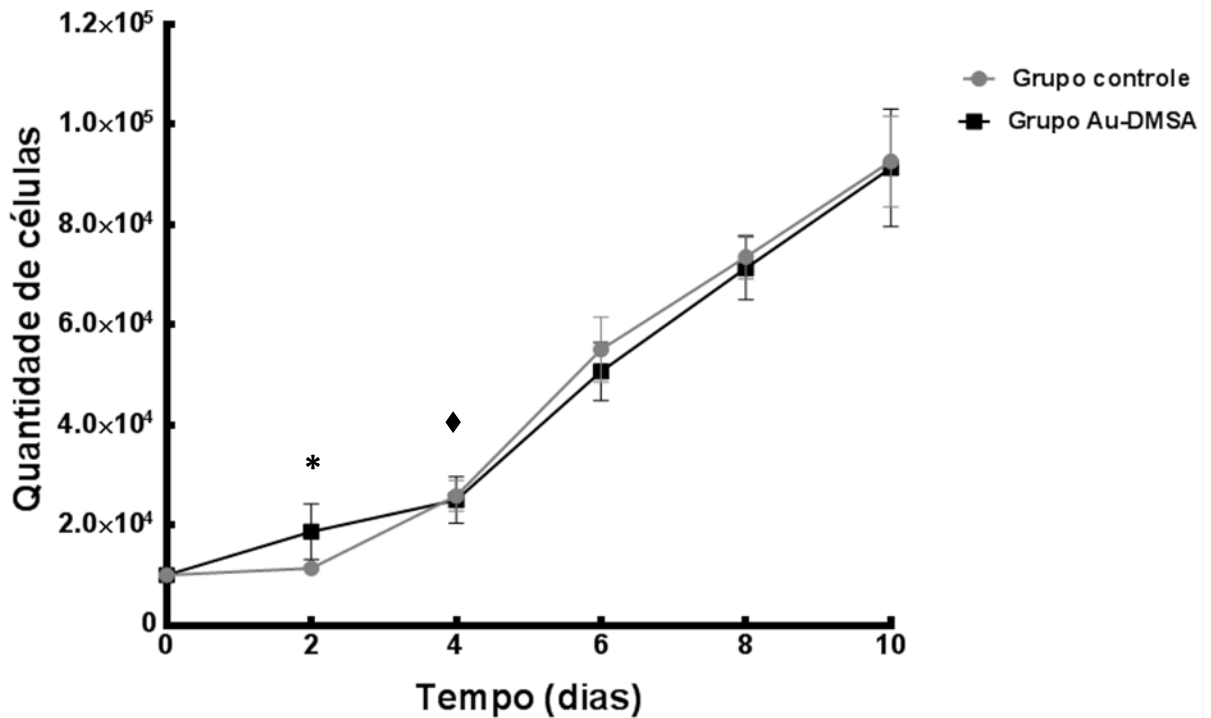


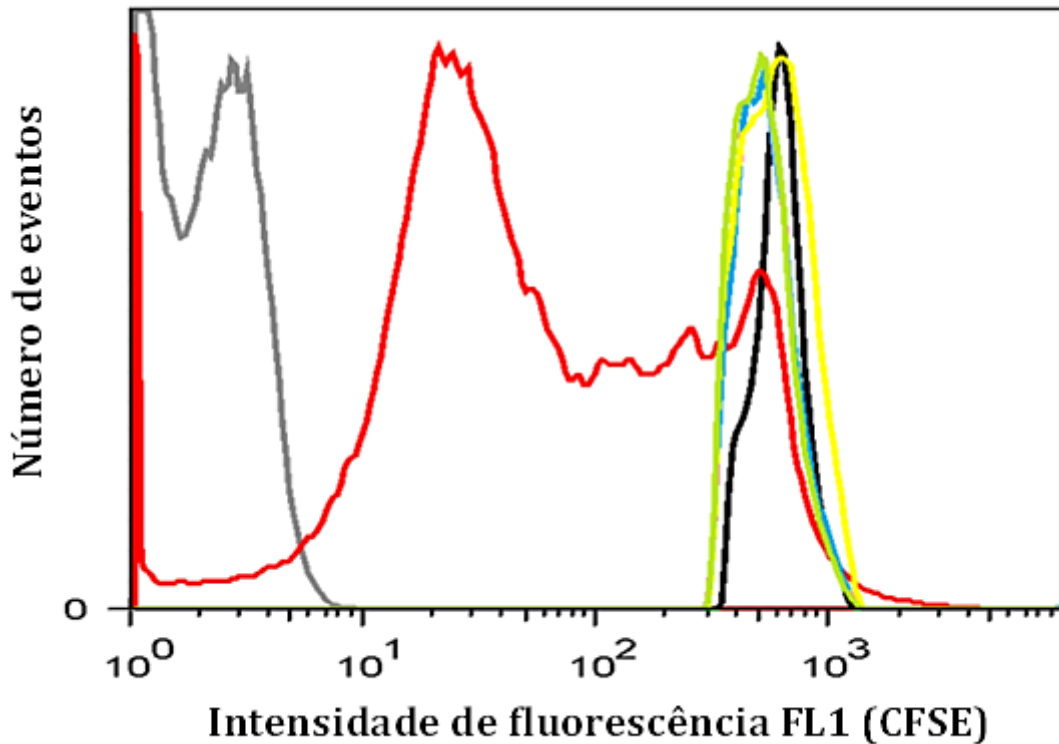
Figura 22. Curvas de proliferação de células-tronco mesenquimais de polpa dental. pdCTMs, expostas durante 24 horas ao DMEM-LG suplementado (•), ou ao mesmo meio com nanopartículas de Au-DMSA (■) diluídas (90 µg/mL), foram semeadas e contadas após diferentes tempos de incubação. (*) Houve aumento significativa das médias do grupo Au-DMSA em comparação ao grupo controle apenas no tempo 2 ($p < 0,05$). (♦) Dados analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Foram testadas células oriundas de três amostras biológicas diferentes e cada ensaio foi realizado em triplicata ($n=9$).

4.1.3.3. Efeito de inibição da proliferação de linfócitos

O último experimento desta fase foi o co-cultivo de células-tronco mesenquimais e linfócitos T humanos, visando verificar se a marcação com nanopartículas metálicas, revestidas com DMSA, exerce efeito sobre a capacidade de supressão linfocitária característica das CTMs (figura 23).

A proliferação dos linfócitos marcados com CFSE (marcador citoplasmático), neste experimento, leva a uma “diluição” deste traçador fluorescente e a consequente redução de sua intensidade, conforme demonstrado no gráfico abaixo (linha vermelha). Diante da ativação (e consequente divisão) destas células mononucleares neste grupo controle, há várias populações com diferentes quantidades de marcador, daí o fato da linha vermelha abranger vários valores de intensidade de fluorescência (figura 23). No mesmo sentido, a curva representante do grupo controle negativo, que contém linfócitos

não ativados (linha preta), permaneceu estreita. Verificou-se neste experimento que linfócitos, seja após o co-cultivo com pdCTMs não marcadas (linha azul), seja com pdCTMs marcadas com Fe-DMSA ou com Au-DMSA, não se proliferaram.



- Linfócitos não marcados com CFSE;
- Controle negativo: Linfócitos marcados não ativados;
- Controle positivo: Linfócitos marcados e ativados;
- Grupo experimental: Linfócitos ativados co-cultivados com CTMs não marcadas;
- Grupo experimental: Linfócitos ativados co-cultivados com CTMs marcadas com Au-DMSA (90 μ g/mL);
- Grupo experimental: Linfócitos ativados co-cultivados com CTMs marcadas com Fe-DMSA (80 μ g/mL);

Figura 23. Análise em citometria de fluxo de linfócitos marcados com CFSE, co-cultivados com pdCTMs marcadas e pdCTMs não marcadas. Os espectros mostrados são representativos de ensaios realizados em triplicata.

A análise estatística dos dados, pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, indicou que não houve variação significativa entre os grupos ($p=0,06$). Em suma, conforme análise dos resultados obtidos, a marcação das CTMs com ambas as nanopartículas metálicas não exerce efeitos sobre a propriedade de supressão linfocitária *in vitro* destas.

4.2 TESTES *IN VIVO*

4.2.1. Indução de fibrose pulmonar com bleomicina

Diversas técnicas de indução de fibrose pulmonar em murinos com bleomicina têm sido descritas na literatura ao longo dos anos; o que resultou em várias possibilidades de vias de administração, concentrações do fármaco e tempos de exposição à droga. No presente trabalho, optou-se pela instilação intratraqueal de bleomicina como rota de administração; entretanto, restavam ainda duas variáveis: dose e tempo de indução.

Diante disso, foram testadas inicialmente as seguintes concentrações de bleomicina: 4UI de fármaco por quilograma do animal; 6UI/Kg e 8UI/Kg. Análises histológicas foram realizadas 4, 7 e 14 dias após a indução de fibrose pulmonar (figura 24).

A dose 8 UI/Kg mostrou-se muito letal: todos os animais deste grupo apresentaram perda repentina de peso (em torno de 10 gramas) e todos vieram a óbito até 4 dias após a indução. Análises histológicas dos pulmões desses animais demonstram intenso espessamento alveolar e presença de células linfocitárias (figura 24C). Diante disso, esta opção de dose foi descartada.

Por outro lado, verificou-se que animais tratados com 4 UI/Kg, não desenvolviam sintomas característicos de fibrose pulmonar (i.e., perda de peso, perda de pelos, dificuldades de respiração); análises histológicas posteriores indicaram que as estruturas alveolares destes animais permaneciam inalteradas, semelhantes às dos animais “controle” (figura 24A).

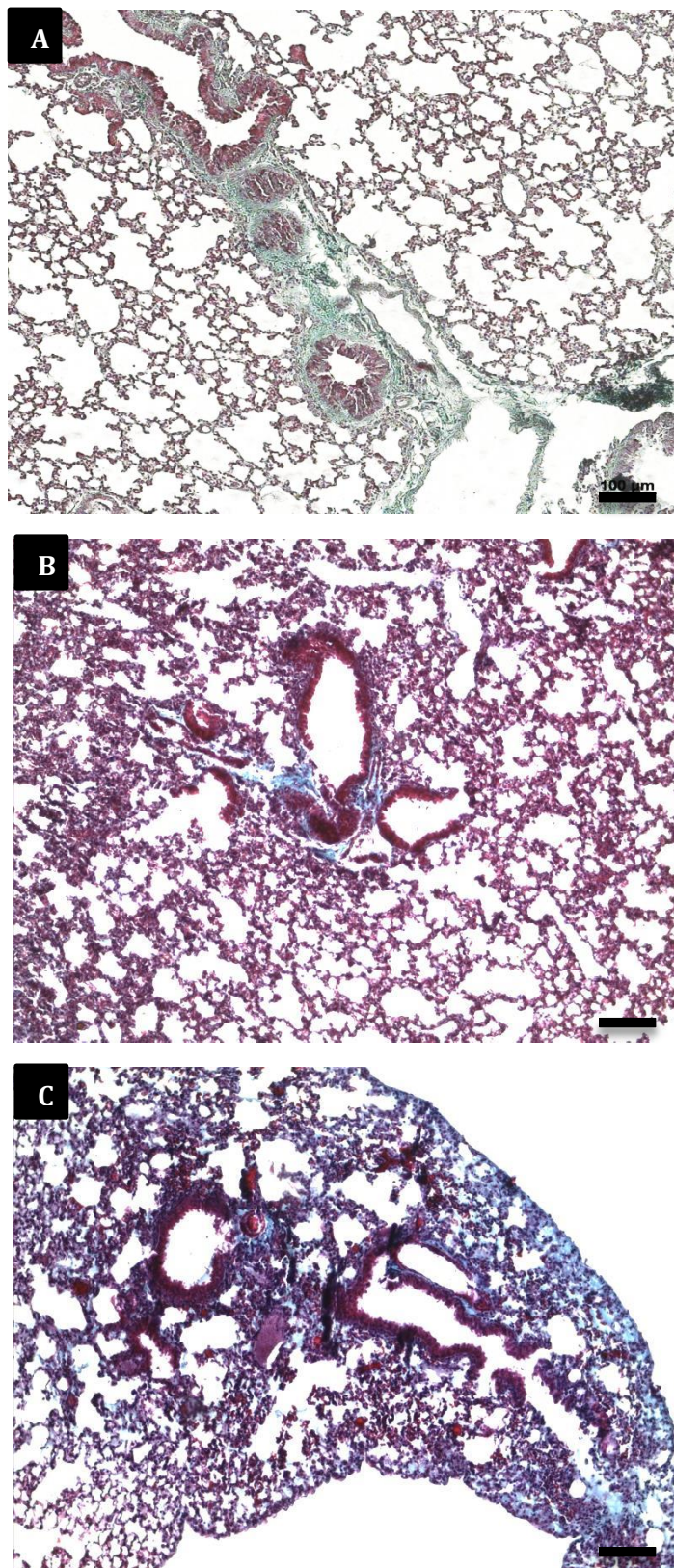


Figura 24. Análise histológica de pulmões murinos corados pela técnica de tricrômico de Gomori. **(A)** Tecido pulmonar de um indivíduo após 7 dias de tratamento com dose 4UI/Kg de bleomicina, via intratraqueal. **(B)** Animal tratado com dose 6UI/Kg de bleomicina, eutanasiado 7 dias após a administração. **(C)** Animal tratado com dose 8UI/Kg, 4 dias após a administração. Barras: 100 μ m.

A concentração 6UI de bleomicina /Kg tornou-se então a candidata ideal, pois além do fato dos animais terem apresentado os sintomas esperados, pode-se traçar um perfil de evolução da doença baseando-se nos dados histológicos (figura 25): após quatro dias, o tecido alveolar está repleto de infiltrados linfocitários, sugerindo a ocorrência de um processo inflamatório (figura 25B – asterisco branco); no sétimo dia já é possível verificar um espessamento das estruturas alveolares (figura 25C). Nestas condições, o animal que sobreviveu mais tempo morreu no 21º dia após a administração de bleomicina. Diante disso, os animais foram tratados com esta dose de fármaco para a realização dos experimentos seguintes.

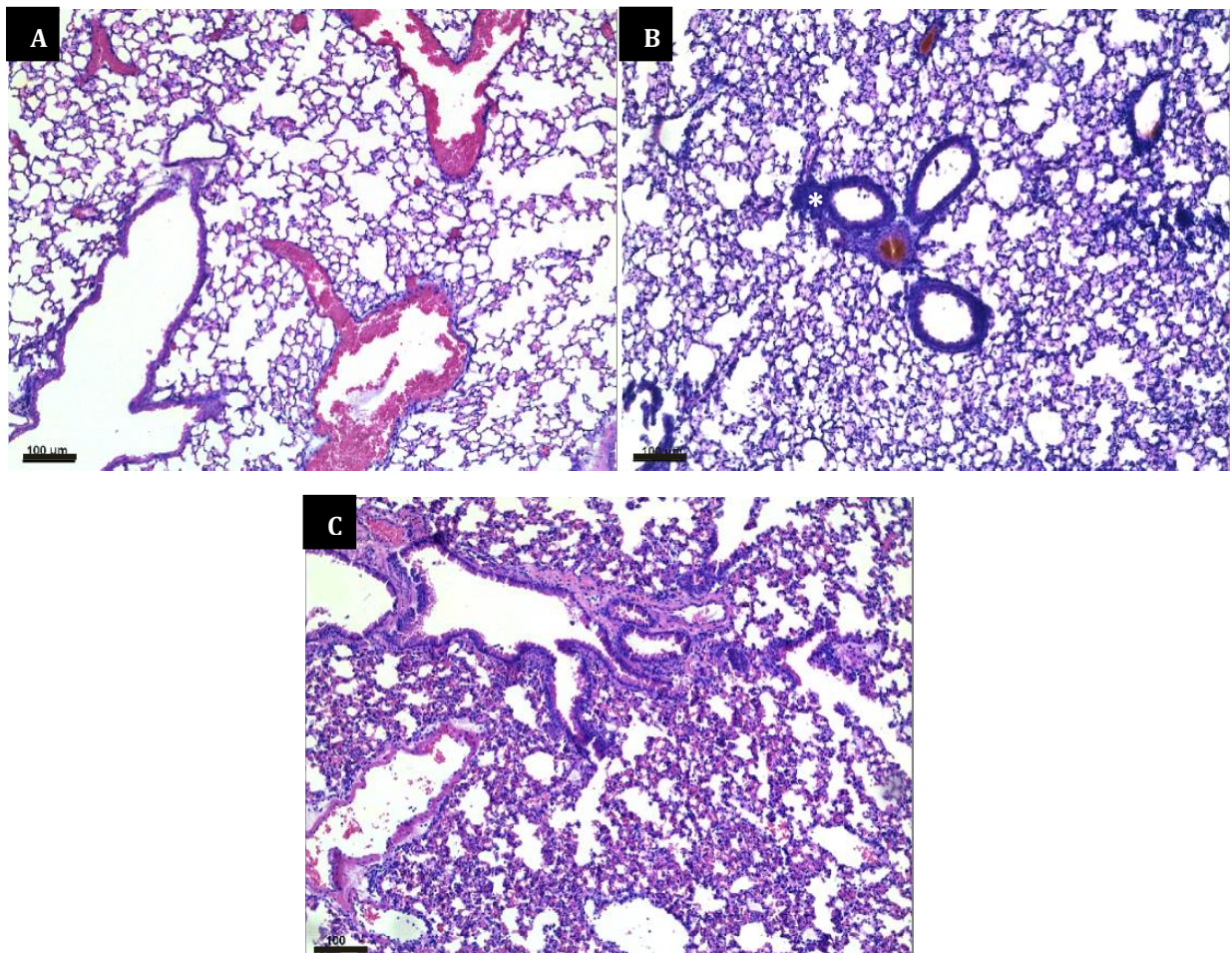


Figura 25. Análise histológica de pulmões murinos corados com Hematoxilina e Eosina. **(A)** tecido pulmonar de um indivíduo controle, saudável, que não recebeu bleomicina. **(B)** tecido pulmonar de animal tratado com dose 6UI/Kg de bleomicina, eutanasiado 4 dias após a administração. Foram observados infiltrados linfocitários no local, indicados pelo asterisco branco. **(C)** tecido pulmonar de animal tratado com dose 6UI/Kg de bleomicina, eutanasiado 7 dias após a administração. Barras: 100µm.

4.2.2. Verificação da migração de pdCTMs em resposta à fibrose pulmonar

Foi possível encontrar pdCTMs marcadas com Fe-DMSA nos pulmões de animais tratados pelas duas vias de inoculação, sugerindo-se que estas migram em resposta à fibrose pulmonar. Entretanto, cabe ressaltar que se observou uma quantidade maior de células em camundongos tratados por instilação intranasal, nos quais grande parte das pdCTMs estava próxima a bronquíolos (figura 26). Além disso, quando inoculadas pela veia caudal, muitas pdCTMs permaneceram retidas nos linfonodos associados aos pulmões (figura 27).

Interessante mencionar ainda que dois fatores sugerem que inoculação de pdCTMs via intranasal tenha maior potencial terapêutico em comparação à via intravenosa: 1) foi observado que as estruturas alveolares dos animais, quando tratados por instilação intranasal, permaneciam inalteradas (figura 28 A e B), em contraste ao outro grupo experimental, no qual pode-se detectar trechos de tecido pulmonar saudável alternados com trechos fibróticos (figura 28 C e D). 2) ao final do tratamento (dia 7), houve uma perda significativa de peso em animais tratados pela veia caudal, o que não ocorreu com animais “controle” ou nos animais tratados por instilação nasal (tabela 1 e figura 29).

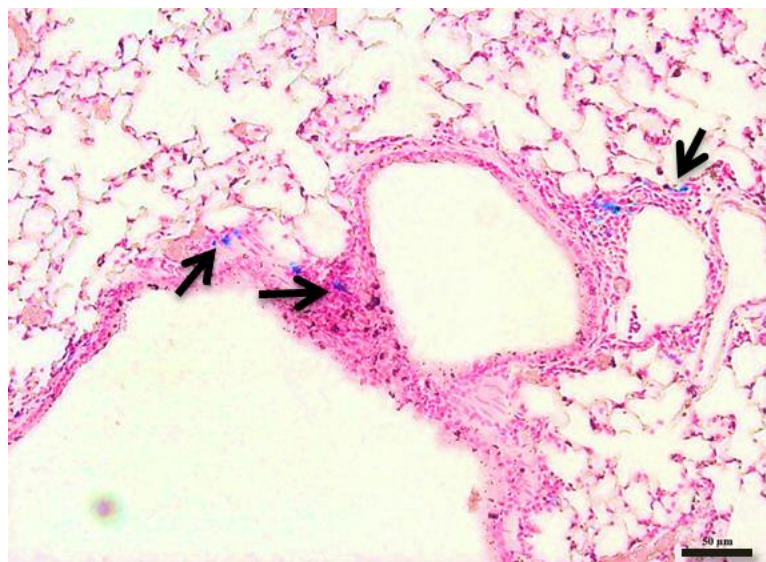


Figura 26. Análise histológica de pulmões murinos, corados pela técnica de Azul da Prússia e contracolorados com vermelho neutro. Os animais receberam administração intratraqueal de bleomicina (6UI/Kg) e, 24 horas depois, foram tratados intranasalmente com 5.10^5 pdCTMs marcadas com Fe-DMSA. Algumas das células presentes no tecido pulmonar estão evidenciadas em azul (setas pretas). Barra: 50 μ m.

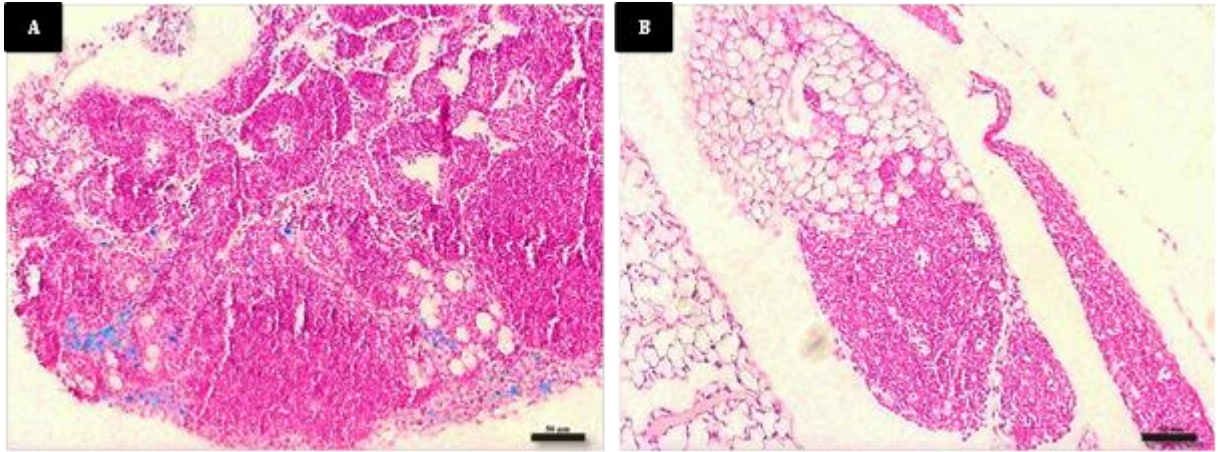


Figura 27. Análise histológica de linfonodos murinos associados aos pulmões, corados pela técnica de Azul da Prússia e contracorados com vermelho neutro. Os animais receberam administração intratraqueal de bleomicina (6UI/Kg) e foram tratados intravenosamente **(A)** ou intranasalmente **(B)** com 5×10^5 células-tronco mesenquimais/animal. Barra: 50 μm .

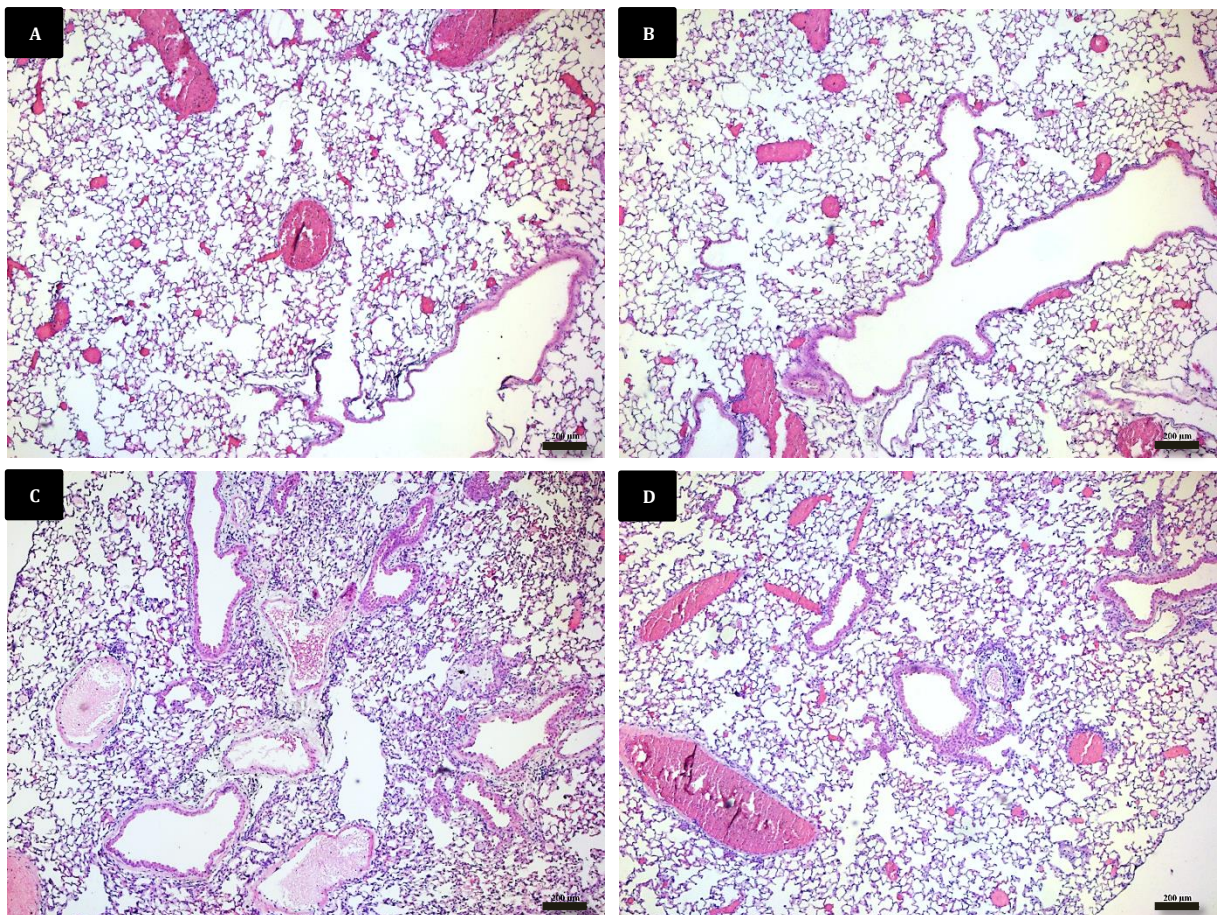


Figura 28. Análise histológica de pulmões murinos, corados com hematoxilina e eosina. Os animais receberam administração intratraqueal de bleomicina (6UI/Kg) e, 24 horas após, foram tratados intranasalmente **(A)** e **(B)** ou intravenosamente **(C)** e **(D)** com 5×10^5 células-tronco mesenquimais/animal. Barra: 200 μm .

Tabela 1. Monitoramento dos pesos dos camundongos durante o tratamento com bleomicina e pdCTMs, por duas rotas de administração: intravenosa e intranasal. Foram escolhidos 4 animais para cada grupo experimental, de modo randômico. No dia 1, administrou-se 50 µl do fármaco diluído a 6UI/Kg, ou de solução fisiológica estéril (grupo controle saudável), por instilação intratraqueal. No dia 2, inoculou-se 5×10^5 pdCTMs nos animais dos grupos “CTMs venosa” e “CTMs nasal”. O peso dos animais também foi mensurado no dia seguinte (dia 3) à inserção das células e 24 horas antes destes serem eutanasiados (dia 7).

Grupo experimental	Animal	Medidas de pesos (g)			
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 7
Controle saudável: animais não tratados com bleomicina que não desenvolveram fibrose pulmonar.	A	25,95	23,91	22,99	26,02
	B	27,9	27,12	27,82	28,32
	C	30,9	29,07	30,22	29,84
	D	24,9	24,2	25,24	26,21
	Média	27,4125	26,075	26,5675	27,5975
	Desvio Padrão	2,6364	2,46745	3,13423	1,8225
Controle fibrose: animais tratados com bleomicina e que desenvolveram fibrose pulmonar.	E	27,29	26,76	26,15	28,68
	F	27,83	25,98	23,36	20,36
	G	27,86	24,58	24,32	23,06
	H	26,31	24,3	24,74	23
	Média	27,3225	25,405	24,6425	23,775
	Desvio Padrão	0,72403	1,16452	1,15915	3,50395
CTM venosa: animais que desenvolveram fibrose pulmonar e foram tratados com pdCTMs via intravenosa.	I	27,8	25,93	24,46	23,05
	J	25,76	24,4	25,37	26,43
	K	28,62	27,44	26,88	25,55
	L	29,42	26,81	25,82	20,5
	Média	27,9	26,145	25,6325	23,8825
	Desvio Padrão	1,57251	1,31789	1,00583	2,67112
CTM nasal: animais que desenvolveram fibrose pulmonar e foram tratados com pdCTMs via intranasal.	M	29,79	27,36	27,24	28,43
	N	28,59	27,9	27,92	28,98
	O	27,53	25,86	26,12	28,9
	P	30,56	27,21	26,73	27,05
	Média	29,1175	27,0825	27,0025	28,34
	Desvio Padrão	1,3331	0,86719	0,76404	0,89357

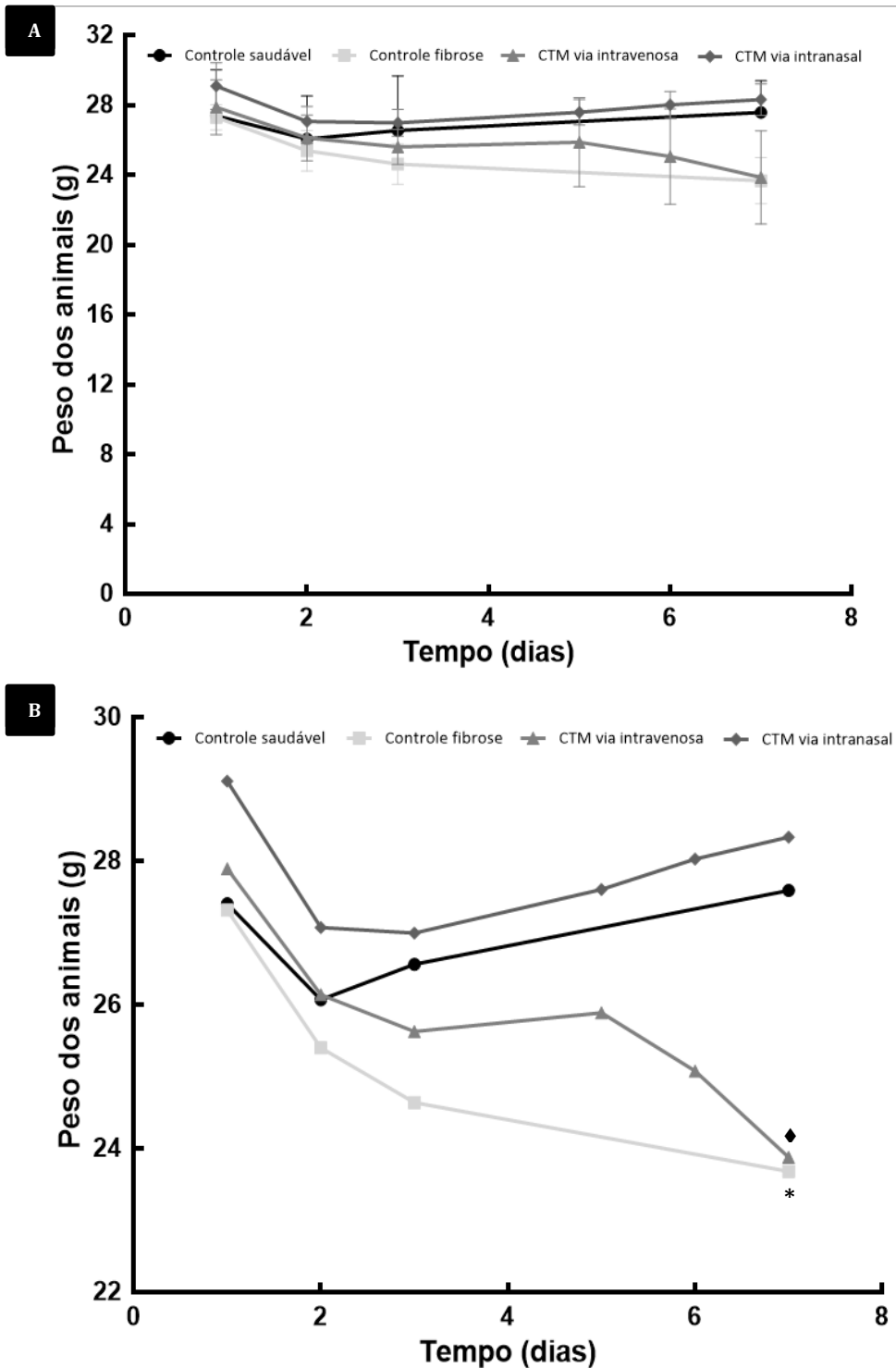


Figura 29. Monitoramento dos pesos dos camundongos durante o tratamento com bleomicina e pdCTMs, por duas rotas de administração: intravenosa e intranasal. **(A)** Os dados se referem às médias e desvios-padrão dos pesos dos animais ao longo dos dias de tratamento (n=4). **(B)** Os valores foram submetidos aos testes de normalidade e, em seguida a uma análise individualizada pelo teste T-student. (*) Houve uma redução significativa da média do grupo “controle fibrose”, em comparação ao grupo “controle saudável” ($p < 0,05$). (♦) Houve uma redução significativa da média do grupo “CTM venosa”, em comparação ao grupo “controle saudável” ($p < 0,05$).

4.2.3. Análises em microtomografia computadorizada

Destaca-se primeiramente que os dados obtidos no microtomógrafo reforçaram os que foram obtidos durante as análises histológicas, no que se refere à descrição de perfil da evolução da fibrose pulmonar. A partir da reconstrução das imagens adquiridas, foi possível notar que a região pulmonar (comumente preta, devido à maior presença de ar) foi gradativamente ocupada por porções acinzentadas; sugerindo-se dessa forma o espessamento alveolar decorrente da ação da bleomicina (figura 30). Um dia após a administração de bleomicina (figuras 30A e 30 B), o pulmão do animal tratado ainda é bastante semelhante ao do animal controle; entretanto, a partir do terceiro dia (figuras 30C e 30D), diferenças começam a surgir, as quais tornam-se bem visíveis ao sétimo dia (figuras 30G e 30H).

Diante disso, estas imagens foram analisadas qualitativamente no software CTAnalyzer: dados de frequência de valores na escala de cinza foram obtidos de modo a verificar se houve diferenças significativas entre pulmões saudáveis e pulmões fibróticos em cada tempo de análise (figura 31 e tabela 2). Observa-se na figura 31 que as curvas que representam os animais com fibrose pulmonar (linha vermelha) deslocam-se para a direita; o que significa que os índices estão tendendo para o cinza (que representa tecidos conjuntivos, no caso) e se afastando do preto (que representa o ar contido nos alvéolos).

Este fato está representado na tabela 2, a qual mostra que a média dos índices cresce (tende mais para o cinza) com o passar do tempo em animais tratados com bleomicina. Por fim, a análise estatística pelo teste não paramétrico qui-quadrado, indicou um aumento estatisticamente significativo da média dos índices de cinza nos animais com fibrose, em relação ao grupo controle, no sétimo dia de análise.

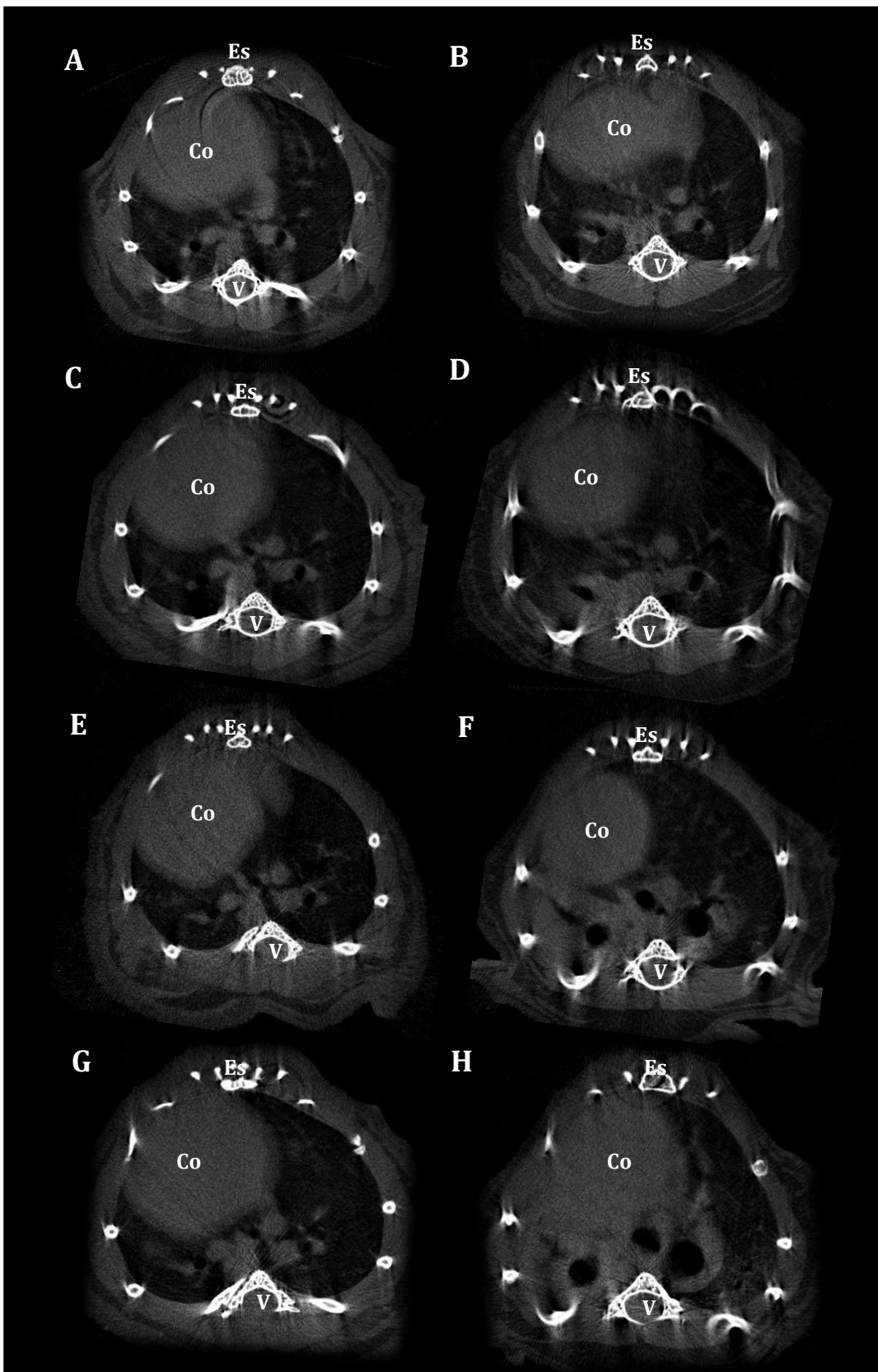


Figura 30. Análise em microtomografia computadorizada. As imagens mostram secções transversais, na altura da sexta costela, de camundongos saudáveis (A,C,E,G) e de camundongos com fibrose pulmonar (B,D,F,H). Os animais foram analisados 1 (A e B), 3 (C e D), 5 (E e F) e 7 (G e H) dias após a administração de bleomicina. Co: coração ; V: vértebra; Es: osso esterno.

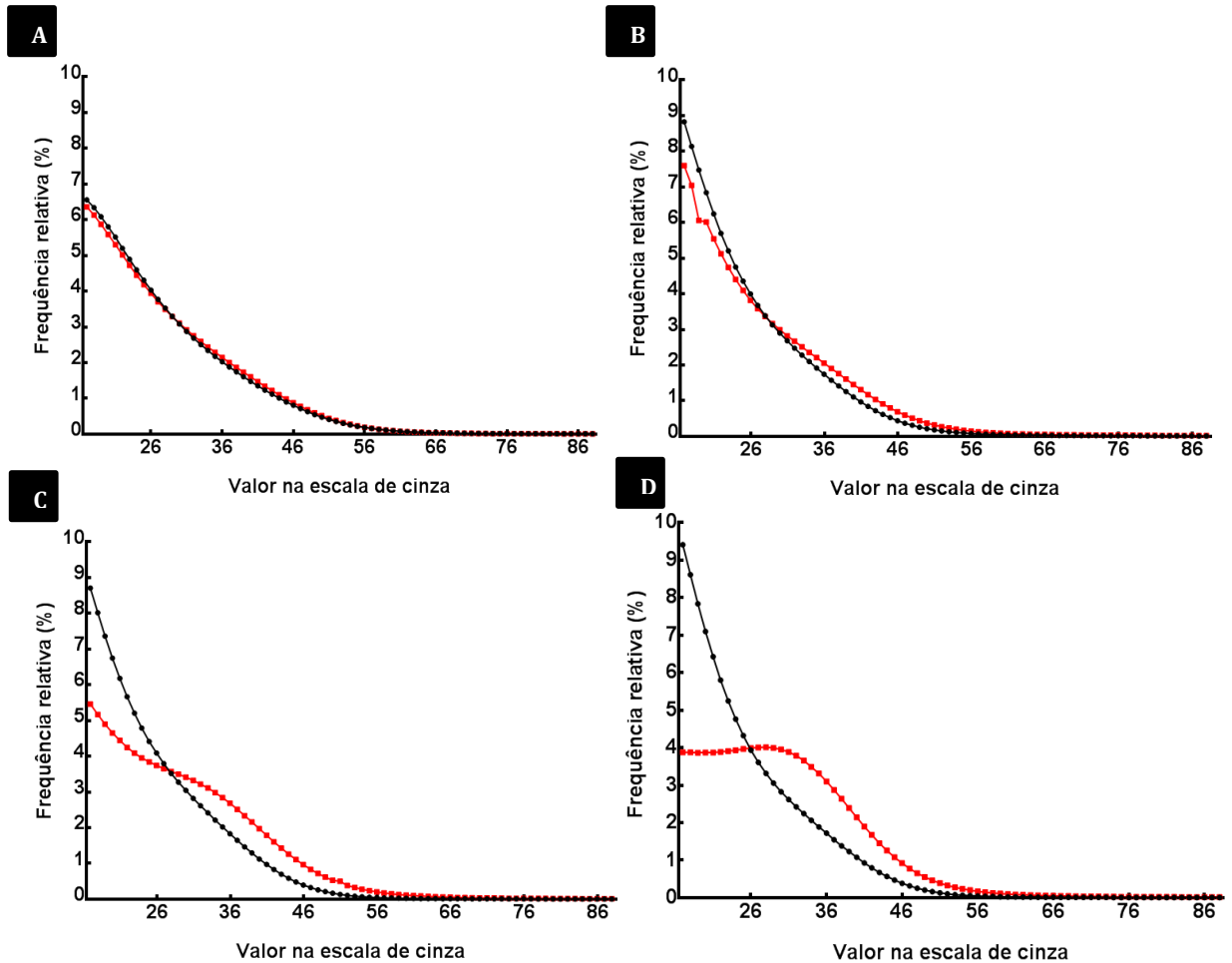


Figura 31. Análise de dados de microtomografia computadorizada no software CT Analyser. Os gráficos representam o perfil de frequência de valores na escala de cinza em imagens tridimensionais dos pulmões de animais saudáveis (linha preta) e de animais com fibrose pulmonar (linha vermelha). Os animais foram analisados 1 (A), 3 (B), 5 (C) e 7 (D) dias após a administração de bleomicina/solução salina.

Tabela 2. Análise de dados de microtomografia computadorizada no software CT Analyser. Os dados representam a a média dos índices de cinza em imagens tridimensionais de pulmões murinos saudáveis ou com fibrose. Houve diferença estatística entre os dois grupos no sétimo dia de análise.

Média dos índices de cinza		
Tempo (dias)	Animal Saudável	Animal com fibrose pulmonar
1	26,150	26,484
3	26,230	27,845
5	26,024	29,756
7	25,666	30,429

Em seguida, realizou-se um teste piloto no qual tubos tipo *ependorf* contendo precipitados de 10^6 pdCTMs “controle”; ou marcadas com Fe-DMSA (exposição à 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas); ou marcadas com Au-DMSA (exposição à 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas) foram submetidos à análise em micro-CT para verificar se, nas concentrações testadas, ambas as nanopartículas geram contraste adequado no equipamento (figura 32). Os parâmetros de aquisição e reconstrução de imagens foram ajustados de modo semelhante aos utilizados em análises de camundongos. Para fins de calibração, um *ependorf* contendo água atuou como controle, sendo que o sinal gerado pelo líquido foi considerado então como 0 (zero) Hounsfield (HU) (figura 24A).

Os valores obtidos em escala Hounsfield, para cada amostra, foram: pdCTMs controle 284,70 HU (figura 32B); pdCTMs com Fe-DMSA 408,62 HU (figura 32C); e pdCTMs com Au-DMSA 352,79 HU (figura 32D).

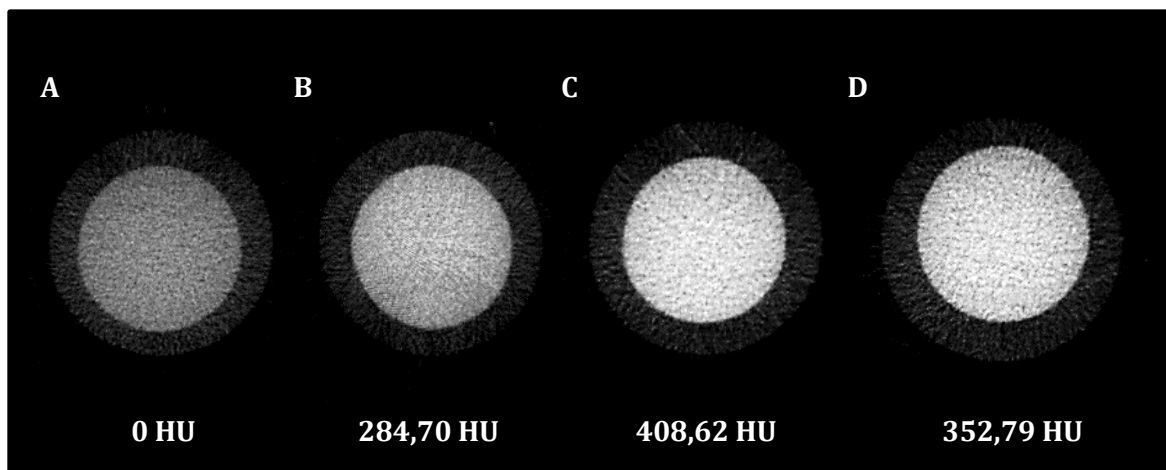


Figura 32. Análise de precipitados de pdCTMs em microtomógrafo Sky-Scan 1640. Estão representadas acima secções transversais das amostras em tubos tipo *ependorf* para mensuração destas em unidades Hounsfield. **(A)** água **(B)** pdCTMs não marcadas. **(C)** pdCTMs marcadas com Fe-DMSA. **(D)** pdCTMs marcadas com Au-DMSA.

Apesar do Au-DMSA e do Fe-DMSA terem gerado um contraste visível nas imagens dos precipitados de pdCTMs (conforme representado acima), as células marcadas por ambas as nanopartículas não foram detectadas pelo equipamento após sua inoculação nos camundongos, em quaisquer tempos de análise (figura 33 e figura 34). Cabe destacar ainda, na figura 34, que houve a progressão da fibrose pulmonar

apesar do animal representado na imagem ter sido tratado com pdCTMs marcadas com Au-DMSA.

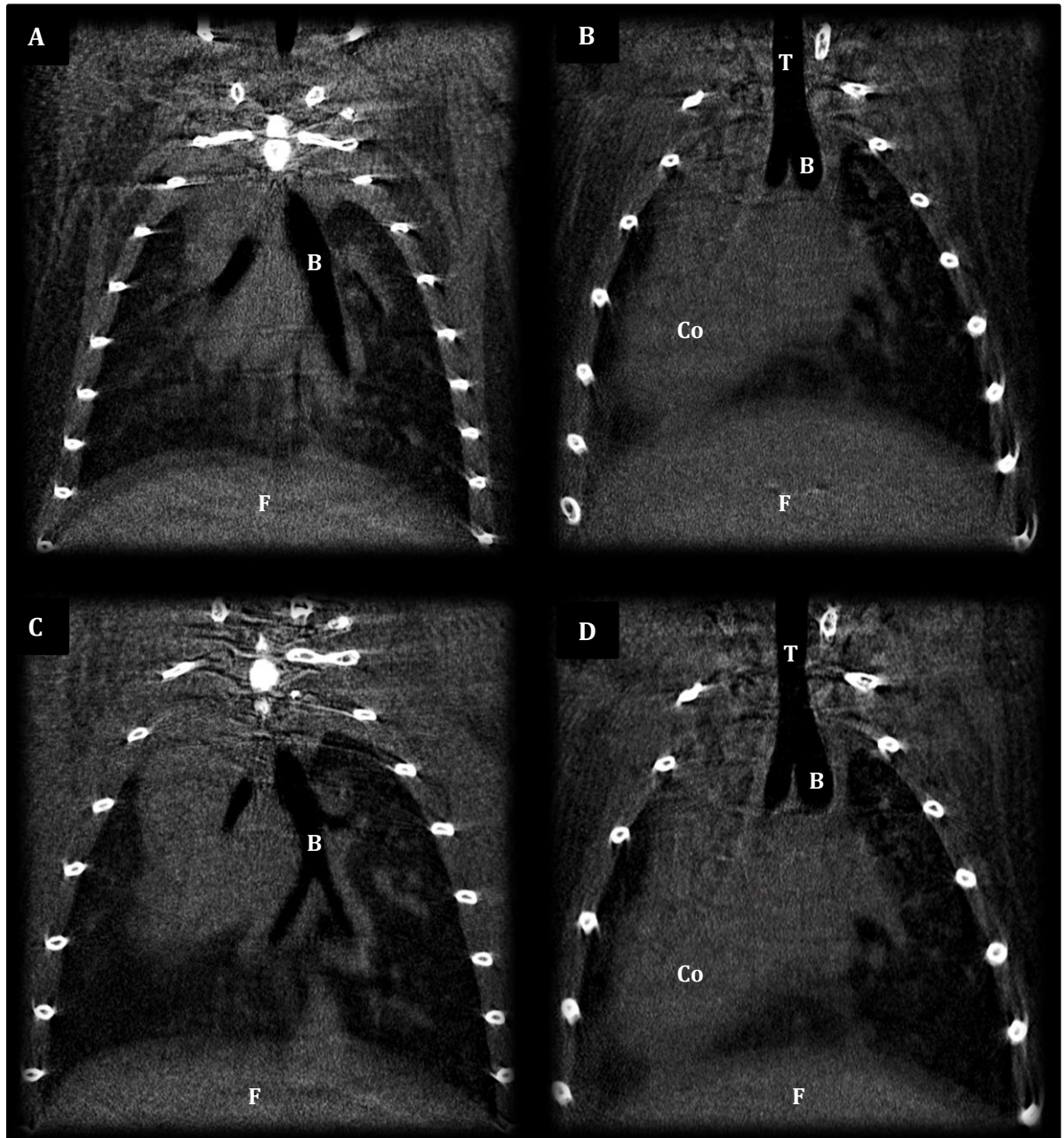


Figura 33. Análise em microtomografia computadorizada. As imagens mostram secções longitudinais de camundongos saudáveis (A,C) e de camundongos com fibrose pulmonar, nos quais foram inoculadas 10^6 pdCTMs marcadas com Fe-DMSA (B,D). Os animais foram analisados logo após a administração intranasal das células-tronco (A,B) e sete dias após a inoculação (C,D). B: brônquio; Co: coração ; F: fígado; T: traquéia.

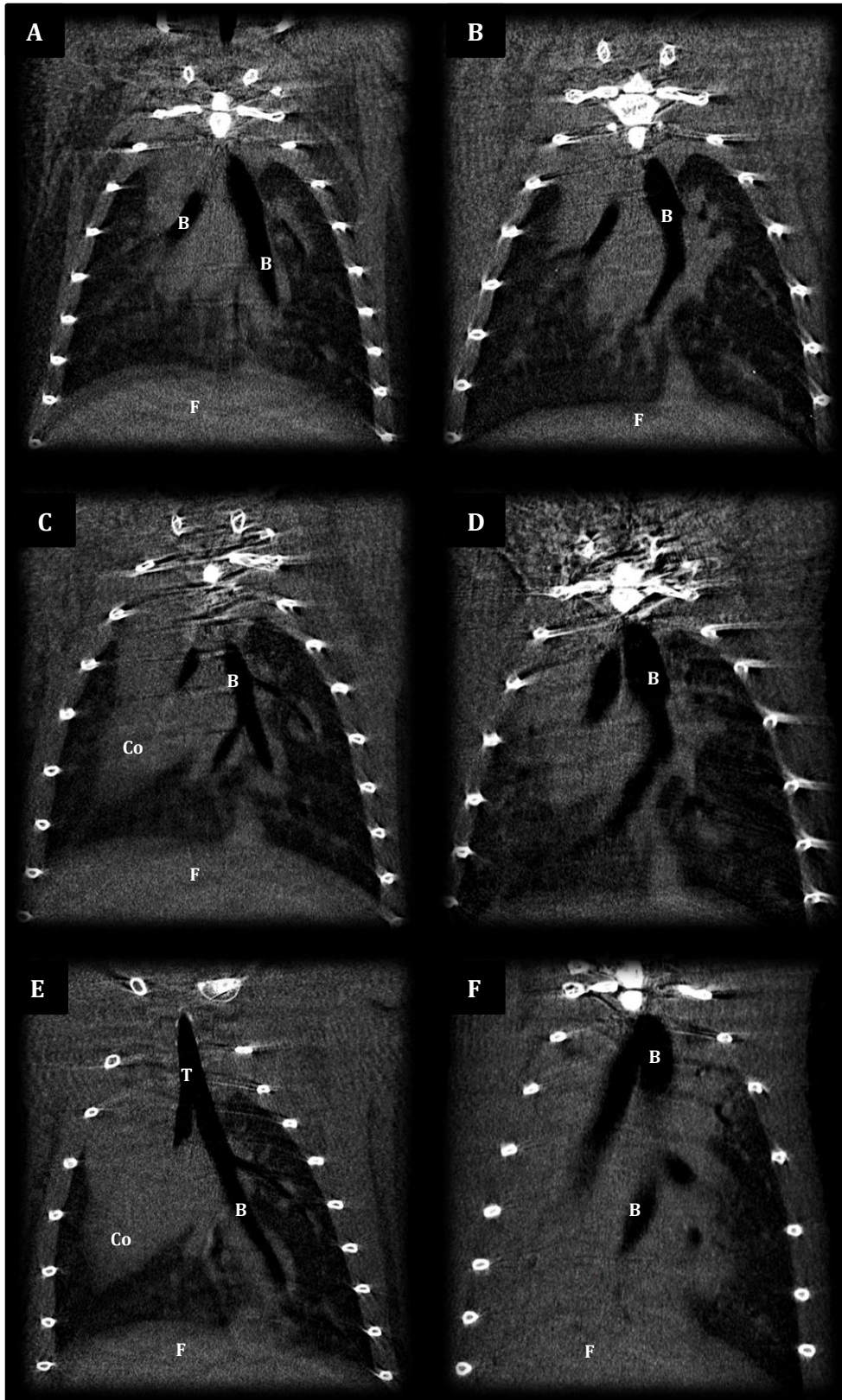


Figura 34. Análise em microtomografia computadorizada. As imagens mostram secções longitudinais de camundongos saudáveis (A,C,E) e de camundongos com fibrose pulmonar, nos quais foram inoculadas 10^6 pdCTMs marcadas com Au-DMSA (B,D,F). Os animais foram analisados logo após a administração intranasal das células-tronco (A,B), cinco dias (C,D) e sete dias após a inoculação (E,F). B: brônquio; Co: coração ; F: fígado; T: traquéia.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DA TOXICIDADE *IN VITRO* DAS NANOPARTÍCULAS

5.1.1. Nanopartículas Fe-DMSA

Tem sido relatado que as nanopartículas de óxido de ferro (Fe-NPs) em geral têm boa biocompatibilidade com células-tronco, sendo extensivamente utilizadas para marcação e rastreamento destas por meio da ressonância magnética. Os dados dos ensaios de MTT e de azul de tripan, realizados no presente trabalho, demonstram a ausência de efeitos citotóxicos das nanopartículas Fe-DMSA sobre células-tronco mesenquimais humanas (CTMs), corroborando, portanto, com os resultados descritos por outros trabalhos⁹⁶.

Entretanto, conforme mencionado no item (1.3.2), uma vez no citoplasma, o óxido de ferro catalisa uma série de reações de oxidação de biomoléculas, aumentando a velocidade da geração de radicais livres, os quais provocam severos danos às células^{76,77}. Esta contradição é solucionada levando-se primeiramente em consideração o que fora discutido por Li *et al*¹²⁸, em sua mais recente revisão: as modificações químicas de superfície são um dos fatores que torna tais nanopartículas, em um material mais seguro para aplicações biológicas. Segundo os autores, a toxicidade de uma Fe-NP baseia-se, sobretudo, na estabilidade que seu agente de revestimento tem em meio de cultura ou no ambiente celular; se a cobertura da nanopartícula é facilmente degradada, o núcleo metálico estará então livre para reagir com biomoléculas próximas. Os riscos das Fe-NPs à saúde se manifestam, portanto, quando seus revestimentos se degradam.

A credibilidade sobre esta hipótese aumenta quando, ao analisar artigos que relatam efeitos tóxicos provocados por Fe-NPs, verifica-se que foram utilizadas nanopartículas “nuas”, sem revestimento^{129,130}.

Baseando-se ainda nesta hipótese, cabe destacar o trabalho de Auffan *et al* (2006), os quais analisaram a citotoxicidade de nanopartículas de maghemita, também revestidas por DMSA, em fibroblastos dermais humanos¹³¹. O grupo não observou sinais significativos de citotoxicidade nas células expostas às nanopartículas, diluídas a 10 e 100 µg/mL, durante 24 horas de exposição. Diante do resultado encontrado, concluiu-se que o revestimento de DMSA, por ser dificilmente removido da nanoestrutura (diferente

do dextrano ou a albumina, por exemplo), preveniu o contato direto das células com o ferro, portanto, “protegendo-as” de possíveis efeitos tóxicos.

Outra observação feita no relato de Auffan *et al* pode também explicar a biocompatibilidade entre Fe-DMSA e células receptoras. Verificou-se que as maiores concentrações testadas, 10 e 100 µg/mL (semelhantes às utilizadas no presente trabalho), levaram a um aumento moderado, mas estatisticamente significativo na atividade metabólica mitocondrial após 24 e 48 horas de exposição. Paralelamente, concentrações menores proporcionavam reduções da viabilidade celular. Este fato foi relacionado com o aumento de tamanho dos agregados no interior das vesículas endossomais dos fibroblastos incubados com maiores teores de Fe-DMSA, levando a um menor contato das nanopartículas com as células.

Por fim, tem sido discutido na literatura que outro fator determinante da baixa toxicidade observada em Fe-NPs seria a sua atividade *peroxidase-like*, ou seja, estas nanopartículas desempenham uma atividade enzimática mimética semelhante à encontrada em peroxidases naturais¹³²⁻¹³⁴. Do ponto de vista químico, esta atividade *peroxidase-like* se origina principalmente a partir de íons ferrosos na superfície da Fe-NP: os íons Fe²⁺/Fe³⁺ em solução (reagente de Fenton) são conhecidos por catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio. Além disso, cabe ressaltar que algumas enzimas peroxidases, assim como seus miméticos, contêm Fe²⁺ ou Fe³⁺ nos seus centros de reação¹³².

Ao associar esta informação ao contexto da marcação de células com Fe-NPs, destaca-se primeiramente o estudo de Huang *et al* (2009), os quais incubaram CTMs com uma Fe-NP disponível comercialmente, o Ferucarbotran⁷⁵. Foi verificado que, devido à atividade *peroxidase-like*, os níveis de peróxido de hidrogênio H₂O₂ nas CTMs foram drasticamente reduzidos após 1 h de incubação com o Ferucarbotran; diante disso os autores sugeriram uma correlação entre o declínio de H₂O₂ intracelular e o aumento das taxas de proliferação das hMSCs que fora observado no estudo.

Em seguida, destaca-se o relato de Chen *et al* (2012), que testaram a atividade *peroxidase-like* de nanopartículas de maghemita revestidas por DMSA (γ -Fe₂O₃), semelhantes às Fe-DMSA utilizadas aqui, e de Fe-NPs constituídas por magnetita (Fe₃O₄)¹³⁴. Os autores demonstraram que, dependendo do diferente microambiente intracelular em que as Fe-NPs estão localizadas, mais especificamente do grau de acidez nestes locais, suas atividades enzimáticas miméticas se alteram. Quando localizadas nos

lisossomos, organelas cujo pH é mais baixo, ambas as Fe-NPs aumentaram drasticamente o dano celular induzido por H_2O_2 através da atividade da *peroxidase-like*, tendo em vista que houve a produção de radicais hidroxilo (OH^\cdot). Importante mencionar que as Fe-NPs de maghemita aparentaram ser seguras, uma vez que produzem uma quantidade relativamente menor os radicais hidroxilo, em comparação com às de magnetita, em condições ácidas.

Por outro lado, quando as Fe-NPs estavam localizadas em um ambiente neutro, similar ao citoplasma, não foi observada a produção dos radicais hidroxilo, mas houve a quebra direta do H_2O_2 em H_2O e O_2 , através de uma atividade *catalase-like*. Em suma, de acordo com Chen *et al* a atividade *peroxidase-like* das Fe-NPs não é benéfica e estratégias devem ser traçadas a fim de evitar que Fe-NPs não se acumulem nos lisossomos das células receptoras.

De acordo com as imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), grande parte do Fe-DMSA interiorizado localiza-se nas mitocôndrias das pdCTMs, organelas de pH neutro. Baseando-se neste raciocínio, as Fe-DMSA não poderiam exercer efeitos tóxicos à célula. Além disso, poucas nanopartículas foram visualizadas em estruturas semelhantes a lisossomos.

5.1.2. Nanopartículas Au-DMSA

O ouro é conhecido por suas propriedades ópticas exclusivas, que atraíram o interesse de grupos de pesquisa para o uso deste em aplicações biomédicas, como marcação e rastreamento de células e tumores por exemplo. A princípio, considerava-se seguro o uso deste metal amarelo, que à primeira vista parece quimicamente inerte; entretanto, algumas pesquisas têm demonstrado que, em escala nanométrica, o ouro pode exercer efeitos tóxicos sobre células receptoras^{108,135-138}. Sendo assim, nanopartículas de ouro (Au-NPs) precisam ser examinadas quanto à biocompatibilidade e aos possíveis impactos ambientais, antes destas serem fabricadas em grande escala para uso *in vivo*¹³⁹.

Diante do exposto, verificou-se neste trabalho que houve diferença estatística significativa entre CTMs não marcadas e CTMs marcadas com Au-DMSA, de acordo com os testes com o reagente MTT. Pelo menos 80% das células permaneceram viáveis nos grupos experimentais, um valor bem menor se comparado às células expostas ao Fe-

DMSA. Estes dados, portanto, sugerem efeitos sobre a atividade mitocondrial das CTMs receptoras, que podem ter como origem as seguintes possibilidades: 1) tamanho da partícula; 2) carga de superfície; 3) modificações na química de superfície e 4) tipo celular analisado. Fatores estes que já foram discutidos por Liu *et al*¹²⁸, como determinantes da citotoxicidade provocada por Au-NPs em geral.

Ao aplicar os fatores mencionados acima em uma possível explicação acerca dos efeitos da Au-DMSA sobre as CTMs, descarta-se logo a primeira possibilidade; Pan *et al* (2007), ao expor Au-NPs de vários tamanhos em fibroblastos dermais, verificaram que aquelas de diâmetro entre 1,4 e 2 nm exerciam maiores efeitos tóxicos, por ligarem-se de modo irreversível às moléculas de DNA nuclear e mitocondrial¹³⁷. Tendo em vista que estas dimensões são muito menores em comparação aos 40 nm da Au-DMSA, desconsidera-se, no presente trabalho, os efeitos do tamanho da Au-DMSA sobre a citotoxicidade observada nas CTMs.

As cargas de superfície também têm impacto sobre a citotoxicidade de Au-NPs. Schaeublin *et al* (2011), incubaram células de queratinócitos humanos (HaCaT) com três Au-NPs de cargas de superfície positivas, negativas e neutras¹⁴⁰. Primeiramente, o grupo verificou que o valor de DL50 (a concentração letal média) das Au-NPs carregadas foi 10 µg/mL, enquanto que, da Au-NPs neutras, 25 µg/mL. Além disso, foi observado um estresse mitocondrial significativo, devido à diminuição do potencial de membrana mitocondrial e dos níveis intracelulares de Ca²⁺, apenas nas células que receberam Au-NPs carregadas; tais efeitos não foram observados naquelas incubadas com Au-NPs neutras.

Ainda sobre o efeito das cargas de superfície, cabe destacar o relato de Goodman *et al* (2004), que investigaram a toxicidade de Au-NPs aniônicas e catiônicas de 2 nm sobre células COS-1 e eritrócitos¹⁴¹. Este estudo mostra que as partículas de carga positiva são moderadamente tóxicas, enquanto que as partículas negativas não são tóxicas (DL 50_{catiônicas} = 0,197 µg/mL; DL 50_{aniônicas} ≅ 1,452 µg/mL). Interessante mencionar que o mecanismo de toxicidade das Au-NPs catiônicas, proposto pelos autores, está relacionado com as suas interações com a membrana celular, mediadas pela sua forte atração eletrostática com a bicamada carregada negativamente. Diante disso, de acordo com este estudo, desconsideram-se os efeitos da carga negativa das Au-DMSA sobre a citotoxicidade observada nas CTMs no presente trabalho. Entretanto,

investigações futuras sobre o impacto da Au-DMSA sobre o potencial de membrana mitocondrial devem ser realizadas.

O terceiro fator que modula a citotoxicidade de Au-NPs, de acordo com Liu *et al*¹²⁸, são as modificações na química de superfície. A uma escala macroscópica, o ouro é conhecido por ser quimicamente inerte e resistente à oxidação; entretanto, quando o tamanho das partículas atinge dimensões nanométricas, dá-se origem a uma superfície reativa, que muitas vezes induzem danos oxidativos às células receptoras^{142,143}. Conseqüentemente, torna-se essencial modificar a superfície quimicamente ativa da Au-NP, revestindo o núcleo metálico com uma cobertura que mantenha-se estável em meio de cultura ou no ambiente celular, de modo semelhante às Fe-NPs, e proteja as células do contato direto com o metal.

Conforme discutido anteriormente, a escolha do DMSA como agente de revestimento proporciona proteção às células receptoras à medida que este é dificilmente degradado e removido da nanoestrutura¹³¹. Sendo assim, não há o contato entre as biomoléculas celulares e a porção reativa da Au-DMSA. Diante do exposto, desconsidera-se por enquanto os efeitos das modificações na química de superfície das Au-DMSA sobre a citotoxicidade observada nas pdCTMs no presente trabalho. Investigações futuras sobre a produção de ROS em CTMs marcadas com Au-DMSA também serão conduzidas a fim de reforçar essa afirmação.

O último fator que pode modular a citotoxicidade da Au-DMSA é o tipo celular escolhido para ser marcado com esta nanopartícula. Diversas investigações recentes têm analisado a marcação de várias linhagens de células animais com Au-NPs e têm-se observado diferentes efeitos citotóxicos de acordo com o tipo celular empregado^{108,144,145}. Por exemplo, Zhang *et al* (2011) incubaram macrófagos murinos RAW 264.7, durante 24 horas, com Au-NPs de 60nm¹⁴⁴. Os autores verificaram a formação de um grande número de vacúolos intracelulares, com Au-NPs agrupadas em seu interior; entretanto, não foram observados sinais de citotoxicidade (de acordo com testes com o reagente MTT) nem o aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, nos intervalos de tempo investigados. Já no relato de Mironava *et al* (2010), houve um acúmulo semelhante de Au-NPs em grandes vacúolos no citoplasma de fibroblastos dermais humanos; entretanto, houve a indução da toxicidade¹⁰⁸. Depois de expostos às Au-NPs, as células cresceram lentamente e não houve expressão de proteínas da matriz extracelular; além disso, a presença dos vacúolos comprometeram o

citoesqueleto, prejudicando a contração celular e a motilidade necessária para a proliferação. Cabe destacar que, em ambos os trabalhos, foram utilizadas Au-NPs de tamanho semelhante, com revestimento de citrato e diluídas em concentrações próximas (entre 0,1 e 50 µg/mL).

Diante dos relatos de Zhang *et al* e Mironava *et al*, sugere-se que algumas linhagens celulares são mais sensíveis à presença das Au-NPs que outras. Importante mencionar, portanto, alguns relatos da literatura que descrevem efeitos decorrentes da marcação de células-tronco mesenquimais com Au-NPs. Em 2009, Fan *et al* analisaram a biocompatibilidade entre Au-NPs solúveis em água (funcionalizadas com citrato) e células-tronco mesenquimais de medula óssea humana (moCTMs)¹⁴⁶. Os autores verificaram que ambas as Au-NPs (de 15 e 30 nm) testadas tiveram baixa toxicidade sobre as moCTMs: células incubadas com 71,1 µg/mL de Au-NPs, durante 24 horas, apresentaram mais de 80% de atividade mitocondrial relativa; valor este muito próximo aos dados obtidos no presente trabalho. Houve também um aumento (de aproximadamente 1,5 vezes) do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS), sugerindo-se que a endocitose de Au-NPs levou as moCTMs receptoras à morte celular por necrose.

Em 2011, Fan *et al* realizaram um novo estudo sobre biocompatibilidade entre moCTMs e Au-NPs, analisando novos efeitos da marcação com as nanopartículas¹³⁶. Neste trabalho, a concentração de Au-NPs (20 nm) que leva a 80% de atividade mitocondrial relativa das moCTMs (DL20) obtida foi 20.0 µM, ou 3,94 µg/mL. Valor este muito menor se comparado às concentrações 52, 70 e 130 µg/mL, testadas no presente trabalho. Cabe mencionar que, neste relato, os autores observaram que a viabilidade de moCTMs depende do tamanho das Au-NPs (semelhante ao descrito por Pan *et al*¹³⁷).

Ainda em 2011, Ricles *et al* testaram a biocompatibilidade entre CTMs e três Au-NPs, de diferentes diâmetros– 20, 40 e 60 nm⁷¹. Os testes com o reagente MTT indicaram uma redução significativa (em comparação ao grupo controle) do número de CTMs viáveis, quando expostas às Au-NP de 20 e 60 nm, durante 24 horas. Cabe ressaltar que as Au-NPs de 40 nm (tamanho semelhante ao das Au-DMSA utilizadas no presente trabalho), não exerceram efeitos tóxicos sobre as células.

No presente trabalho, as CTMs testadas seguiram o mesmo padrão de atividade mitocondrial relativa que as células analisadas por Fan *et al* em 2009. Este fato corrobora com o último fator modulador de citotoxicidade, discutido por Liu *et al*: as CTMs, como as analisadas no presente trabalho, apresentam uma sensibilidade natural

às Au-NPs. Em outras palavras, os efeitos tóxicos observados não estão relacionados às características da Au-DMSA, mas sim a mecanismos celulares característicos das CTMs que as tornam mais ou menos vulneráveis aos efeitos da marcação.

Por fim, cabe destacar que a figura 4B - que representa a recuperação da viabilidade celular de pdCTMs, 48 e 72 horas após a exposição ao Au-DMSA - ilustra o fenômeno *cellular recovery*, descrito inicialmente por Miranova *et al* (2010). Os danos provocados às células receptoras pelas Au-NPs não são permanentes; verificou-se que após a interrupção da exposição as nanopartículas, os níveis citoplasmáticos de ouro diminuem e, conseqüentemente, a célula recupera totalmente as estruturas e/ou as funções celulares alteradas^{108,147}. O *cellular recovery* ocorre apesar do ouro não poder ser metabolizado pelas células receptoras (diferentemente do óxido de ferro, por exemplo).

5.2 EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS SOBRE A FISIOLOGIA DAS CTMs

Têm sido descrito na literatura que nanopartículas interagem ativamente com receptores celulares localizados na membrana plasmática - por exemplo, o EGFR (receptor do fator de crescimento epitelial) e as integrinas - modulando algumas vias de transdução de sinal e induzindo fenótipos celulares, tais como a proliferação, a apoptose, diferenciação e migração¹⁴⁸. Os efeitos prejudiciais decorrentes das alterações das vias de comunicação celular não podem ser detectados apenas por ensaios gerais de viabilidade, afinal, a presença de nanopartículas nas células pode interferir em outras funções. Sendo assim, o presente trabalho investigou os efeitos das nanopartículas metálicas revestidas por DMSA sobre a fisiologia das CTMs receptoras, especificamente, sobre o crescimento celular, sobre a supressão linfocitária e sobre a multipotência destas células.

Primeiramente, é importante destacar que este foi o primeiro trabalho que investigou o efeito de nanopartículas sobre a capacidade anti-proliferativa das CTMs. Nas concentrações testadas, tanto o Fe-DMSA quanto o Au-DMSA não alteraram esta propriedade intrínseca das células, essencial para o sucesso de terapias celulares; como por exemplo, a fibrose pulmonar.

5.2.1. Indução de diferenciação

Na seção 4.1.3.1 (Teste de indução de diferenciação das CTMs), verificou-se que houve diferenciação adipogênica nos grupos experimentais e no grupo controle, não havendo diferença significativa na quantidade de Oil Red O incorporado entre os grupos. Da mesma forma, a diferenciação osteogênica ocorreu tanto em CTMs marcadas, quanto nas não marcadas. As CTMs incubadas com o Fe-DMSA não apresentaram aumento ou redução tanto da adipogênese, quanto da osteogênese, corroborando com trabalhos publicados anteriormente por outros grupos⁹². Entretanto, houve uma redução, porém não significativa, da osteogênese das CTMs após a marcação com o Au-DMSA, de acordo com o ensaio de mensuração da atividade da enzima fosfatase alcalina.

O fato das Au-DMSA terem suprimido a osteogênese teve grande destaque, tendo em vista que muitos trabalhos na literatura descrevem o estímulo que Au-NPs exercem sobre a diferenciação osteogênica e mineralização^{71,149,150}. Cabe mencionar primeiramente o relato de Yi *et al* (2010), os quais incubaram CTMs murinas com Au-NPs (20 nm) diluídas a $1,97 \times 10^{-4}$ µg/mL – muito menor que concentração de Au-DMSA testada aqui, 90 µg/mL – e observaram que as Au-NPs promoveram a super-expressão de genes relacionados à diferenciação osteogênica¹⁴⁹. Os autores destacaram ainda as imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e evidências de super-regulação de integrinas; dados que sugerem a interação entre Au-NPs, membrana celular e proteínas citoplasmáticas, interferindo assim, com certas vias de sinalização celular. Ambos os processos resultam em um estresse mecânico sobre às CTMs, levando à ativação da via de sinalização p38 MAPK, que por sua vez desencadeia o aumento da regulação de genes pró-osteogênese e infra-regulação de genes pró-adipogênese.

No relato mais recente de Zhang *et al* (2014), concluiu-se que Au-NPs podem promover significativamente a proliferação de osteoblastos murinos, aumentando a atividade da ALP, e aumentando o número de nódulos ósseos e teor de cálcio *in vitro*¹⁵⁰. Além disso, a expressão de genes relacionados à morfogênese do esqueleto (BMP-2, Runx-2, OCN e Col-1) foi super-regulada na presença de AuNPs. Vale ressaltar que as nanopartículas também foram diluídas a $1,97 \times 10^{-4}$ µg/mL e que Au-NPs de 20 nm foram mais eficientes que Au-NPs de 40 nm em regular as atividades dos osteoblastos. Por fim, as Au-NPs aumentaram o nível de fosforilação ERK / ERK total, o que sugere novamente os impactos destas sobre a via de sinalização MAPK.

De modo semelhante ao presente trabalho, Fan *et al*^{136,146} verificaram que tanto a atividade de ALP quanto a deposição de cálcio foram significativamente inibidas pela adição de Au-NPs, em comparação com grupos controle. Ao discutirem os resultados obtidos em 2011, os autores afirmaram que seus dados estavam desacordo com os de Yi *et al*¹⁴⁹ e a provável causa seria a exposição das CTMs a maiores concentrações de Au-NPs: entre 1,8 a 18 µg/mL no estudo de 2011; entre 7,1 e 71,1 µg/mL, em 2009. Segundo o grupo, os maiores teores de Au-NPs provocaram efeitos citotóxicos causados pelo estresse oxidativo, que reprimiram tanto a diferenciação osteogênica quanto a adipogênica.

Semelhante ao descrito por Fan *et al*, o relato mais recente de Mironava *et al* (2014) também destaca a supressão da atividade adipogênica em CTMs de tecido adiposo (adCTMs), após a marcação destas com Au-NPs¹⁴⁷. Cabe ressaltar que houve uma redução significativa entre a adipogênese em adCTMs marcadas com Au-NPs a 13 nm em comparação às células expostas às Au-NPs de 45 nm (dimensões próximas ao Au-DMSA); fato que foi explicado pelos autores como consequência do aumento da transcrição do gene DLK1, que codifica uma proteína transmembranar envolvida na inibição da diferenciação adipogênica. Verificou-se que os níveis de DLK1 em adCTMs expostas às Au-NPs de 13 nm eram maiores que nas expostas as de 45 nm. Cabe destacar que estes utilizaram concentrações mais baixas de Au-NPs que as testadas aqui: 20 µg/mL. Outros dados da literatura também corroboram com estes resultados^{71,146,149}.

No caso das Au-DMSA, no presente estudo, é possível deduzir que a redução da osteogênese possa, de fato, ter sido causada pelos altos teores de Au-DMSA utilizados para a marcação das pdCTMs. Além do fato dos nossos dados terem apresentado um comportamento muito semelhante a dos apresentados por Fan *et al*, a concentração analisada pelo grupo em 2009 - 71,1 µg/mL - foi a mais próxima (dentre todos os trabalhos analisados) da que foi testada aqui - 90 µg/mL. Porém, sugere-se aqui que o mecanismo responsável pela inibição não seja o estresse oxidativo, mas sim o fato destas nanopartículas se agregarem em vacúolos, conforme sugerido por Mironava *et al* (2014)¹⁴⁷: além dos agregados reduzirem muito a superfície de contato entre nanopartícula e célula (diminuindo a superfície reativa), o fato destes serem endocitados e aprisionados em vacúolos dificulta o processo de ativação da via de sinalização celular MAPK, neste caso. Mesmo motivo pelo qual não houve redução da atividade adipogênica nas CTMs marcadas com as Au-DMSA, diferente do descrito por

Mironava *et al.* Apesar disso, não está descartada a possibilidade de realizar um ensaio de análise de produção de ROS a fim de confirmar a hipótese de Fan *et al* (2011).

5.2.2. Verificação da proliferação de CTMs marcadas

Em 2009, Huang *et al* descreveram os efeitos indutivos que o Ferucarbotran (uma Fe-NP disponível comercialmente) exerceram sobre o crescimento de moCTMs humanas⁷⁵. No entanto, os dados obtidos aqui no presente estudo estão em desacordo com o trabalho deste grupo; visto que não houve diferenças significativas entre o crescimento de pdCTMs marcadas com Fe-DMSA e pdCTMs controle. A discordância entre nossos dados e as conclusões de Huang *et al* tem origem em três fatores: 1) os tempos de proliferação analisados; 2) os tempos de exposição às Fe-NPs e 3) as propriedades químicas das nanopartículas testadas.

Primeiramente, Huang *et al* contaram as células marcadas e células controle (por exclusão de azul-tripán, semelhante ao método descrito aqui) apenas no tempo “1 dia” ; entretanto, no presente estudo, as pdCTMs foram contadas 02, 04, 06, 08 e 10 dias após incubação ao Fe-DMSA. Este fato nos remete ao que fora discutido por Mironava *et al* (2010), que afirmam que grande parte dos grupos de pesquisa têm focado apenas nos efeitos a curto prazo das nanopartículas sobre as células, ao invés das consequências a longo prazo as quais, de fato, podem afetar a função celular geral¹⁰⁸. Diante disso, devido ao delineamento experimental feito no presente estudo foi possível rejeitar uma hipótese (“as Fe-DMSA poderiam também estimular a proliferação das CTMs”) baseada no resultado apresentado por Huang *et al*.

Além disso, cabe mencionar que enquanto as pdCTMs foram incubadas com o Fe-DMSA durante 24 horas para a realização deste experimento, Huang *et al* expuseram suas moCTMs ao Ferucarbotran por apenas uma hora. Apesar de o grupo ter escolhido concentrações maiores de Fe-NPs (100 e 300 µg/mL), a rápida exposição pode ter como consequência um menor número de nanopartículas interiorizadas; o que já é um fator determinante, conforme discutido anteriormente, da viabilidade celular e, por sua vez, das taxas de proliferação.

Por fim, de acordo com Huang *et al*, os mecanismos celulares responsáveis estímulo da proliferação de moCTMs marcadas são: 1) a atividade *peroxidase-like* intrínseca do Ferucarbotran, que reduz as taxas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

intracelular ; e 2) Íons Ferro libertados pela degradação lisossomal (oriundos da Fe-NP) aceleram a progressão do ciclo celular. Apesar das diferenças entre os dois estudos, estes fatores propostos pelos autores fornecem informações valiosas sobre o que possa ter ocorrido nas pdCTMs marcadas com Fe-DMSA. Por exemplo, os testes de análise de ciclo celular realizados por Huang *et al* foram realizados utilizando-se a concentração de 300 µg/mL, quase 4 vezes maior que a testada aqui; a excesso de ferro no interior das células receptoras certamente levou a um aumento citoplasmático do íon livre, fato que não ocorreu no presente estudo, a 80 µg/mL. Assim, o Fe-DMSA, na concentração testada, não poderia modular o ciclo celular, promovendo a proliferação.

Por outro lado, houve um aumento significativo da quantidade de pdCTMs marcadas com Au-DMSA no segundo dia após a incubação. Esse resultado está em desacordo com o que fora descrito por Mironava *et al* (2014), que mediram a proliferação em culturas de adCTMs¹⁴⁷. Os autores inicialmente expuseram as células, durante 72 horas, às Au-NPs (45 nm) diluídas em meio de cultivo a 13, 20 e 26 µg/mL; em seguida, verificou-se que as taxas de proliferação foram menores em todas as amostras, em comparação ao grupo controle. Cabe destacar que as adCTMs expostas à concentração 26 µg/mL, praticamente não cresceram após o período de incubação. Tendo em vista que não foram observados rompimentos das fibras de actina nestas adCTMs, os autores sugerem outros fatores que poderiam ser responsáveis pela inibição da proliferação celular: como alterações da sinalização de integrina e da organização da matriz extracelular.

A diferença mais notável entre o presente estudo e o trabalho de Mironava *et al*, foi o tempo em que as CTMs foram expostas às Au-NPs: 24 e 72 horas, respectivamente. É importante mencionar que estes autores têm como objetivo observar efeitos a longo prazo e o *recovery* em diferentes linhagens celulares marcadas com Au-NPs e, para isso, realizam estudos nos quais as células testadas são expostas durante três ou até seis dias com as nanopartículas; destacando-se assim, os efeitos citotóxicos decorrentes da incubação durante longos tempos.

Sendo assim, a exposição das pdCTMs tanto ao Fe-DMSA quanto ao Au-DMSA, durante 24 horas tem se mostrado segura. Demonstrada a biocompatibilidade, nestas condições, entre células e nanopartículas, segue-se adiante no presente estudo, de modo a verificar a eficiência destes materiais em produzir sinais detectáveis pelo microtomógrafo.

5.3 ENSAIOS *IN VIVO*

Este foi o primeiro trabalho no qual se tentou utilizar nanopartículas de óxido de ferro como traçadores para rastreamento *in vivo* de células-tronco, utilizando-se uma técnica de diagnóstico por imagem diferente da ressonância magnética (RM). Apesar de biocompatíveis, as nanopartículas Fe-DMSA interiorizadas pelas pdCTMs não foram detectadas pelo microtomógrafo, em quaisquer tempos de análise. Tendo em vista que o ferro tem número atômico menor em comparação aos agentes de contraste comumente utilizados, deduzia-se que de fato não fosse possível utilizar as Fe-DMSA como marcadores para visualização *in vivo* por microtomografia computadorizada (MTC).

Entretanto, Rahn *et al* (2014) descreveram recentemente a MTC como ferramenta para detecção e quantificação de Fe-NPs em tecidos tumorais; após uma terapia minimamente invasiva baseada no direcionamento magnético destas nanopartículas conjugadas a fármacos¹⁵¹. A quantificação de ferro foi possível mediante calibração do equipamento com *phantoms* (constituídos por tecido biológico e concentrações conhecidas de Fe-NPs), cujos valores na escala de cinza foram aplicados em uma curva de calibração, que pode ser utilizada em conjuntos de dados tomográficos. Importante destacar que as concentrações de Fe-NPs testadas para a elaboração desta curva variavam de 1 a 35 mg/mL, muito mais altas que a quantidade de Fe-DMSA presente no conjunto de pdCTMs marcadas, antes de sua inoculação no animal (0,017 mg). A detecção não depende do número atômico do ferro, como se pensava; mas sim da concentração de ferro presente na amostra a ser analisada. Diante dos limites de concentração detectáveis pelo equipamento, torna-se difícil portanto visualizar e rastrear uma única CTM marcada, ou um pequeno grupo delas, por meio da MTC; afinal, é difícil obter-se tamanha concentração de Fe-DMSA por célula sem prejudica-las.

Por outro lado, já fora descrita o rastreamento *in vivo*, por MTC, de células marcadas com Au-NPs^{68,106}; apesar disso, não foi possível neste estudo visualizar as nanopartículas Au-DMSA que foram interiorizadas pelas pdCTMs. A fim de explicar este fato, comparou-se o presente trabalho com o relato de Menk *et al* (2011) sendo possível então destacar algumas informações¹⁰⁶:

1) Inoculou-se entre $5 \cdot 10^5$ e 10^6 pdCTMs marcadas nos camundongos analisados aqui, enquanto que, em Menk *et al*, foram 10^7 células. De acordo com os dados dos autores, em um *pellet* de CTMs administradas em um animal havia aproximadamente

332 µg de ouro, uma quantidade de marcador detectável pelo equipamento. No presente trabalho, este valor foi de apenas 10^6 células. Há ainda a possibilidade do Au-DMSA ter proporcionado contraste às células, mas não o suficiente para distingui-las do tecido conjuntivo associado aos brônquios ou ao próprio tecido fibrótico. Sendo assim, sugere-se aqui que um número maior de células marcadas seja utilizado.

2) No presente trabalho, foi utilizado um aparelho de microtomografia tradicional, o qual baseia-se apenas em efeitos de absorção. Em outras palavras, o contraste nas imagens é inteiramente devido às diferenças nas propriedades de absorção de raios X dentro do objeto analisado. Isto provoca problemas quando tecidos biológicos moles são fotografados, pois as pequenas diferenças de absorção de raios-x resultam em baixo contraste de imagem¹⁵². No trabalho de Menk et al, utilizaram-se dois equipamentos de microtomografia - o TOMOLAB e o SYRMEP - ambos conectados a uma fonte de radiação síncrotron, produzida no laboratório ELLETRA (Itália). Estes equipamentos realizam a aquisição de imagens por meio da técnica de contraste de fase e difração, resultando em imagens com forte valorização do contraste e com aumento da visibilidade de detalhes finos e pequenos, como células marcadas com Au-NPs, por exemplo¹⁵³. A diferença entre os aparelhos de MTC utilizados, portanto, podem ser uma causa para a discrepância entre nossos resultados e os de Menk *et al*.

Importante mencionar também que houve a progressão da fibrose pulmonar em um animal que foi inoculado com pdCTMs marcadas com Au-DMSA, fato que contradiz o que fora demonstrado pelas análises histológicas realizadas anteriormente: o sucesso terapêutico das pdCTMs na atenuação da evolução da fibrose pulmonar, quando administradas pela via intranasal. Um fator que pode explicar tal fato é a possibilidade das Au-DMSA terem interferido na capacidade migratória das pdCTMs - há relatos na literatura que associam a marcação de CTMs (e outras linhagens celulares) com Au-NPs com a inibição da migração *in vitro* destas células^{147,154}. Cabe destacar que, nas análises histológicas do presente trabalho, as pdCTMs migraram efetivamente para o sítio da lesão e estavam marcadas com Fe-DMSA (figura 26). Torna-se importante, portanto, investigar futuramente se CTMs marcadas com Au-DMSA chegam efetivamente aos pulmões fibróticos, o que pode ser feito por rastreamento *in vivo* em detectores de fluorescência ou por análises histológicas em microscopia de fluorescência, baseando-se nas propriedades óticas do Au-DMSA.

Apesar do resultado obtido nos ensaios *in vivo* não ter sido o que se esperava, o presente trabalho resultou no estabelecimento de novos protocolos e técnicas que podem ser utilizados em futuras pesquisas. Primeiramente, cabe destacar que realizou-se aqui, pela primeira vez, a instilação intratraqueal não-cirúrgica de bleomicina para indução de fibrose pulmonar. Utilizando-se cateteres intravenosos como sondas intratraqueais, exclui-se o trato respiratório superior, no qual respostas imunes podem ser iniciadas¹⁵⁵ de modo a prejudicar a ação da bleomicina nos pulmões; e evita-se a morte prematura dos animais devido ao procedimento cirúrgico. Embora este método permita a entrega efetiva do fármaco para os pulmões, ele exige treinamento extensivo e validação.

Utilizou-se aqui pela primeira vez células-tronco mesenquimais oriundas da polpa dental em modelos de fibrose pulmonar, nos quais geralmente tem sido testadas CTMs de medula óssea³⁴. Recentemente, La Noce *et al* (2014) afirmaram que, apesar de seu potencial, de poucos ensaios clínicos utilizando-se estas CTMs foram relatados, inclusive em estudos relacionados à reconstrução de tecidos ósseos¹⁵⁶. Demonstrou-se aqui a ação imunomodulatória destas CTMs e sua eficácia na atenuação da progressão da fibrose pulmonar; e sugere-se, portanto, o uso destas em estudos relacionados a doenças pulmonares.

Por fim, destaca-se também a instilação intranasal como via de administração de células-tronco em modelos de doenças do sistema respiratório. Importante mencionar que esta técnica é comumente utilizada como via de acesso ao sistema nervoso central, em estudos que analisam migração de CTMs para tumores ou sítios lesionados na região cerebral¹⁰⁶. No presente trabalho, verificou-se CTMs marcadas em abundância e uma eficácia terapêutica maior, em comparação aos animais que receberam CTMs intravenosamente. Diante disso, a administração de CTMs por instilação intranasal é uma alternativa promissora para o tratamento de fibrose pulmonar idiopática, tendo em vista que as células migram mais facilmente e diretamente para os alvéolos injuriados.

5.4 PERSPECTIVAS

As nanopartículas metálicas Au-DMSA e Fe-DMSA, conforme descrito no presente trabalho, não tiveram um bom desempenho como traçadores de pdCTMs quando analisadas em um aparelho de microtomografia. Entretanto, ambas ainda podem ser

exploradas em outras modalidades de imagiologia; a Fe-DMSA pode ser visualizada por ressonância magnética e a Au-DMSA, por ultrassonografia e detecção *in vivo* de fluorescência. Além disso, por serem funcionalizadas com DMSA, outras moléculas podem ser conjugadas às nanopartículas de modo a otimizar o rastreamento *in vivo*, como substâncias fluorescentes ou radioativas.

Apesar de todos os testes *in vitro* realizados no presente trabalho sugerirem a biocompatibilidade entre o Au-DMSA/Fe-DMSA e as pdCTMs, testes de detecção de espécies reativas de oxigênio, de alteração de potencial de membrana mitocondrial e de indução de diferenciação condrogênica *in vitro* (discutidos acima) serão realizados no futuro a fim de confirmar por completo que estes materiais são seguros para uso em células-tronco. Estes testes, inclusive poderão oferecer novas possibilidades de uso das Au-DMSA e Fe-DMSA.

Em relação aos testes *in vivo*, demonstrou-se aqui o potencial da administração intranasal de células-tronco para o tratamento da fibrose pulmonar. No futuro, os mesmos experimentos serão repetidos com um número maior de animais por grupo experimental, visando corroborar os resultados aqui apresentados e, além disso, esclarecer e descrever os mecanismos terapêuticos – quantas células migram aos pulmões lesionados; a possibilidade das CTMs se diferenciarem em células pulmonares para reparo tecidual; qual a parcela das CTMs que atingem o sistema nervoso central, mesmo após a indução da fibrose.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados alcançados, pode-se concluir que as nanopartículas Au-DMSA e Fe-DMSA não são bons traçadores para rastreamento *in vivo* células-tronco mesenquimais por microtomografia computadorizada. Embora assegurado, em termos de biocompatibilidade, o uso de Fe-DMSA e Au-DMSA como marcadores de pdCTMs, estas não foram detectadas pelo equipamento, nas concentrações testadas.

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

1. Nas concentrações testadas, as nanopartículas de ferro e ouro funcionalizadas com DMSA não exerceram efeitos sobre CTMs de polpa dental humana;
2. Ambas as nanopartículas foram eficientemente interiorizadas pelas pdCTMs;
3. Não houve alterações nas funções celulares das pdCTMs aqui analisadas: capacidade de diferenciação, proliferação *in vitro* e inibição de linfócitos T.
4. As pdCTMs, marcadas com Fe-DMSA, migram efetivamente para tecidos pulmonares lesionados, em um modelo murino de fibrose pulmonar por administração intratraqueal de bleomicina;
5. A administração intranasal de células-tronco, em um modelo murino de fibrose pulmonar, apresentou potencial terapêutico.
6. As nanopartículas interiorizadas pelas pdCTMs, não estavam em concentração suficiente para emitir sinais detectáveis pelo microtomógrafo, impossibilitando a visualização e o rastreamento *in vivo*.

Tomados em conjunto, estes resultados sugerem o uso do Au-DMSA e o Fe-DMSA como marcadores de células-tronco, para visualização e rastreamento *in vivo* em outras modalidades de imagiologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rehen, S. & Paulsen, B. *Células-Tronco: O que são? Para que servem?*. 96 (Vieira e Lent, 2007).
2. Potten, C. S. & Wilson, J. W. in *Essentials Stem Cell Biol.* (Lanza, R. et al.) 17–27 (Academic Press, 2009).
3. Beltrami, A. P. *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763–776 (2003).
4. Weissman, I. L. Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities. *Science* (80-.). **287**, 1442–1446 (2000).
5. Mimeault, M., Hauke, R. & Batra, S. K. Stem cells: a revolution in therapeutics—recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.* **82**, 252–264 (2007).
6. Cowan, C. A. *et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1353–1356 (2004).
7. Wagers, A. J. & Weissman, I. L. Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**, 639–648 (2004).
8. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* **3**, 393–403 (1970).
9. Friedenstein, A. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* **2**, 83–92 (1974).
10. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. & Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **4**, 267–274 (1976).
11. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726–736 (2008).
12. Horwitz, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393–395 (2005).
13. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
14. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313 (2008).

15. Shi, S. & Gronthos, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 696–704 (2003).
16. Sacchetti, B. *et al.* Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell* **131**, 324–336 (2007).
17. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739–2749 (2007).
18. Barlow, S. *et al.* Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **17**, 1095–1107 (2008).
19. Sedgley, C. M. & Botero, T. M. Dental Stem Cells and Their Sources. *Dent. Clin. North Am.* **56**, 549–561 (2012).
20. Ballini, A. *et al.* In vitro stem cell cultures from human dental pulp and periodontal ligament: new prospects in dentistry. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **20**, 9–16 (2007).
21. Nagatomo, K. *et al.* Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.* **41**, 303–310 (2006).
22. Zhang, Q. *et al.* Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J. Immunol.* **183**, 7787–7798 (2009).
23. Tomar, G. B. *et al.* Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 377–383 (2010).
24. Kerkis, I. *et al.* Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells. Tissues. Organs* **184**, 105–116 (2006).
25. Otabe, K. *et al.* Comparison of Gingiva, Dental Pulp, and Periodontal Ligament Cells From the Standpoint of Mesenchymal Stem Cell Properties. *Cell Med.* **4**, 13–21 (2012).
26. Kim, B.-C. *et al.* Osteoblastic/Cementoblastic and Neural Differentiation of Dental Stem Cells and Their Applications to Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Eng. Part B Rev.* **18**, 235–244 (2012).
27. Widera, D. *et al.* Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Dev.* **16**, 447–460 (2007).

28. Da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **119**, 2204–2213 (2006).
29. Reiser, J. *et al.* Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* **5**, 1571–1584 (2005).
30. Rojas, M. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **33**, 145–152 (2005).
31. Xu, J. *et al.* Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**, 291–299 (2007).
32. Tang, J.-M. *et al.* VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovasc. Res.* **91**, 402–411 (2011).
33. Tang, J. *et al.* Combination of chemokine and angiogenic factor genes and mesenchymal stem cells could enhance angiogenesis and improve cardiac function after acute myocardial infarction in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **339**, 107–118 (2010).
34. Akram, K. M., Samad, S., Spiteri, M. & Forsyth, N. R. Mesenchymal Stem Cell Therapy and Lung Diseases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* (2012). doi:10.1007/10_2012_140
35. Nicola, M. Di *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838–3843 (2002).
36. Bartholomew, A. *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* **30**, 42–48 (2002).
37. Yi, T. & Song, S. U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 213–221 (2012).
38. Stewart, D. J. & Mei, S. H. J. Cell-Based Therapies for Lung Vascular Diseases: Lessons for the Future. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **8**, 535–540 (2011).
39. Gross, T. J. & Hunninghake, G. W. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **345**, 517–525 (2001).
40. Moore, B. B. & Hogaboam, C. M. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **294**, L152–L160 (2008).
41. Chilosi, M., Doglioni, C., Murer, B. & Poletti, V. Epithelial stem cell exhaustion in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* **27**, 7–18 (2010).

42. Ortiz, L. A. *et al.* Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8407–8411 (2003).
43. Ortiz, L. A. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11002–11007 (2007).
44. Shimabukuro, D. W., Sawa, T. & Gropper, M. A. Injury and repair in lung and airways. *Crit. Care Med.* **31**, S524–S531 (2003).
45. Yan, X. *et al.* Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1+ mesenchymal stem cell in lung. *Exp. Hematol.* **35**, 1466–1475 (2007).
46. Salazar, K. D., Lankford, S. M. & Brody, A. R. Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **297**, L1002–L1011 (2009).
47. Kotton, D. N. *et al.* Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* **128**, 5181–5188 (2001).
48. Ma, N. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into type II alveolar epithelial cells in vitro. *Cell Biol. Int.* **35**, 1261–6 (2011).
49. Abreu, S. C. *et al.* Bone marrow-derived mononuclear cells vs. mesenchymal stromal cells in experimental allergic asthma. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **187**, 190–8 (2013).
50. Van Velthoven, C. T. J., Kavelaars, A., van Bel, F. & Heijnen, C. J. Nasal administration of stem cells: a promising novel route to treat neonatal ischemic brain damage. *Pediatr. Res.* **68**, 419–22 (2010).
51. Munder, A. *et al.* Acute intratracheal *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis mice is age-independent. *Respir. Res.* **12**, 148 (2011).
52. Cromer Berman, S. M., Walczak, P. & Bulte, J. W. M. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **3**, 343–55 (2011).
53. Frangioni, J. V & Hajjar, R. J. In vivo tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease. *Circulation* **110**, 3378–3383 (2004).
54. Janowski, M., Bulte, J. W. M. & Walczak, P. Personalized nanomedicine advancements for stem cell tracking. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1488–1507 (2012).
55. Gilad, A. A. *et al.* Feasibility of concurrent dual contrast enhancement using CEST contrast agents and superparamagnetic iron oxide particles. *Magn. Reson. Med.* **61**, 970–974 (2009).

56. Edelman, R. R. & Warach, S. Magnetic resonance imaging. *N. Engl. J. Med.* **328**, 708–716 (1993).
57. Bonse, U. *et al.* 3D computed X-ray tomography of human cancellous bone at 8 microns spatial and 10(-4) energy resolution. *Bone Miner.* **25**, 25–38 (1994).
58. Takeuchi, A., Uesugi, K., Takano, H. & Suzuki, Y. Submicrometer-resolution three-dimensional imaging with hard x-ray imaging microtomography. *Rev. Sci. Instrum.* **73**, 4246–4249 (2002).
59. Mizutani, R. & Suzuki, Y. X-ray microtomography in biology. *Micron* **43**, 104–115 (2012).
60. Shofer, S., Badea, C., Auerbach, S., Schwartz, D. A. & Johnson, G. A. A micro-computed tomography-based method for the measurement of pulmonary compliance in healthy and bleomycin-exposed mice. *Exp. Lung Res.* **33**, 169–83
61. Ritman, E. L. Micro-computed tomography of the lungs and pulmonary-vascular system. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 477–480, 501 (2005).
62. Wang, H. *et al.* Computed tomography imaging of cancer cells using acetylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 2979–2988 (2011).
63. Hainfeld, J. F. *et al.* Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions. *Br. J. Radiol.* **84**, 526–533 (2011).
64. Sun, I.-C. *et al.* Heparin-coated gold nanoparticles for liver-specific CT imaging. *Chemistry* **15**, 13341–7 (2009).
65. Cockman, M. D. *et al.* Quantitative imaging of proteoglycan in cartilage using a gadolinium probe and microCT. *Osteoarthr. Cartil.* **14**, 210–214 (2006).
66. Soviero, V. M., Leal, S. C., Silva, R. C. & Azevedo, R. B. Validity of MicroCT for in vitro detection of proximal carious lesions in primary molars. *J. Dent.* **40**, 35–40 (2012).
67. Engelhorn, T. *et al.* In vivo micro-CT imaging of rat brain glioma: A comparison with 3 T MRI and histology. *Neurosci. Lett.* **458**, 28–31 (2009).
68. Astolfo, A. *et al.* In vivo visualization of gold-loaded cells in mice using x-ray computed tomography. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **9**, 284–292 (2013).
69. Greulich, C. *et al.* Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* **7**, 347–354 (2011).
70. Guenoun, J. Cationic Gd-DTPA liposomes for highly efficient labeling of mesenchymal stem cells and cell tracking with MRI. *Cell Transplant.* (2011). doi:10.3727/096368911X593118

71. Ricles, L. M., Nam, S. Y., Sokolov, K., Emelianov, S. Y. & Suggs, L. J. Function of mesenchymal stem cells following loading of gold nanotracers. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 407–416 (2011).
72. Sheikh, A. Y. & Wu, J. C. Molecular imaging of cardiac stem cell transplantation. *Curr. Cardiol. Rep.* **8**, 147–154 (2006).
73. Park, B.-N. *et al.* Early distribution of intravenously injected mesenchymal stem cells in rats with acute brain trauma evaluated by (99m)Tc-HMPAO labeling. *Nucl. Med. Biol.* **38**, 1175–82 (2011).
74. Ferreira, L., Karp, J. M., Nobre, L. & Langer, R. New Opportunities: The Use of Nanotechnologies to Manipulate and Track Stem Cells. *Cell Stem Cell* **3**, 136–146 (2008).
75. Huang, D.-M. *et al.* The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **30**, 3645–3651 (2009).
76. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1–14 (1984).
77. Stohs, S. J. & Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 321–336 (1995).
78. Marquis, B. J., Love, S. A., Braun, K. L. & Haynes, C. L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* **134**, 425–439 (2009).
79. Soenen, S. J. H. & De Cuyper, M. How to assess cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: a technical note using cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol. Imaging* **6**, 153–164 (2011).
80. Díaz, B. *et al.* Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small* **4**, 2025–2034 (2008).
81. Sabuncu, A. C. *et al.* Probing nanoparticle interactions in cell culture media. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **95**, 96–102 (2012).
82. Taboada, 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* **23**, 4583–4588 (2007).
83. Winter, E. M. *et al.* Cell tracking using iron oxide fails to distinguish dead from living transplanted cells in the infarcted heart. *Magn. Reson. Med.* **63**, 817–821 (2010).

84. Chauderge, A. *et al.* Can Magnetic Targeting of Magnetically Labeled Circulating Cells Optimize Intramyocardial Cell Retention? *Cell Transplant.* **21**, 679–691 (2012).
85. Song, M. *et al.* Using a neodymium magnet to target delivery of ferumoxide-labeled human neural stem cells in a rat model of focal cerebral ischemia. *Hum. Gene Ther.* **21**, 603–610 (2010).
86. Yanai, A. *et al.* Focused Magnetic Stem Cell Targeting to the Retina Using Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Cell Transplant.* **21**, 1137–1148 (2012).
87. Jasmin, . *et al.* Optimized labeling of bone marrow mesenchymal cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and in vivo visualization by magnetic resonance imaging. *J. Nanobiotechnology* **9**, 4 (2011).
88. Crabbe, A. *et al.* Effects of MRI contrast agents on the stem cell phenotype. *Cell Transplant.* **19**, 919–936 (2010).
89. Suh, J. S. *et al.* Efficient labeling of mesenchymal stem cells using cell permeable magnetic nanoparticles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 669–675 (2009).
90. Sun, J.-H. *et al.* Assessment of biological characteristics of mesenchymal stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide particles in vitro. *Mol. Med. Rep.* **5**, 317–20 (2012).
91. Yang, C.-Y. *et al.* Direct labeling of hMSC with SPIO: the long-term influence on toxicity, chondrogenic differentiation capacity, and intracellular distribution. *Mol. Imaging Biol.* **13**, 443–451 (2011).
92. Kostura, L., Kraitchman, D. L., Mackay, A. M., Pittenger, M. F. & Bulte, J. W. M. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed.* **17**, 513–517 (2004).
93. Chen, Y.-C. *et al.* The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **245**, 272–279 (2010).
94. Braz, J. M. Efeitos das nanopartículas magnéticas a base de maguemita recobertas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico em macrófagos de camundongos. 105 (2011).
95. Valois, C. R. A. *et al.* Expression patterns of cell adhesion molecules in mice's lung after administration of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid-coated maghemite nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **9**, 2846–55 (2009).
96. Wang, Y., Wang, L., Che, Y., Li, Z. & Kong, D. Preparation and evaluation of magnetic nanoparticles for cell labeling. *J Nanosci Nanotechnol* **11**, 3749–3756 (2011).

97. Sperling, R. A., Rivera Gil, P., Zhang, F., Zanella, M. & Parak, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1896–1908 (2008).
98. Jokerst, J. V, Thangaraj, M., Kempen, P. J., Sinclair, R. & Gambhir, S. S. Photoacoustic imaging of mesenchymal stem cells in living mice via silica-coated gold nanorods. *ACS Nano* **6**, 5920–30 (2012).
99. Nam, S. Y., Ricles, L. M., Suggs, L. J. & Emelianov, S. Y. In vivo ultrasound and photoacoustic monitoring of mesenchymal stem cells labeled with gold nanotracers. *PLoS One* **7**, (2012).
100. Roth, J. The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry. *Histochem. Cell Biol.* **106**, 1–8 (1996).
101. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Focella, T. M. & Smilowitz, H. M. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *Br. J. Radiol.* **79**, 248–253 (2006).
102. Guo, R. *et al.* X-ray Attenuation Property of Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **114**, 50–56 (2010).
103. Wang, H. *et al.* Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as potential CT contrast agents for blood pool imaging. *Nanoscale Res. Lett.* **7**, 190 (2012).
104. Wang, H. *et al.* Folic acid-modified dendrimer-entrapped gold nanoparticles as nanoprobe for targeted CT imaging of human lung adenocarcinoma. *Biomaterials* **34**, 470–480 (2013).
105. Li, J.-L. *et al.* In vitro cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* **274**, 319–326 (2009).
106. Menk, R. H. *et al.* Gold nanoparticle labeling of cells is a sensitive method to investigate cell distribution and migration in animal models of human disease. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **7**, 647–654 (2011).
107. Schambach, S. J., Bag, S., Schilling, L., Groden, C. & Brockmann, M. A. Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods* **50**, 2–13 (2010).
108. Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M., Jurukovski, V. & Rafailovich, M. H. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* **4**, 120–37 (2010).
109. Van Ewijk, G. A., Vroege, G. J. & Philipse, A. P. Convenient preparation methods for magnetic colloids. *J. Magn. Magn. Mater.* **201**, 31–33 (1999).
110. Soler, M. A. G. *et al.* Spectroscopic study of maghemite nanoparticles surface-grafted with DMSA. *J. Phys. Chem. A* **115**, 1003–1008 (2011).

111. Cullity, B. D. & Stock, S. R. Elements of X-ray diffraction, 3rd edition. *Prentice Hall* Chapter 1 (2001).
112. Gao, J., Huang, X., Liu, H., Zan, F. & Ren, J. Colloidal stability of gold nanoparticles modified with thiol compounds: bioconjugation and application in cancer cell imaging. *Langmuir* **28**, 4464–4471 (2012).
113. Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L. & Cloos, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **731**, 237–245 (2011).
114. Borenfreund, E., Babich, H. & Martin-Alguacil, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. In Vitro* **2**, 1–6 (1988).
115. Tan, G., Sağlam, N., Köprü, Ç. & Köse, S. Interaction of mesenchymal stem and HeLa cells with gold nanoparticles. *Curr. Opin. ...* (2013). at <[http://scholar.google.com.br/scholar?q=“Interaction+of+mesenchymal+stem+and+HeLa+cells+with+gold+nanoparticles”&btnG=&hl=pt-BR&as_sdt=0,5#0](http://scholar.google.com.br/scholar?q=Interaction+of+mesenchymal+stem+and+HeLa+cells+with+gold+nanoparticles)>
116. Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **Appendix 3**, Appendix 3B (2001).
117. Reich-Slotky, R. *et al.* Determining post-thaw CD34+ cell dose of cryopreserved haematopoietic progenitor cells demonstrates high recovery and confirms their integrity. *Vox Sang.* **94**, 351–7 (2008).
118. Iwase, T. *et al.* Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc. Res.* **66**, 543–51 (2005).
119. Boutry, S. *et al.* How to quantify iron in an aqueous or biological matrix: a technical note. *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 299–304
120. Wilcoxon, J. P., Martin, J. E., Parsapour, F., Wiedenman, B. & Kelley, D. F. Photoluminescence from nanosize gold clusters. *J. Chem. Phys.* **108**, 9137 (1998).
121. Castro-Longoria, E., Vilchis-Nestor, A. R. & Avalos-Borja, M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **83**, 42–8 (2011).
122. Liu, H. *et al.* Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. *J. Dent. Res.* **83**, 496–9 (2004).
123. Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A. & Prockop, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.* **329**, 77–84 (2004).

124. Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. & Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* **64**, 295–312 (1997).
125. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–75 (1951).
126. Gang, E. J. *et al.* In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 102–8 (2004).
127. Quah, B. J. C., Warren, H. S. & Parish, C. R. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat. Protoc.* **2**, 2049–56 (2007).
128. Li, J. *et al.* Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging. *Biotechnol. Adv.* (2014). doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.009
129. Orza, A. in *Handb. Nanotoxicology, Nanomedicine Stem Cell Use Toxicol.* (Sahu, S. C. & Casciano, D. A.) 309–336 (John Wiley & Sons, 2014).
130. Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M. R. & Bottero, J.-Y. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ. Pollut.* **157**, 1127–33 (2009).
131. Auffan, M. *et al.* In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 4367–4373 (2006).
132. Gao, L. *et al.* Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 577–83 (2007).
133. Zhang, X.-Q. *et al.* Prussian blue modified iron oxide magnetic nanoparticles and their high peroxidase-like activity. *J. Mater. Chem.* **20**, 5110 (2010).
134. Chen, Z. *et al.* Dual Enzyme-like Activities of Iron Oxide Nanoparticles and Their Implication for Diminishing Cytotoxicity. (2012).
135. Pernodet, N. *et al.* Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small* **2**, 766–73 (2006).
136. Fan, J.-H., Li, W.-T., Hung, W.-I., Chen, C.-P. & Yeh, J.-M. CYTOTOXICITY AND DIFFERENTIATION EFFECTS OF GOLD NANOPARTICLES TO HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS. *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.* **23**, 141–152 (2011).
137. Pan, Y. *et al.* Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* **3**, 1941–9 (2007).

138. Brown, C. L., Whitehouse, M. W., Tiekink, E. R. T. & Bushell, G. R. Colloidal metallic gold is not bio-inert. *Inflammopharmacology* **16**, 133–7 (2008).
139. Murphy, C. J. *et al.* Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1721–30 (2008).
140. Schaeublin, N. M. *et al.* Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* **3**, 410–20 (2011).
141. Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T. & Rotello, V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.* **15**, 897–900
142. Fierro-Gonzalez, J. C. & Gates, B. C. Evidence of active species in CO oxidation catalyzed by highly dispersed supported gold. *Catal. Today* **122**, 201–210 (2007).
143. CHIANG, C., WANG, A. & MOU, C. CO oxidation catalyzed by gold nanoparticles confined in mesoporous aluminosilicate Al-SBA-15: Pretreatment methods. *Catal. Today* **117**, 220–227 (2006).
144. Zhang, Q., Hitchins, V. M., Schrand, A. M., Hussain, S. M. & Goering, P. L. Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators. *Nanotoxicology* **5**, 284–95 (2011).
145. Chueh, P. J., Liang, R.-Y., Lee, Y.-H., Zeng, Z.-M. & Chuang, S.-M. Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. *J. Hazard. Mater.* **264**, 303–12 (2014).
146. Fan, J., Hung, W., Li, W. & Yeh, J. Biocompatibility study of gold nanoparticles to human cells. *13th Int. Conf. ...* (2009). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-92841-6_214>
147. Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M. & Rafailovich, M. H. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: adipose Derived Stromal cells. *Nanotoxicology* **8**, 189–201 (2014).
148. Rauch, J., Kolch, W., Laurent, S. & Mahmoudi, M. Big signals from small particles: regulation of cell signaling pathways by nanoparticles. *Chem. Rev.* **113**, 3391–406 (2013).
149. Yi, C., Liu, D., Fong, C.-C., Zhang, J. & Yang, M. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *ACS Nano* **4**, 6439–6448 (2010).
150. Zhang, D., Liu, D., Zhang, J., Fong, C. & Yang, M. Gold nanoparticles stimulate differentiation and mineralization of primary osteoblasts through the ERK/MAPK signaling pathway. *Mater. Sci. Eng. C* **42**, 70–77 (2014).

151. Rahn, H., Alexiou, C., Trahms, L. & Odenbach, S. 3-Dimensional quantitative detection of nanoparticle content in biological tissue samples after local cancer treatment. *J. Magn. Magn. Mater.* **360**, 92–97 (2014).
152. Arfelli, F. *et al.* Mammography with synchrotron radiation: phase-detection techniques. *Radiology* **215**, 286–93 (2000).
153. Yu, Y., Ning, R., Cai, W., Liu, J. & Conover, D. Performance Investigation of a Hospital-grade X-ray Tube-based Differential Phase-contrast Cone Beam CT System. *Proc. SPIE* **8313**, (2012).
154. Pan, Y. *et al.* Inhibition effects of gold nanoparticles on proliferation and migration in hepatic carcinoma-conditioned HUVECs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 679–84 (2014).
155. Rayamajhi, M. *et al.* Non-surgical intratracheal instillation of mice with analysis of lungs and lung draining lymph nodes by flow cytometry. *J. Vis. Exp.* (2011). doi:10.3791/2702
156. La Noce, M. *et al.* Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *J. Dent.* **42**, 761–768 (2014).