



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**KAROLINE SANTOS OLIVEIRA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS RAW  
LINHAGEM 264.7 FRENTE A NANOPARTÍCULAS DE  
ÓXIDO DE FERRO ENCAPSULADAS EM POLÍMERO  
BIOCOMPATÍVEL**

**ILHÉUS-BA  
2023**

**KAROLINE SANTOS OLIVEIRA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS RAW  
LINHAGEM 264.7 FRENTE A NANOPARTÍCULAS DE  
ÓXIDO DE FERRO ENCAPSULADAS EM POLÍMERO  
BIOCOMPATÍVEL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de pesquisa: Clínica e Sanidade Animal

Sub-área: Imunologia Celular e Molecular

Orientadora: Adriana Bozzi

Co-orientadora: Jane Lima dos Santos

**ILHÉUS-BA  
2023**

**KAROLINE SANTOS OLIVEIRA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS RAW LINHAGEM 264.7  
FRENTE A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO ENCAPSULADAS EM  
POLÍMERO BIOCAMPATÍVEL**

Ilhéus – BA, 31/05/2023

---

Adriana Bozzi – Dsc.  
UESC/DCB  
(Orientadora)

---

Jane Lima dos Santos – Dsc.  
UESC/DCB  
(Co-orientadora)

---

Vitor Hugo Simões Miranda, Dsc.  
Instituto de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ Minas

---

Danielle Oliveira dos Anjos, Dsc.  
Faculdade Santo Agostinho de Itabuna - FASA

**ILHÉUS-BA  
2023**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que sempre esteve comigo em todos os passos da minha vida e que mesmo nas dificuldades enfrentadas, me manteve firme no objetivo. Aos meus pais palavras são poucas para expressar minha gratidão, obrigada pelos conselhos em todas as fases difíceis, por enxugar minhas lágrimas e recuperar o meu fôlego nos momentos de cansaço. Também por celebrarem comigo todas as conquistas, sou grata pela maneira que me ensinaram a lutar pelos meus ideais, sempre mantendo os meus princípios e respeitando o espaço do próximo, com muito caráter e dedicação para com os meus objetivos.

Aos meus irmãos agradeço por toda força que me deram e pela paciência nos meus momentos de estresse. Vocês também estiveram comigo em todas as fases boas e ruins e acompanharam o meu crescimento, sempre me encorajando e oferecendo o apoio necessário. Aos meus avós que sempre tiveram muito orgulho dos meus feitos, agradeço por todas as orações e gestos de carinho. Agradeço também aos meus tios e primos (as) por compreenderem as minhas faltas nos compromissos de família para estudar, por todo apoio e torcida pelo meu sucesso. Obrigada ao meu companheiro Alexandre, por todo apoio e compreensão. Sou grata por todo encorajamento, motivação e ajuda que me ofereceu nos momentos em que mais precisei. Aos amigos por toda torcida, compreensão e carinho, em especial Luane, Ingrid, Lara, Gabrielle e Mariana.

Agradeço a instituição UESC, e aos docentes do programa de Pós-graduação em ciência animal (PPGCA) por toda qualidade de ensino e formação oferecida, pelos profissionais de qualidade, por sempre estar inovando, oferecendo oportunidade e engajamento a nós discentes, dessa forma contribuindo para o crescimento da educação no nosso país. Em especial a minha orientadora Adriana Bozzi, por toda paciência, conhecimento e conselhos a mim oferecidos, serei eternamente grata por ter a oportunidade de ser orientada por uma profissional tão incrível e capacitada, jamais esquecerei os seus ensinamentos. Um agradecimento especial, também, à co-orientadora Jane Lima por ter aberto as portas do laboratório de imunobiologia (LIB) da UESC para eu realizar a minha pesquisa e por toda paciência e ensinamentos e ajuda.

Agradeço a todos os meus colegas de bancada do LIB, por toda a ajuda, empatia, companheirismo e conhecimento compartilhado durante o desenvolvimento da minha pesquisa. Em especial aos colegas Julyanna, Lucila e Uener, assim como aos demais colegas do grupo, Brisa, Breno, Ester, Aléxia, Lara, Raquel, Danielle e Marianas.

Minha imensa gratidão aos animais, que mesmo com as suas variadas espécies são seres ímpares no mundo, sempre nos mostrando o verdadeiro sentido da vida e significado do amor. Em especial dedico aos meus amigos de quatro patas Marlon e Fiona. E, por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer à instituição financiadora FAPESB pela bolsa do mestrado durante esses 23 meses de trabalho.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender,  
nem tão pequeno que não possa ensinar”.

*Carlos Bernard González Petoche*

# CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS RAW LINHAGEM 264.7 FRENTE A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO ENCAPSULADAS EM POLÍMERO BIOCAMPATÍVEL

## RESUMO

A imunoterapia vem evoluindo bastante, com o objetivo principal de tratar doenças com caráter inflamatório, baseado na modulação de respostas imunes frente a diversos modelos biológicos. Um desses modelos é a aplicação de nanopartículas de óxido de ferro (NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) considerada oportuna na terapêutica de algumas patologias, principalmente de cunho inflamatório. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> encapsulados em polímero biocompatível na modulação de moléculas reguladoras da imunidade inata no modelo *in vitro* de células Raw 264.7. Para tanto, foram avaliados: 1- citotoxicidade das NPs em diferentes concentrações; 2- a capacidade das células RAW em fagocitar as NPs; 3- produção de óxido nítrico (NO) pelas células RAW frente as NPs; 4- expressão de genes reguladores de NO como *Arginase II*, *iNOS*, *TLR2*, *TLR4*. Os resultados demonstraram que as NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> podem ser tóxicas às células RAW numa concentração acima de 30 µg. Em condições de concentração ideais, as células RAW foram capazes de fagocitar as NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nos primeiros minutos em cultura. As NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> fagocitadas apresentaram um potencial para modular a expressão de genes de reconhecimento de padrão (PRRs), diminuindo significativamente a expressão de *TLR-4*, em todos os tempos analisados, nas células estimuladas com LPS. Da mesma forma, as NPs regularam negativamente a expressão de Arginase II nas células estimuladas com LPS, porém somente no tempo de 24h. Em relação ao TLR-2 foi observada uma regulação positiva da expressão do gene no tempo de 6h. Além disso, foi observado que as NPs na concentração de 30 µg apresentou uma tendência, mas não significativa, em diminuir a produção de NO induzido pelo LPS. Estes dados são muito interessantes porque abrem perspectivas para novos estudos utilizando as NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como moduladoras da imunidade inata para o controle da resposta inflamatória, por exemplo.

**Palavras- chave:** Macrófagos. Células RAW 264.7. Nanopartículas de óxido de ferro. Óxido nítrico. Receptores de reconhecimento de padrão.

# FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF RAW CELLS LINEAGE 264.7 FRONT OF IRON OXIDE NANOPARTICLES ENCAPSULATED IN BIOCOMPATIBLE POLYMER

## ABSTRACT

Immunotherapy has evolved a lot, with the main objective of treating diseases with an inflammatory nature, based on the modulation of immune responses against different biological models. One of these models is the application of iron oxide nanoparticles (NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) considered opportune in the treatment of some pathologies, mainly of an inflammatory nature. The objective of this study was to evaluate the potential of NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> encapsulated in biocompatible polymer in the modulation of regulatory molecules of innate immunity in the in vitro model of Raw 264.7 cells. Therefore, the following were evaluated: 1- cytotoxicity of NPs at different concentrations; 2- the ability of RAW cells to phagocytose NPs; 3- production of nitric oxide (NO) by RAW cells against NPs; 4- expression of NO regulatory genes such as *Arginase II*, *iNOS*, *TLR2*, *TLR4*. The results showed that NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> can be toxic to RAW cells at a concentration above 30 µg. Under ideal concentration conditions, RAW cells were able to phagocytose NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> within the first minutes in culture. The phagocytosed NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> showed a potential to modulate the expression of pattern recognition receptors genes (PRRs), significantly decreasing the expression of *TLR-4*, at all analyzed times, in cells stimulated with LPS. Likewise, NPs negatively regulated Arginase II expression in LPS-stimulated cells, but only at 24h. Regarding *TLR-2*, a positive regulation of gene expression was observed at 6h. Furthermore, it was observed that NPs at a concentration of 30 µg showed a tendency, but not significantly, to decrease the production of NO induced by LPS. These data are very interesting because they open perspectives for new studies using NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as modulators of innate immunity to control the inflammatory response, for example.

**Keywords:** Macrophages. RAW 264.7 cells. Iron oxide nanoparticles. Nitric oxide. Pattern Recognition Receptors.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Ensaio de citotoxicidade ( $5 \times 10^4$  células/poço) de camundongos expostos a diferentes concentrações de nanopartículas .....30
- Figura 2.** Cultura de células Raw ( $1 \times 10^6$  células por well) + NPs nas concentrações de 30  $\mu\text{g}$  ( A e B) e concentração de 15  $\mu\text{g}$  (C e D) e grupo controle com apenas células (E) em um período de 24 horas. Onde as imagens A, B,C e D demonstram o processo de fagocitose das NPs por células RAW.....31
- Figura 3.** Ensaio de quantificação de óxido nítrico (NO), testando as concentrações de 0,01 mg e 0,03 mg de nanopartículas e como controle LPS (10 ng/poço), produto da oxidação do sobrenadante em um período de 24 horas .....33
- Figura 4.** Expressão relativa de genes reguladores da síntese de óxido nítrico Expressão relativa dos genes *iNOS* e *Arginina II* em células RAW ( $2 \times 10^6$ /poço) ..... 35
- Figura 5: expressão de genes receptores de padrões moleculares.** Expressão relativa dos genes *TLR2* e *TLR4* em células RAW ( $2 \times 10^6$ /poço) ..... 36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência de oligonucleotídeos para os genes alvo no estudo .....	29
--	----

## LISTA DE ABREVIACOES

$\mu$ l	Microlitro(s)
$\mu$ m	Micrometro(s)
%	Porcentagem
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ANOVA	Análise de variância
anti-CD163.63	Anticorpo Cluster of differentiation 163.63
AP-1	Proteína ativadora-1
ATP	Adenosina trifosfato
BSNPs	Nanoprculas acopladas a $\beta$ -glucano
$^{\circ}$ C	Graus celsius
CD86	Cluster of differentiation 86
CLP	Ligao pno cecal
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CUR	Curcumina
DM1	Diabetes melitus tipo I
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium alta glicose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	cido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético
EMA	European Medicines Agency
EROs	Espécies reativas de oxignio

FDA	Food and Drug Administration
Ferumoxitol	Carboximetil dextrano feraheme
GSH	Glutationa
GSSG	Dissulfeto de glutationa
HCl	Cloreto de hidrogênio
IFN- $\beta$	Interferon $\beta$
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido Nítrico sintetase
IRAK	Quinase associada ao receptor da interleucina 1
LDH	Lactato desidrogenase
LL37	Peptídeo catelicidina derivado de humano
LPS	Lipopolisacarídeo
M1	Macrófago 1
M2	Macrófago 2
ml	Mililitro
mg	Miligrama
MTT	(3 -(4,5 -Dimethylthiazol - 2 -yl) -2,5 - Diphenyltetrazolium Bromide)
MYD88	Fator de diferenciação mielóide 88

NAMPs	Padrões moleculares associados a nanomateriais
Nano- DDSs	Sistemas de administração de nanomedicamentos
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio
NRF2	Fator nuclear eritroide 2
NFκβ	Fator nuclear kappa β
Nm	Nanômetros
NNI	Iniciativa Tecnológica Nacional
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NPs	Nanopartículas
NPsFe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Nanopartículas de óxido de ferro
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBM	Fotobiomodulação
PEG	Polietileno glicol
PLGA	Ácido polilático-co-glicólico
PMN	Neutrófilos pelimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
RIG	Ácido retinóico
ROS	Radicais livres
RPM	Rotações por minuto
RPMI 1640	ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SFB	Soro fetal bovino
SPIOS	Nanopartículas supermagnéticas de óxido de ferro
TIRAP	Proteína adaptadora do receptor Toll/interleucina-1
TLRs	Toll-like receptor
TLR 2	Toll-like receptor 2
TLR 4	Toll-like receptor 4
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
TRAF6	Receptor associado ao fator 6

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos .....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
3.1 Nanotecnologia .....	18
3.2 Nanopartículas de óxido de ferro polimérica .....	19
3.3 Interação das nanopartículas com o sistema imune .....	20
3.4 Aplicação das nanopartículas na medicina.....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
4.1. Preparo das nanopartículas.....	26
4.2 Cultura das células RAW 264.7 com Nanopartículas de óxido de ferro .....	26
4.3. Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	26
4.4 Ensaio de Fagocitose.....	27
4.5. Quantificação da produção de óxido nítrico (NO).....	27
4.6. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo.....	28
4.7. Análise Estatística.....	29
<b>5 RESULTADOS</b> .....	30
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (SPIOs) ou (NP $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) são ferramentas terapêuticas bastante utilizadas no campo da medicina atualmente. No entanto a sua aplicabilidade não está totalmente elucidada especialmente quando se trata da sua ação sobre o sistema imunológico e as respostas inflamatórias (CHEN et al., 2020).

Quando se trata de sistema imune, percebemos a importância dos macrófagos na sinalização de diversas doenças infecciosas, pois são componentes celulares do sistema fagocitário mononuclear presentes em todos os tecidos de um organismo (POLLARD, 2009). Atuam como efetores e reguladores do sistema imune inato, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRR) como o *Toll-like receptors* (TLRs), que compreendem mais de 10 receptores expressos em mamíferos. Por meio dos TLR2 e TLR4, os macrófagos podem reconhecer componentes da parede bacteriana, como o lipopolissacarídeo (LPS), e proteínas virais, atuando na resposta imunológica contra infecção, tumor ou inflamação (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; SHIN et al., 2000; STENGER et al., 1996).

Classificam-se em M1 ou M2, como consequência da via metabólica do uso da arginina, estimulando respostas do tipo Th1 ou Th2, respectivamente. Nos macrófagos M1 a arginina é metabolizada pela óxido nítrico sintase (NOS), gerando óxido nítrico (NO) e citrulina. Já nos macrófagos M2, a arginina é degradada pela arginase em ornitina e ureia (MILLS, 2012). O NO apresenta uma performance importante do ambiente inflamatório podendo eliminar patógeno como vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintos (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; SHIN et al., 2000; STENGER et al., 1996).

O estudo de moduladores do sistema imune com baixa citotoxicidade, como fitoterápicos e nanomateriais, vem evoluindo significativamente com o objetivo principal de desenvolver novas terapêuticas para tratar injúrias de caráter inflamatório (KUMAR et al., 2012). Neste contexto, a nanotecnologia vem ganhando espaço nas pesquisas científicas, com uma enorme variedade de nanopartículas (NPs), como a de ouro, prata, óxido metálico, titânio, óxido de zinco, selênio e óxido de ferro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), que evidenciaram através de estudos *in vitro* uma capacidade medicinal (SARKAR; DAS MUKHOPADHYAY, 2021).

As NP $\text{Fe}_2\text{O}_3$  pertencem a classe de materiais magnéticos que vem se destacando principalmente nas áreas da biomedicina e bioengenharia (FIGUEROLA et al., 2010;



MOHAMMED et al., 2017), devido às suas propriedades de magnetização de alta saturação, compatibilidade biológica e baixa toxicidade (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Possuem tamanhos aproximados ao de algumas moléculas biológicas como proteínas e enzimas, variando de 1 a 100 nm, o que facilita a interação com receptores, ligantes, DNA e proteínas do corpo que possuem tamanhos semelhantes (MANUJA et al., 2012). Além disso, as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  costumam ser maiores que moléculas de alguns fármacos padrões possibilitando uma maior interação tecidual e acúmulo em órgãos alvo em relação as drogas padrão, que muitas vezes apresentam limitações, relacionadas a fatores como solubilidade e permeabilidade, biodistribuição, dose, que podem causar diversos efeitos colaterais/tóxicos ao organismo (ALPHANDÉRY, 2020).

Dessa forma seu uso tem atraído muito interesse como agentes em terapêuticas direcionadas, mas pouco se sabe sobre como elas interagem com o sistema imunológico. No entanto, estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que os macrófagos desempenham um papel importante na interação com as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$ .

Neste trabalho, foi selecionada a linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 para responder se as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  podem modular os macrófagos para o desenvolvimento de propostas terapêuticas, principalmente relacionadas a doenças inflamatórias. Para tanto, foi desenvolvida a co-cultura de células RAW 264.7 e  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  para análise de citotoxicidade, capacidade de internalização das NPs e papel na resposta inflamatória, quantificando a expressão dos genes *iNOS*, *Arginase II*, *TLR 2*, *TLR4*, bem como os níveis de NO.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o potencial de nanopartículas de óxido de ferro encapsulados em polímero biocompatível na modulação de moléculas reguladoras da imunidade inata no modelo *in vitro* de células Raw 264.7.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- A) Determinar a concentração não citotóxica de nanopartículas de óxido de ferro em células RAW 264.7;
- B) Analisar a capacidade de fagocitose de nanopartículas de óxido de ferro por células RAW 264.7;
- C) Avaliar os níveis de óxido nítrico no sobrenadante de células RAW 264.7 em co-cultura com nanopartículas de óxido de ferro;
- D) Quantificar a expressão dos genes *arginase II*, *iNOS*, *TLR 2* e *TLR4* em células Raw 264.7 em co-cultura com nanopartículas de óxido de ferro;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia está relacionada ao desenvolvimento de materiais com dimensões reduzidas em escala nanométrica com propriedades físicas, químicas e biológicas exclusivas (DURÁN; MARCATO, 2013). O prefixo nano é originado do grego e é atribuído a algo com tamanho reduzido. O ramo da nanociência e nanotecnologia é composto por matérias de tamanhos próximos a (1- 100 nm). Os primeiros relatos a respeito disso surgiram em 1959 através do pesquisador Richard Feynman que ganhou o prêmio Nobel em física teórica quando afirmou a possibilidade de produção de nanorobôs que “viajariam” pelo corpo buscando e exterminando doenças (FREITAS, 2005a). Porém, somente em 1974 a nanotecnologia foi colocada em prática pela primeira vez por Taniguchi que criou a denominação “nanotecnologia” como definição para um conjunto de estudos e aplicações designados a objetos e processos em escala de nanômetro (PAULO CADIOLI; DIZULINA SALLA, 2015).

Em 1981 foi criado um aparelho capaz de visualizar e manipular átomos nunca vistos antes, mas especificamente um microscópio de varredura por tunelamento elaborado pelos pesquisadores Gerd Binnig e Heinrich Rohrer em um laboratório na Suíça, que ganharam o prêmio Nobel em 1986 por esse feito. Esse microscópio era composto por uma ponta composta por um material condutor ligado ao local onde se localiza a amostra, com capacidade de percorrer toda a superfície do material analisado (PAULO CADIOLI; DIZULINA SALLA, 2015).

Além disso, a nanotecnologia avançou ainda mais, no Japão durante o ano de 1991 onde foram descobertos os nanotubos de carbono pelo professor Sumio Iijama. Que são considerados por alguns pesquisadores como um material com grande resistência mecânica. Podendo ser utilizado como condutores e semicondutores, além de auxiliar no posicionamento de átomos e moléculas (IIJIMA, 1991). No início do século XXI houve um grande interesse nas áreas da nanociência e nanotecnologia, nos Estados unidos foram apoiados financiamentos de pesquisas nessa área e sancionamento da lei de Pesquisa e Desenvolvimento de Nanotecnologia do Século XXI, e criação a Iniciativa Tecnológica Nacional (NNI) pelo então presidente George W Bush, tornando esse tipo de pesquisa prioridade nacional (HULLA; SAHU; HAYES, 2015). Desde então, a nanotecnologia vem crescendo e se aprimorando cada vez mais possibilitando diversas aplicações tecnológicas em diversas áreas do ramo científico.

### 3.2 Nanopartículas de óxido de ferro poliméricas

As NPs $\text{Fe}_2\text{O}_3$  são altamente susceptíveis à oxidação pelo ar e, portanto, são revestidas com polímeros ou surfactantes. Necessitam ser estabilizadas em líquido transportador para evitar aglomeração que ocorre devido a força de *Van der Waals* (CORNELL; SCHWERTMANN, 1996; HARRIS et al., 2002; VUONG et al., 2015).

Os materiais utilizados na produção dessas partículas poliméricas são biodegradáveis e biocompatíveis, como o poliácido lático, ácido glicólico, ácido acrílico, proteínas, polipeptídeos, e polissacarídeos, sendo esses os mais usuais na produção de NPs para administração de fármacos. Podem ser envolvidas com polietileno glicol (PEG) que é um polímero derivado do petróleo, que nesse caso possui a função de evitar agregação dessas partículas, de forma a evitar uma reação imunológica exacerbada (ELGQVIST, 2017).

Os polímeros estão presentes em diversas pesquisas farmacêuticas, devido às suas propriedades de manter a estabilidade física, química e microbiológica dos produtos, de forma segura e eficaz (GEMEINDER; CASAGRANDE; PINHEIRO, 2021). São amplamente utilizadas na área médica como um sistema de entrega de substâncias ativas no organismo e direcioná-las para alvos específicos.

O tamanho nanométrico dessas estruturas favorece a interação dessas substâncias com o sistema biológico, além de aumentar a capacidade de absorção (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000b). As NPs podem transportar uma combinação de diferentes partículas que são capazes de alterar a velocidade de liberação de fármacos ou biomoléculas, e para que ela consiga atingir sítios específicos no organismo é necessário que a superfície dessa nanopartícula seja modificada de acordo com o local de ação, como sangue ou órgãos diretamente (LIU et al., 2008).

Biomoléculas como proteínas, polissacarídeos, lipídeos e polímeros sintéticos podem ser utilizados como nanocarreadores na liberação de fármacos. Dessa forma, os fármacos podem ser dissolvidos e encapsulados, com o objetivo de diminuir efeitos tóxicos e facilitar a sua passagem por barreiras que são impermeáveis ao fármaco sozinho. Além disso, é possível desenvolver medicamentos como antibióticos que só sejam ativados quando houver uma infecção (MANUJA; KUMAR; SINGH, 2012; SUZUKI et al., 1998). Existem vários benefícios exercidos pelo sistema de entrega das NPs ao organismo, tais como: (1) seu tamanho nanométrico permite que eles passem vasos sanguíneos, até mesmo os capilares e permaneçam por um longo período na corrente sanguínea; (2) podem penetrar células e tecidos, facilitando

a interação com órgãos alvo, como pulmão, baço, fígado; (4) possuem uma boa biodegradabilidade e podem atuar reduzindo a toxicidade e efeitos colaterais de fármacos, por isso é tão favorável no tratamento do câncer (LIU et al., 2008). Devido a compatibilidade do ferro com o organismo as NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> são amplamente utilizadas na área médica e farmacêutica. Por exemplo, são aplicadas geralmente na corrente sanguínea podendo estar associadas a algum fármaco e são direcionadas através de um campo magnético até as células-alvo (MANUJA; KUMAR; SINGH, 2012).

### 3.3 Interação das nanopartículas com o sistema imune

É importante entender a interação das NPs com o sistema imunológico, para compreender melhor sobre os seus riscos e benefícios à saúde. Além disso, a interação e a forma como são eliminadas do organismo facilitaria o entendimento do mecanismo de ação das NPs para a formulação de medicamentos (BORASCHI et al., 2017). O resultado dessa interação pode variar de acordo com o tipo de partícula e o tipo celular.

Ao entrar em contato com o organismo as NPs são primariamente detectadas pelo sistema imune inato por ser um agente externo, através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (FADEEL, 2022; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Há cerca de 10 anos atrás foi criado o termo “padrões moleculares associados a nanomateriais” (NAMPs), para classificar interações entre nanomateriais e sistema imunológico (PRADEU; COOPER, 2012).

O reconhecimento de PAMPs é feito via receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os PRRs são divididos em classes, onde a principal é a de receptores transmembrana onde o mais conhecido é o “*Toll like*” (TLRs), receptores de proteínas citoplasmáticas como os receptores semelhantes ao gene induzível pelo ácido retinóico (RIG) e vários outros (FADEEL, 2022). Os TLRs ativam uma via de sinalização comum que resulta na indução de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-6, IL-1 $\beta$  e IL-12, assim como vias alternativas que induzem respostas efetivas contra tipos variados de patógenos (AKIRA; TAKEDA, 2004). Por exemplo, o LPS de bactérias Gram-negativas é reconhecido por TLR4 e TLR2 em conjunto com TLR1 ou TLR6, que detectam vários componentes bacterianos, como peptidoglicano, lipopeptídeo e lipoproteína de bactérias Gram-positivas além de lipopeptídeo de micoplasma (TAKEUCHI et al., 1999).

O MyD88 é a principal proteína adaptadora envolvida na sinalização de TLRs 2 e 4. Quando os TLRs 2 e 4 são ativados, eles recrutam o MyD88 para o receptor, o que leva à

ativação de uma cascata de sinalização que culmina na ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Isso leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1, que ajudam a combater o patógeno (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011). A via dependente de MyD88 controla as respostas inflamatórias. No entanto, a ativação da via dependente de MyD88 requer um adaptador adicional TIRAP/Mal para acionar os TLR2 e TLR4 porque os camundongos deficientes em TIRAP/Mal apresentam defeitos nas respostas inflamatórias, mediadas pelos ligantes TLR1/2, TLR2/6 e TLR4 (FOSTER; HARGREAVES; MEDZHITOV, 2007; GABBIANI et al., 2002).

A sinalização TLR também estimula a expressão de moléculas co-estimuladoras em células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas (DCs). Evento este denominado de maturação DC, sendo essencial para a indução de respostas imunes adaptativas específicas do patógeno, sinalizando que os TLRs ligam a imunidade inata e adaptativa (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004).

Os TLRs 2 e 4, desempenham um papel crítico na detecção de PAMPs, atuando na ativação da resposta imune inata, ativando macrófagos, que fagocitam os patógenos em seguida desencadeando uma série de eventos intracelulares que resultam na produção de quimiocinas, citocinas e NO, com o objetivo de controlar a inflamação e até mesmo cicatrização tecidual (MACHADO et al., 2004).

O NO é produzido principalmente pelos macrófagos, que são células encontradas em vários tecidos do organismo e são uma parte importante da resposta imune a patógenos e tecidos danificados. Está envolvido em muitos processos fisiológicos no homem, que incluem neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais e parasitas intracelulares (FELDMAN et al., 1993). Dependendo dos níveis produzidos, o NO pode ser protetor ou tóxico. Apesar de pequenas quantidades serem necessárias para a homeostasia, a produção exacerbada de NO é citotóxica, porém isto pode ser um mecanismo importante na defesa contra invasores celulares, tumores e lesões vasculares com perda endotelial (GABOURY et al., 1993; PAYNE; KUBES, 1993; YAN et al., 1996).

Os macrófagos produzem NO numa resposta inflamatória atuando como agente microbicida no combate à infecções agudas causadas por bactérias, vírus ou parasitos. É produzido através de uma enzima chamada óxido nítrico sintase (NOS), que converte o

aminoácido L-arginina em NO e L-citrulina. Existem três tipos de NOS: a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzível (iNOS)(FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

A produção de NO pode ser reduzida por competição da NOS com a arginase, uma metaloenzima de manganês que, também, age no metabolismo de L-arginina, porém convertendo em L-ornitina e ureia, e não em NO. Existem duas formas de arginase, I e II. A arginase I é uma enzima citosólica altamente expressa no fígado e a arginase II é mitocondrial e altamente expressa nos rins (YAN et al., 1996). As principais atividades da arginase relacionam-se com a eliminação da amônia do organismo por meio da síntese da ureia; e produção de ornitina, precursora de poliaminas e prolinas. As poliaminas são necessárias para a proliferação celular e regulação de vários canais iônicos. Já a prolina é necessária para a produção de colágeno(CALDWELL et al., 2015).

A iNOS é expressa principalmente pelos macrófagos ativados durante a resposta inflamatória e é a principal fonte de NO durante a inflamação. A iNOS é induzida por LPS ou endotoxinas bacterianas e pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que são produzidos em resposta à presença de patógenos ou tecidos danificados. A sua produção pode ser suprimida por TGB- $\beta$ , IL-4 ou IL-10, sozinhos ou sinergicamente com macrófagos, e por IL-8 e por glicocorticóides, que inibem a indução, mas não a atividade das enzimas já induzidas(DAVIES, 1995).

A iNOS requer síntese proteica para sua expressão e sua atividade persiste por mais de 24 horas (ADAMS et al., 1996). É encontrada sob forma de monômero e tetrâmero com peso molecular de 130 kD (KUO; SCHROEDER, 1995) A expressão de iNOS ocorre em resposta à uma inflamação adaptativa (infecção ou sepse) ou anormal (doença autoimune), podendo ser, então, benéfica ou nociva ao organismo, respectivamente.

Além dos macrófagos, outras células também podem produzir NO em menor quantidade, incluindo células endoteliais, células musculares lisas e neurônios(FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Os macrófagos estão presentes principalmente em tecidos mucosos ou de barreira como pele, trato digestivo e respiratório, podendo adotar distintas denominações de acordo com o tecido em que está relacionado, como células de kupffer, osteoclastos, micróglia em condições de homeostase (GINHOUX; GUILLIAMS, 2016). Atuam detectando e eliminando estruturas exógenas e endógenas como células senescentes, microrganismos e qualquer agente que interfira na homeostase (BORASCHI et al., 2017). Através da expressão de diversos

receptores, do tipo lectina, inflamassomas e TLRs presentes na membrana celular, citoplasma e compartimento endossomal. Colaboram, também, com as demais células da imunidade inata, tais como neutrófilos e natural killers (NK) (MOLGORA et al., 2018). Apresentam fenótipos funcionais, o M1 que é considerado um fenótipo pró- inflamatório que está relacionado a defesa contra infecções e defesa contra o desenvolvimento tumoral; e o M2 que é anti-inflamatório associado a remodelação tecidual, imunossupressão e progressão tumoral (MANTOVANI et al., 2002; MARTINEZ, 2011). Dessa forma, atraem mediadores imunossupressores, como IL-10, prostaglandinas, além disso participam do metabolismo do ferro e aminoácidos, como Idoleamina (IDO) e arginase (MANTOVANI et al., 2017; MURRAY, 2018).

As NPs podem induzir a polarização dos macrófagos de M1 para M2, isso pode ocorrer diretamente ou através da polarização de cargas. Estudos relatam a capacidade de NPs estimular a polarização M1 *in vitro* em macrófagos de linhagem humana e de murinos (MIAO; LENG; ZHANG, 2017). Essa polarização depende de diversos fatores relacionados a características físico-químicas apresentadas pela NP, assim como tempo de exposição e concentração utilizada (YEN; HSU; TSAI, 2009).

### **3.4 Aplicação das nanopartículas na medicina**

Nanomedicina, é o termo ao qual se refere o uso da nanotecnologia na área médica, pode ser usada tanto para o tratamento quanto para o diagnóstico de doenças, formulação e transporte de fármacos para determinada área do organismo. Pode diagnosticar patologias antes mesmo dos sintomas aparecerem, através do mapeamento de células, rastreamento de tumores e carregamento de antígenos para aplicação de vacinas (EL-SAYED; KAMEL, 2020). Através desse sistema de carregamento, a nanomedicina pode atuar aumentando a estabilidade de biomoléculas, como por exemplo, peptídeos e ácido nucleico com o objetivo de aumentar a absorção dos mesmos no organismo. Além disso, possibilita a entrega de fármacos ao sítio de ação de forma mais rápida, prevenindo efeitos colaterais (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005; SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000a).

As NPs podem ser usadas como sondas quando conjugadas a biomoléculas promovendo a detecção de movimentos moleculares e celulares podendo detectar algumas patologias, para isso essas partículas são revestidas por materiais como colágeno, anticorpos e outras micromoléculas. Outra técnica utilizada é na produção de robôs biológicos ligados a genes que atuam na produção de hormônios e vitaminas (CUENCA et al., 2006; FREITAS, 2005b).



São grandes aliados no tratamento do câncer, pois nanodispositivos podem ser personalizados para carrear doses altas de fármacos anticancerígenos especificamente até as células doentes, de forma que não atinja as células saudáveis. Dessa forma diminuído os graves efeitos colaterais causados pelos medicamentos que atuam no tratamento dessa doença (DUFRESNE et al., 2004; LEE; GAO; BAE, 2008). Quando essas drogas são conjugadas a polímeros solúveis em água são mais biocompatíveis e menos tóxicos quando comparados a droga de forma livre e são direcionados mais facilmente a tumores sólidos (DUNCAN, 2003). Outras doenças também podem ser tratadas através dessa tecnologia, como infecções causadas por parasitos, vírus, bactérias ou fungos (MOTA; ARARAQUARA, 2014).

A nanotecnologia oferece a capacidade de entrega desses fármacos, atuando na produção de novas terapias e, também, melhorando a eficácia de fármacos já existentes (WANG et al., 2019). Com isso existem uma gama de sistemas de administração de nanomedicamentos (nano-DDSs) direcionados ao tratamento de diversas doenças, possuindo um bom desempenho na cicatrização de feridas e regeneração da pele. Pois são favoráveis a umidade dessa forma ativando melhor o processo de cicatrização (SANDHIYA; DKHAR; SURENDIRAN, 2009).

Nesse caso as nano-DDSs são associados a moléculas bioativas e atuam protegendo o fármaco da degradação associada a degradação das proteases da ferida, prolongando a concentração do mesmo e reduzindo o tempo de administração (LOSI et al., 2010).

Assim como na medicina humana, a nanotecnologia está crescendo potencialmente na área da medicina veterinária, atuando também na entrega de medicamentos a sítios específicos do organismo, assim como na produção de vacinas, desenvolvimento de terapias e auxiliando na cicatrização de feridas (BAMRUNGSAP et al., 2012; CHEN; LIANG, 2020; HAJIPOUR et al., 2012). As NPs apresentam diversas aplicações na área da saúde animal, podendo combater diversos patógenos sendo eles intracelulares ou não, tratando até mesmo doenças crônicas e parasitos presentes na corrente sanguínea (GREENWOOD et al., 2008; KROUBI et al., 2010). Como Salmonelose, brucelose, tuberculose e leishmaniose (MANUJA; KUMAR; SINGH, 2012).

As NPs têm uma importante atuação, também, no diagnóstico de doenças, associadas a anticorpos específicos, ou até mesmo peptídeos e ácidos nucleicos. Existe também a possibilidade de desenvolvimento de biochips que podem analisar cerca de milhares de genes de uma vez só, facilitando o diagnóstico de doenças genéticas (MANUJA; KUMAR; SINGH, 2012). Além disso, apresentam ampla aplicação na área de diagnóstico por imagem, onde atuam

com agentes de contraste em exames de ressonância magnética, tomografia computadorizada e ultrassonografia. As NPs possuem uma maior sensibilidade magnética em relação aos agentes de contraste tradicionais como o gadolínio (MITRA et al., 2006). São administradas por via intravenosa e podem identificar tumores hepáticos, pois são absorvidos de forma muito rápida pelo fígado. Da mesma forma o contraste superparamagnético de óxido de ferro é capaz de ser absorvido pelos linfonodos e medula óssea. Desta forma, podem identificar diversas patologias ligadas ao sistema imunológico e linfático, como detecção de estágios linfonodais e micrometástases em pacientes com tumores em regiões como mama, pulmão (HARISINGHANI et al., 2003; TORCHILIN, 2007; WANG; HUSSAIN; KRESTIN, 2001).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparo das nanopartículas

As NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram pesadas e acondicionadas em frasco de vidro contendo 40 ml de água destilada e esterilizadas em autoclave (20 minutos a 121°C). Em seguida, todo o volume foi transferido para um tubo Falcon de 50 ml estéril e centrifugado a 1400 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma pipeta e um ímã. As NPs sedimentadas foram ressuspensas em um volume de 5 ml de água destilada estéril e estocadas a 4°C até o seu uso.

### 4.2 Co-cultura das células RAW 264.7 e nanopartículas de óxido de ferro

Para este estudo foram utilizados macrófagos murinos RAW da linhagem 264.7 que estavam criopreservados a -80°C em solução contendo 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 4 mL de soro fetal bovino (SFB). As células foram expandidas em garrafas de cultura T25 e T75 na presença de meio *Dulbeccos Modified Eagle Medium*, alta glicose (DMEM, Gibco, USA) suplementado com 10% SFB (Invitrogen – Gibco®) e 1 mg/mL de penicilina/estreptomicina (PS; Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil), em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C de uma estufa incubadora umidificada. Ao atingirem a confluência de 90%, as células foram removidas da garrafa por meio da ação da enzima tripsina/EDTA (Sigma) e auxílio mecânico do *rubber policeman*, e acondicionadas em tubo Falcon de 50 mL. A ação da enzima foi neutralizada adicionando o mesmo volume de meio DMEM suplementado. As células foram recuperadas após centrifugação a 1200 RPM, temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento celular foi ressuspensado em 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de PS, e as células contadas em câmara de Neubauer, numa diluição de 10 vezes em solução azul de Trypan stain 0,4% (Invitrogen). Após a contagem, as células foram distribuídas em placas de cultura juntamente com NPs e incubadas a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>, numa concentração (células e NPs) e tempo definidos para cada ensaio, descritos a seguir.

### 4.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT e avaliação da capacidade fagocítica

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, as células foram incubadas com diferentes concentrações de NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e a citotoxicidade foi avaliada por ensaio colorimétrico sensível e quantitativo da metabolização do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Para tanto, as células foram distribuídas numa placa de 96 poços numa concentração de 5x10<sup>4</sup> células/poço, em triplicatas, e as NPs adicionadas nas concentrações de 15 µg, 30 µg, 60 µg, 125 µg, 250 µg, 500 µg e 1000 µg, em triplicatas independentes. O lipopolissacarídeo (LPS) foi utilizado como controle positivo do ensaio, numa concentração de

10 mg/ml. A estaurosporina foi utilizada como controle negativo numa concentração de 10 mg/ml. O controle sem estímulos (DMEM) foi realizado com células nas mesmas concentrações e condições de incubação. A placa foi incubada por 24 horas numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C. Após o período de incubação, foram adicionados aos poços 10 µL da solução de MTT (Sigma), sendo a placa novamente incubada a 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, por 4 horas. Em seguida, as células foram observadas em microscópio óptico para a visualização dos cristais de formazan e adicionou-se a cada poço 100 µL de 10% SDS/HCl para a solubilização destes cristais, observando-se uma reação colorimétrica. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância da solução a 595 nm em um leitor automático de microplacas (Elx800, BioTek, Instrumensts Inc.).

#### **4.4 Ensaio de fagocitose**

Após a determinação de concentração de NPs não citotóxica para as células RAW, foi avaliada a capacidade das células fagocitarem as NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em diferentes tempos. Para isso, foram utilizadas 1x10<sup>6</sup> células por poço de uma placa de 24 poços contendo lamínulas redondas estéreis. Após a adesão das células foram adicionadas as NPs nas concentrações de 15 µg e 30 µg, em poços independentes, e a análise foi realizada após 30 minutos, 1h, 3h e 24 h de interação. O grupo controle realizado com células sem nanopartículas que permaneceu em cultura por 24h. Em seguida as lamínulas foram retiradas, coradas com panóptico de acordo com as recomendações do fabricante e as lâminas montadas para visualização no microscópio óptico. As células foram analisadas com objetiva de 100x e fotografadas.

#### **4.5 Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)**

A produção de NO foi avaliada no sobrenadante de co-cultura de células RAW e NPs. Para tanto, as células foram distribuídas em placa de 96 poços numa concentração de 8x10<sup>4</sup> células por poço (triplicata), overnight. Posteriormente, foram adicionadas as NPs nas concentrações de 15 µg e 30 µg. O controle positivo foi realizado com LPS (10 ng/poço). As células foram incubadas a 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, por 24 horas. Em seguida, foi realizada a determinação da produção de NO, que foi mensurada indiretamente como indicador da produção de nitrito (NO<sub>2</sub>), através da reação de Griess, onde foram adicionados 50 µL do sobrenadante ao mesmo volume do reagente de Griess. Como controles da reação (“branco”) para a leitura da coloração, foram utilizados somente meio DMEM, DMEM/NPs 15 µg e DMEM/NP30 µg, todos sem células. A mensuração do NO foi realizada através de uma curva padrão de diluição seriada de NaNO<sub>2</sub>. Em seguida foi feita a leitura da absorbância a 540 nm em um leitor automático de microplacas (Elx800, BioTek, Instrumensts Inc.).

#### 4.6 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo

A expressão gênica de mediadores foi quantificada por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR). Iniciadores (*primers*) foram desenhados usando o software Primer Express versão 3.0 (Applied Biosystems, 2004) e fabricados pela Invitrogen (tabela 1). Os ensaios de RT-qPCR foram realizados pela detecção SYBR Green e a quantificação relativa usou o gene 18 S como o controle endógeno para a calibração dos níveis de mRNA. A extração de mRNA total das células RAW foi feita com Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). A síntese de cDNA foi realizada com 1 µg de RNA total, utilizando do kit de síntese cDNA de 20ng, a mistura principal de Taqman (10 µL), de acordo com as recomendações do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas as reações foram conduzidas usando Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems. A reação foi realizada utilizando o Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  com o software 7500 v2.0.6 (Applied Biosystems).

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos para os genes alvo no estudo

Gene alvo	Função do gene	Foward	Reverse
<i>18 S</i>	Subunidade menor do ribossomo	GTAACCCGTTGAACC CCATT	CCATCCAATCGGTAGTA GCG
<i>Arginase II</i>	Reguladora das respostas imunes	TCCCTGCCAATCATG TTCCTG	TATTCCACTCCTAGCTTC TTCTGT
<i>iNOS</i>	Enzima para produção de óxido nítrico	GTTTGAAACTTCTCA GCCAC	ACGTTCTCCGTTCTCTTG C
<i>TLR 2</i>	Detecção de patógenos e geração de sinais para produção de citocinas pró-inflamatórias	CTGGTTTTGCCCTGC ACTCC	TGGTGAAGATGAAGTCC TGCC
<i>TLR 4</i>	Detecção de patógenos e geração de sinais para produção de citocinas pró-inflamatórias	TCAGCACTACATCGC CTGAC	GTCAGCTCCACTTTGCAT CA

#### 4.7 Análise Estatística

O teste de variância One-way ANOVA (não paramétrico) com pós-teste *Tukey* foi utilizado para analisar a diferença significativa entre os grupos. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 5.00. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, considerando o valor de  $p < 0,05$  estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Citotoxicidade de $\text{NPFe}_2\text{O}_3$ em cultura de macrófagos RAW

O ensaio de MTT foi realizado para avaliar a viabilidade de células RAW cultivadas com diferentes concentrações de  $\text{NPFe}_2\text{O}_3$  por um período de 24 horas. A figura 1 mostra mais de 80% das células metabolicamente viáveis quando em cultura com as NPs nas concentrações de 15  $\mu\text{g}$  e 30  $\mu\text{g}$ , quando comparadas com o controle sem NPs (DMEM). As demais concentrações de NPs avaliadas reduziram significativamente a porcentagem de células viáveis (Figura 1).

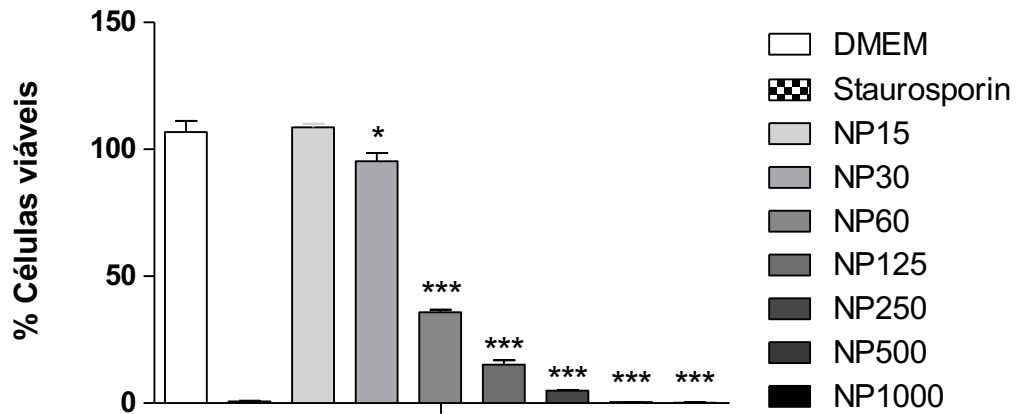


Figura 1. Ensaio de citotoxicidade. A viabilidade das células RAW ( $5 \times 10^4$  células/poço) foi avaliada pelo ensaio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) após o cultivo por 24 h com diferentes concentrações de  $\text{NPFe}_2\text{O}_3$ . O controle positivo de viabilidade foi feito somente com células cultivadas em DMEM e o controle negativo com estaurosporina (100  $\mu\text{g}$ /poço). Diferenças significativas em relação ao DMEM estão representadas por (\*)  $P < 0.001$  e (\*\*\*)  $P < 0.0001$ .

## 5.2 Fagocitose de $\text{NPFe}_2\text{O}_3$ por macrófagos RAW

A capacidade dos macrófagos em realizar fagocitose das  $\text{NPFe}_2\text{O}_3$  nas concentrações de 15 e 30  $\mu\text{g}$  foi avaliada em diferentes tempos, em microscopia óptica, após coloração com panótico. As células RAW fagocitaram as  $\text{NPFe}_2\text{O}_3$  em ambas as concentrações analisadas, em curto tempo de cultura (Figura 2, painéis A e B). Foi possível observar a formação de um aro ao redor das NPs, no citoplasma das células RAW, semelhante à um fagossomo (figura 2D).

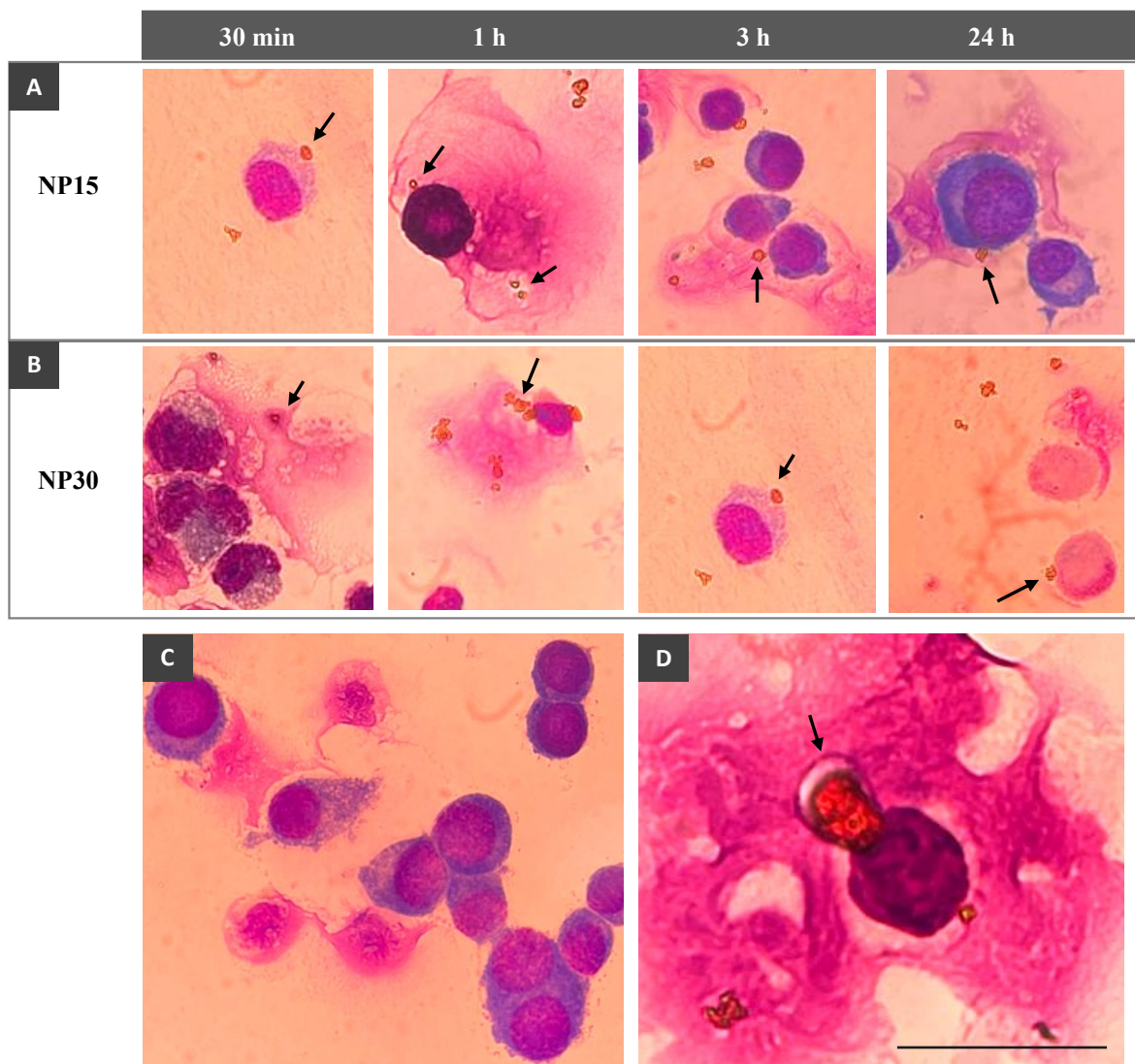


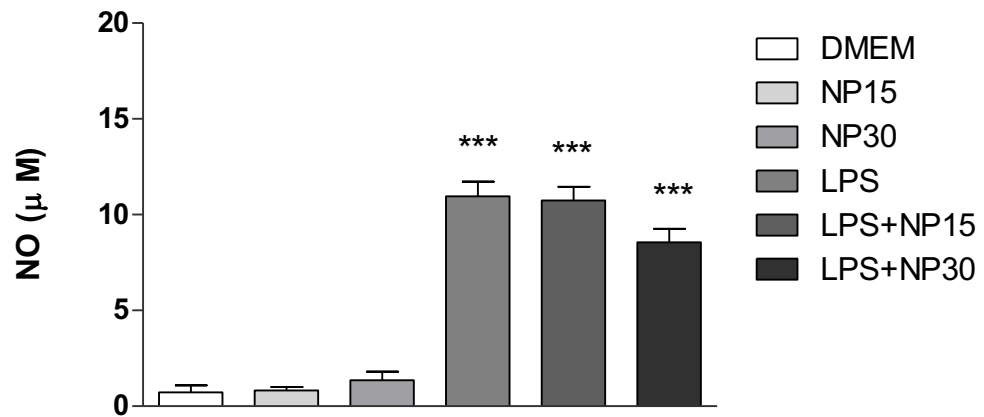
Figura 2. Fagocitose de NPs por células RAW. A internalização de  $\text{NPFe}_2\text{O}_3$  foi analisada após a cocultura de células RAW 264.7 ( $1 \times 10^6$ ) com NPs nas concentrações de 15 e 30  $\mu\text{g}$  (painéis A e B, respectivamente), após 30 min, 1h, 3h e 24h. O grupo controle foi feito com somente DMEM (painel C). Em D, uma imagem ampliada do vacúolo fagocítico com NP fagocitada no citoplasma da célula RAW (escala barra = 42.33  $\mu\text{m}$ ). As setas apontam para a presença de um aro em imagem negativa ao redor de algumas NPs indicativo de fagossomo.



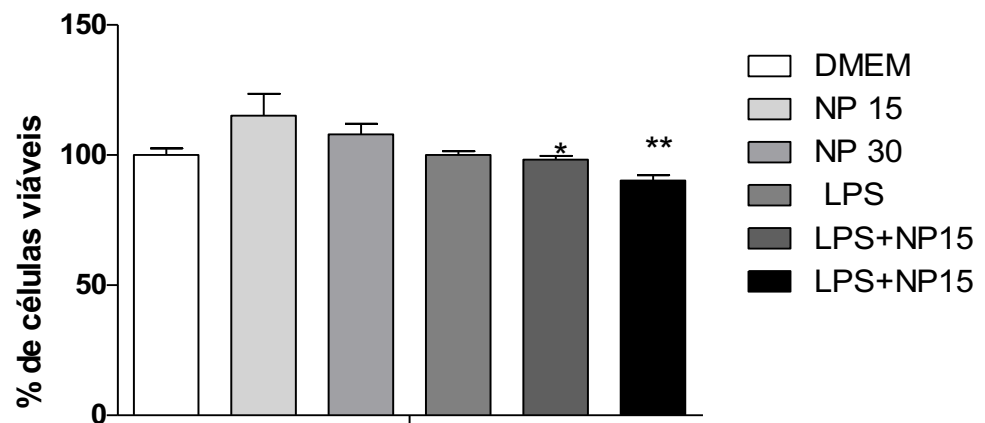
### 5.3 Quantificação de Óxido Nítrico

Para avaliar se as NPs interferem funcionalmente nas células RAW, os níveis de NO foram mensurados no sobrenadante de cultura das células RAW com NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas concentrações de 15 µg e 30 µg. O controle positivo foi realizado com LPS (10 ng/poço). Foi possível analisar mensurando indiretamente os níveis de nitrito, produto da oxidação do sobrenadante, em um período de 24 h. Foi observado que o LPS aumentou significativamente os níveis de NO por células RAW (Figura 3A). Quando adicionadas as NPs, não houve alteração significativa dos níveis de NO, porém notou-se uma tendência de controle da produção de NO pelas NPs na concentração de 30 µg (Figura 3A). Após a mensuração de NO as células foram submetidas ao teste de MTT para certificar a viabilidade das mesmas, e os resultados comprovaram que as células estavam viáveis, dessa forma validando o resultado do NO (Figura 3B).

A)



B)



**Figura 3. Produção de óxido nítrico pelas células RAW.** O painel A apresenta a concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) produzido pelas células RAW cultivadas por 24 h com  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$ , nas concentrações de 15  $\mu\text{g}$  e 30  $\mu\text{g}$ , e controles sem estímulos (DMEM) e com estímulo por lipopolissacarídeo (LPS, 10 ng/poço). O painel B apresenta a viabilidade das células do painel A, analisada por ensaio de metabolização do MTT. Diferenças significativas estão representadas por (\*) em relação ao DMEM, NP10 e NP30.

#### **5.4 Expressão de genes reguladores da síntese de óxido nítrico por células RAW cultivadas com nanopartículas de óxido de ferro**

A expressão dos genes *arginase II*, *iNOS*, *TLR2* e *TLR4* foi analisada após 1, 6 e 24 horas de cultura das células RAW na presença de NPs 30 µg. Os genes *arginase II* e *iNOS*, reguladores da expressão de NO foram avaliados e foi observado um aumento significativo na expressão de *iNOS* no tempo de 24 h (Figura 4 C), induzido pelo LPS. Da mesma forma, o LPS também induziu uma expressão significativa do gene *Arginase II* no tempo de 24h. Porém, na presença das NPs a expressão gênica de *Arginase II* deixou de ser significativa quando as células foram estimuladas com LPS (Figura 5F).

Em relação a expressão de genes PRRs, foi observado que o *TLR-2* teve uma expressão significativa no período de 6 h induzido pelas NPs (Figura 5B). O gene *TLR-4* teve a sua expressão significativamente aumentada na presença de LPS, em todos os tempos analisados (figura 5D-F). Quando as NPs foram adicionadas, houve uma diminuição significativa da expressão de *TLR-4* estimulada por LPS, em todos os tempos analisados (Figura 5D-F).

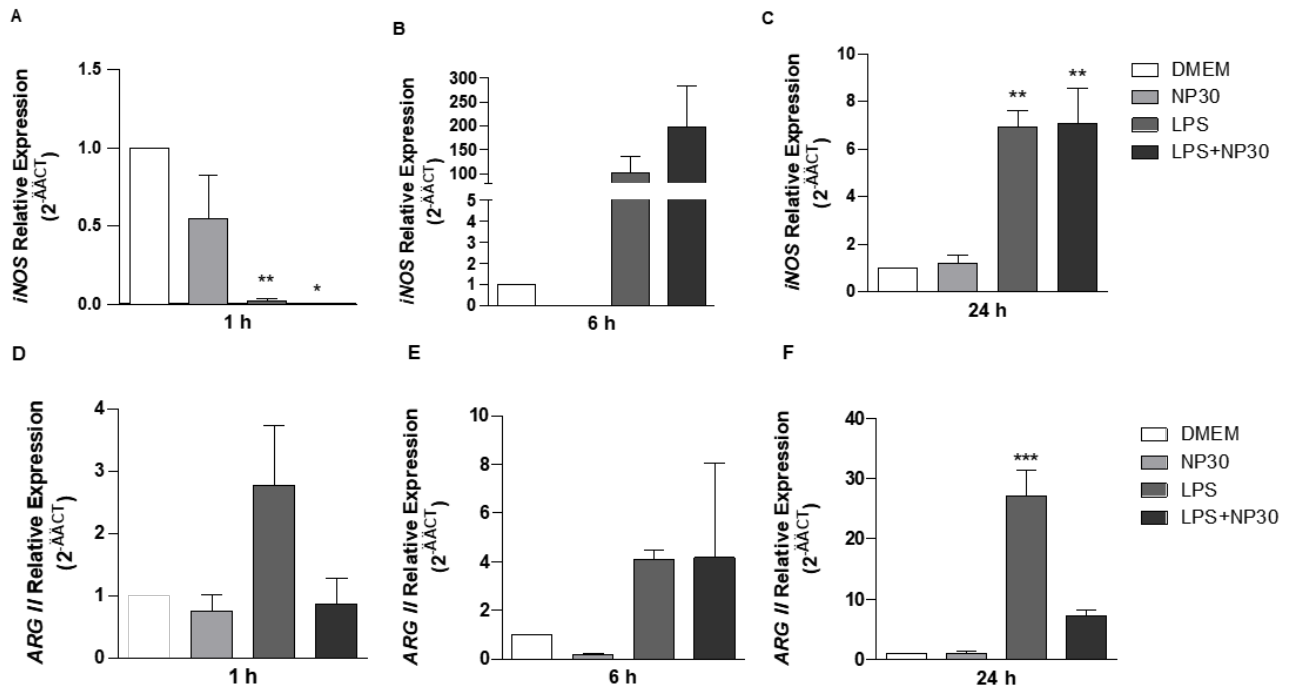


Figura 4: expressão relativa de genes reguladores da síntese de óxido nítrico. Expressão relativa dos genes *iNOS* e *Arginase II* em células RAW ( $2 \times 10^6$ /poço) cultivadas na presença de  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  ( $30 \mu\text{g}/\text{poço}$ ) por 1h, 6h e 24h. Grupos controles foram conduzidos no mesmo tempo com células cultivadas com somente meio DMEM (controle sem estímulo) ou na presença de lipopolissacarídeo (LPS) associado ou não às NPs. Após cada período, a extração de mRNA total das células RAW foi feita com Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). A síntese de cDNA foi realizada com  $1 \mu\text{g}$  de RNA total utilizando o kit Taqman, de acordo com as recomendações do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas as reações foram conduzidas no *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems*. Os resultados foram analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  com o software 7500 v2.0.6 (Applied Biosystems). Dados expressos em U/L como média  $\pm$  SEM. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) estão representadas por (\*\*) em relação ao DMEM e NP30; (\*\*\*) em relação a todos os outros grupos.

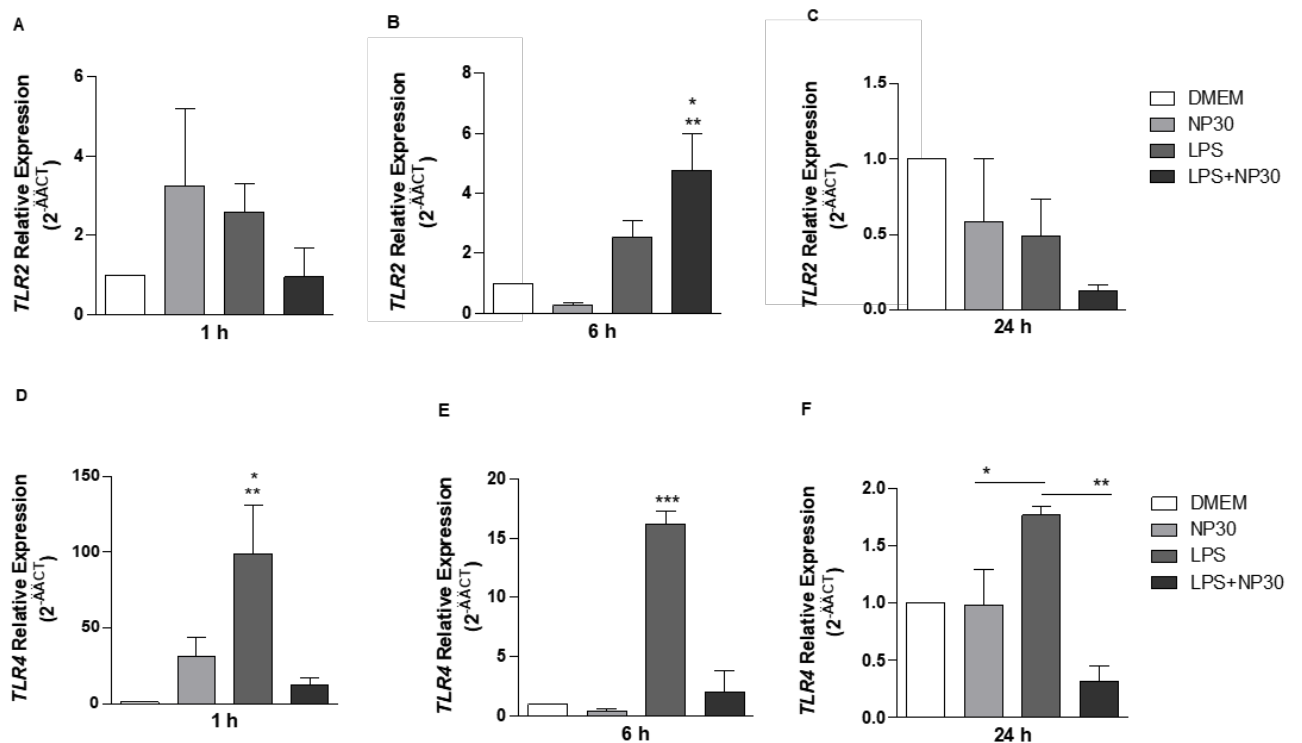


Figura 5: Expressão relativa de genes receptores de padrões moleculares TLR2 e TLR4. Expressão relativa dos genes *TLR2* e *TLR4* em células RAW ( $2 \times 10^6$ /poço) cultivadas na presença de NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (30 μg/poço) por 1h, 6h e 24h. Grupos controles foram conduzidos no mesmo tempo com células cultivadas com somente meio DMEM (controle sem estímulo) ou na presença de lipopolissacarídeo (LPS) associado ou não às NPs. Após cada período, a extração de mRNA total das células RAW foi feita com Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). A síntese de cDNA foi realizada com 1 μg de RNA total utilizando o kit Taqman, de acordo com as recomendações do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas as reações foram conduzidas no *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems*. Os resultados foram analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  com o software 7500 v2.0.6 (Applied Biosystems). Dados expressos em U/L como média  $\pm$  SEM. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para: TLR2 estão representadas por (\*) em relação ao DMEM e (\*\*) em relação ao NP30; TLR4 (D, E) (\*\*) em relação ao DMEM, (\*) em relação ao LPS+NP30, (\*\*\*) em relação a todos os demais grupos.

## 6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a modulação de funções efetoras dos macrófagos por NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> encapsuladas com polímero biocompatível com proposta para desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas de importância inflamatória. Como modelo de macrófagos, foram utilizadas as células murinas RAW 264.7 por serem de fácil cultivo e resistentes à muitas passagens em cultura sem alterações da morfologia e da produção de proteínas até 18 passagens (WENGER et al., 2004).

Os macrófagos são pertencentes ao sistema fagocitário mononuclear, sendo considerados um dos principais fagócitos no sistema imune inato. São diferenciados de monócitos, células mieloides, sendo gerados de forma contínua, localizando-se na circulação sanguínea. Atuam mantendo a homeostase do organismo e internalizando partículas estranhas. Durante um processo de injúria e inflamação os monócitos são recrutados da corrente sanguínea para o local da lesão onde podem se diferenciar em macrófagos, por exemplo, e se multiplicar, produzir citocinas como sinal de alerta, recrutando outras células da corrente sanguínea, como neutrófilos (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014; GINHOUX; JUNG, 2014).

Os macrófagos podem ser ativados através da via clássica (macrófagos M1) que desempenha um papel essencial na proteção contra patógenos intracelulares através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de NO. Porém existem também, macrófagos ativados através da via alternativa (macrófagos M2) que não produzem NO a partir de L-arginina, e assim não limitam eficientemente o crescimento de patógenos intracelulares, além disso tem função imunossupressora para proteger órgãos e tecidos contra os efeitos citotóxicos das EROs e NO em inflamações crônicas. Atualmente sendo uma das principais formas de diferenciar macrófagos M1 de M2 é através da análise entre os níveis de iNOS e arginase por métodos bioquímicos ou, principalmente por métodos moleculares (NOËL et al., 2004).

A modulação da atividade dos macrófagos pode ser uma estratégia para o tratamento de doenças com perfil inflamatório, por exemplo. Neste contexto, é importante avaliar o potencial imunomodulador das NPs, como é o caso da NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, em macrófagos, tanto em níveis locais quanto sistêmicos, podendo ser pró ou anti-inflamatório.

O uso de NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) e a EMA (*European Medicines Agency*) para aplicação de fármacos (PRILEPSKII et al., 2018). Isto reforça a importância da avaliação das NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como moduladores de macrófagos,

disponibilizando novas estratégias de tratamento para doenças relacionadas a infecções, autoimunidade e cicatrização de feridas, por exemplo (DUKHINOVA et al., 2019).

No primeiro momento deste estudo, foi avaliada a citotoxicidade das  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$ , analisando a porcentagem de células capazes de metabolizar o MTT. Observou-se que as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  podem ser tóxicas para as células RAW, dependendo da concentração utilizada. No ensaio foi utilizada uma diluição seriada de NPs, partindo de uma concentração de 1000  $\mu\text{g}$  até 15  $\mu\text{g}$ . Somente nas concentrações de 15 e 30  $\mu\text{g}$  foi observado mais de 80% de células viáveis, sendo que na concentração de 30  $\mu\text{g}$  houve uma redução significativa na porcentagem de células capazes de metabolizar o MTT.

Em estudo Eun-Jung Park e colaboradores, avaliaram a citotoxicidade de  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$ , também em células RAW 264.7, utilizando as concentrações de 6.25, 12.5, 25, e 50  $\mu\text{g/ml}$  em um tempo de 24 horas através do teste de MTT. Semelhante aos nossos resultados, constataram que a viabilidade celular diminuiu de maneira dose-dependente após o tratamento com  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  nas concentrações de 6,25, 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/ml}$  por 24 h. As células viáveis eram  $86,7 \pm 2,2$ ,  $81,3 \pm 2,6$ ,  $77,3 \pm 3,8$  e  $73,5 \pm 1,0\%$  do controle (onde as células foram tratadas apenas com meio RPMI), respectivamente. Além disso, uma parada na fase G1 foi observada em todas as células tratadas e houve também um aumento dos níveis de NO de forma dose-dependente (PARK et al., 2014).

Em outro estudo, pesquisadores avaliaram  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  nas concentrações 10, 20, 40 ou 80  $\mu\text{g/ml}$  cultivadas com macrófagos com e sem o estímulo de LPS, nos tempos de 6 e 24 horas e foi observado em ensaio de MTT que a viabilidade celular aumentou significativamente quando tratados em 40 e 80  $\mu\text{g/ml}$  com LPS. Além disso, as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  atenuaram a secreção de IL-6 e TNF induzida por LPS em macrófagos (CHEN et al., 2020).

Uma vez determinada a concentração de  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  não citotóxica para as células RAW, avaliamos a capacidade dessas células em fagocitar as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  em diferentes tempos de exposição. Em nosso estudo, observamos que as células RAW foram capazes de internalizar as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  desde os primeiros 30 minutos analisados até as 24h de co-cultura.

Outros estudos apontaram que os macrófagos são capazes de reconhecer NPs por meio de PRRs e liberar mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-8, IL-6 e  $\text{TNF}\alpha$ , dependendo das condições de exposição (BEZEMER et al., 2011; SHOENFELT et al., 2009). As NPs fagocitadas podem funcionar como rastreadoras celulares e/ou moduladoras das atividades dos macrófagos.

Como rastreadoras, as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  podem ser ferramentas na identificação de locais inflamatórios no organismo, recrutando células inflamatórias para o local (SHARKEY et al., 2017). Um exemplo disso é em um modelo de encefalite autoimune experimental em camundongo com esclerose múltipla, onde foi utilizado  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  suplementadas com európio, que se trata de um elemento químico que possui diversas propriedades ópticas associadas a iluminação, sendo bastante utilizado como agente de contraste em ressonância magnética, sondas marcadoras de biomoléculas, além de marcar proteínas e aminoácidos (PAULO, 2007). Neste estudo foram associados a macrófagos/monócitos e as mesmas só foram detectadas através de ressonância magnética, durante o pico neuroinflamatório da doença (MILLWARD et al., 2019).

Como moduladoras das funções dos macrófagos, as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  podem desencadear efeitos pró- ou anti-inflamatórios que podem trazer benefícios ao tratamento de doenças, principalmente relacionados à terapia do câncer, pois a ativação e infiltração de células imunes estão relacionadas a um bom prognóstico clínico (LIANG et al., 2018). Por exemplo, Zanganeh e colaboradores (2016b) demonstraram que  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$ , revestidas com carboximetil dextrano feraheme (ferumoxitol), usadas no tratamento para adenocarcinomas em camundongos polarizaram macrófagos para uma resposta Th1, dessa forma atraindo células T citotóxicas, o que provocou em um aumento da imunidade antitumoral. No experimento *in vivo*, o ferumoxitol inibiu significativamente o crescimento de adenocarcinomas subcutâneos em camundongos (ZANGANEH et al., 2016b).

O tipo de revestimento das NPs pode, também, influenciar diretamente na resposta imunológica, onde a maioria dos estudos apontaram que as NPs revestidas com polímero têm um impacto menor na viabilidade e função celular (THOREK et al., 2006). Outro estudo envolvendo macrófagos no carregamento de  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  e tungstênio, em camundongos apresentaram um efeito antitumoral significativo, sendo os tumores considerados de difícil acesso (ZHENG et al., 2018).

Após certificar que as células RAW são capazes de fagocitar as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$ , questionamos se as NPs poderiam interferir na produção de NO das células. Para tanto, os níveis de NO foram quantificados no sobrenadante de cultura das células RAW com  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  nas concentrações de 15 e 30  $\mu\text{g}$ . Não houve diferenças significativas nos níveis de NO induzidos por  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$ , nas concentrações avaliadas. A ausência de produção de NO poderia ser devido à falta de estímulo da célula como, também, à baixa viabilidade celular. Esta última hipótese foi descartada, uma vez que ao final da mensuração do NO foi realizado o ensaio de



metabolização do MTT com as mesmas células, o que confirmou a viabilidade das mesmas. A hipótese do estímulo insuficiente para ativação da produção de NO foi confirmada com o controle positivo realizado com LPS que revelou níveis significativos de NO, demonstrando que o ensaio funcionou adequadamente.

O LPS é uma molécula que se liga ao macrófago via receptor TLR4 desencadeando mecanismos inflamatórios, sendo um desses a produção de NO. As células estimuladas com LPS apresentaram níveis significativos de NO. Interessantemente, houve uma tendência (não significativa) de diminuição da produção de NO pelas células estimuladas com LPS na presença de NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na concentração de 30 µg. Uma vez que o estímulo de LPS é bem significativo em macrófagos, essa tendência apresentada pelas NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chamou a atenção para uma possível modulação da produção de NO pelas NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

A dosagem de NO é um fator importante em estudos envolvendo cultura de macrófagos, pois se trata de um gás inorgânico que é sintetizado através da L-arginina e é permeável a membrana. Portanto, a produção de NO é indicativo da ativação do macrófago (SUN et al., 2003). O NO é uma molécula importante para os mamíferos, plantas e bactérias. É rapidamente oxidado a nitrito e nitrato e, por isso, tem uma meia vida curta e está envolvido em diversos processos fisiológicos e imunológicos (LUM; BUTT; LO, 2002). Se trata de uma molécula reativa pois assim que se forma no interior das células pela iNOS, é liberado no meio extracelular e ocorre a conversão em nitrito por conta da reação com o oxigênio (Hensley et al., 2003).

Buscando entender se as NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> realmente influenciam no mecanismo de ativação do macrófago foi analisada a expressão de genes relacionados com a produção de NO, como *iNOS* e *Arginase II*, bem como de receptores de ativação do macrófago, como *TLR-2* e *TLR-4*. A expressão gênica foi avaliada em células RAW cultivadas com NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na concentração de 30 µg, após 1h, 6h e 24h de cultura.

Não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica de *iNOS* induzidas pelas NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Somente após a estimulação por LPS houve um aumento da expressão de *iNOS*, corroborando com os resultados dos níveis de NO induzidos por LPS, porém a NP 30µg não foi capaz de diminuir a expressão do *iNOS*.

Os mamíferos apresentam duas isoformas da enzima arginase tipo I e arginase tipo II. Elas possuem semelhanças em suas propriedades enzimáticas, mas se antagonizam por sua localização celular, distribuição tecidual, padrões de expressão e reatividades imunológicas. A

arginase I está presente no citosol e é bastante expressa nos hepatócitos enquanto que a arginase II é mitocondrial e é expressa nas células do cérebro, rins, glândulas mamárias, intestinos e macrófagos. Porém algumas células como os macrófagos murinos expressam ambas as isoformas (MUXEL et al., 2018). Além de ser um substrato para a formação de ureia e poliaminas, a arginina também é precursora na síntese de nitrito, nitrato e Óxido Nítrico (NO) em mamíferos (HIBBS; TAINTOR; VAVRIN, 1987). O NO é uma das principais moléculas microbicidas produzida pelos macrófagos. Existem três isoenzimas de óxido nítrico sintase (NOS), a (nNOS tipo I, NOS induzíveis ou iNOS, tipo II e NOS endoteliais ou eNOS, tipo III), nos macrófagos a iNOS é potencialmente induzível por citocinas inflamatórias (MUXEL et al., 2018).

A enzima iNOS age no aminoácido L- arginina gerando NO e citrulina. Da mesma forma, a arginase II também degrada o mesmo aminoácido, competindo com a iNOS pelo mesmo substrato. A arginina degradada pela arginase II resulta em ornitina e ureia, e não em NO. Portanto, quando há um aumento na produção de arginase, espera-se uma redução dos níveis de NO.

Interessantemente, observamos uma diminuição significativa na expressão gênica de *Arginase II* no tempo de 24h de cultura com as células RAW, induzida pelas NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Porém, esse resultado não coincidiu com a quantificação de NO induzida pelas NPs. Esperava-se observar um aumento dos níveis de NO na cultura das células RAW estimuladas por 24h com NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Por fim avaliamos, também, os PRRs, especificamente o TLR-2 e TLR-4, ambos expressos pelos macrófagos. Outros trabalhos revelaram que os PRRs são capazes de reconhecer NPs e liberar mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-8, IL-6 e TNF $\alpha$ , dependendo das condições de exposição (BEZEMER et al., 2011; SHOENFELT et al., 2009).

Os TLR transmitem o sinal do ectodomínio para o citoplasma, através da sua interação com os PAMPS por meio de moléculas adaptadoras, como o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), a proteína adaptadora do receptor Toll/interleucina-1 (TIRAP) e o receptor Toll/interleucina-1 adaptador contendo domínio induzindo IFN- $\beta$  (TRIF). Posteriormente, o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) e a quinase associada ao receptor da interleucina 1 (IRAK) ativam as duas vias de sinalização diferentes, a proteína ativadora-1 (AP-1) e o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e por meio dessas vias ativam diversos genes inflamatórios (NETEA et al., 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004). O TLR2 reconhece de

forma mais ampla o número de ligantes microbianos, incluindo vários componentes fúngicos, gram-positivos e micobacterianos, como peptidoglicanos (SCHWANDNER et al., 1999; YOSHIMURA et al., 1999).

O TLR-4 está relacionado com o reconhecimento de LPS de bactérias Gram-negativas, utilizado como controle positivo neste estudo. Constatamos que as NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram capazes de reverter o aumento significativo da expressão gênica de TLR-4 induzido por LPS, em todos os tempos avaliados. Este achado pode explicar a tendência na diminuição dos níveis de NO observada nas células estimuladas com LPS e tratadas com NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, na concentração de 30 µg.

Ao contrário dos resultados observados com o gene *TLR-4*, as NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induziram a expressão de TLR-2 nas células estimuladas com LPS por 6h. O TLR-2 em associação com o TLR-1 ou TLR-6 reconhece vários componentes bacterianos, incluindo peptidoglicano, lipopeptídeo e lipoproteína de bactérias gram-positivas e lipopeptídeo de micoplasma. Curiosamente, os dados da expressão gênica revelaram que a ativação de TLR-2 foi maior do que a de TLR-4, quando as células foram estimuladas por LPS.

O LPS ativa o TLR4 porque ele é reconhecido pelos domínios extracelulares desses receptores, que desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular que leva à ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF-κB) e o fator ativador de transcrição-1 (AP-1). Esses fatores de transcrição ativam genes envolvidos na resposta imunológica, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, IL-6 e TNF, e quimiocinas, que recrutam células do sistema imunológico para o local da infecção. (TAKEDA; AKIRA, 2004).

Outro estudo envolvendo cultura de células Raw 264.7 e NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, publicado por Yajing Chen e colaboradores (2020), demonstrou resultados semelhantes aos nossos. Foi observada uma inibição significativa da expressão de *TLR4* nas concentrações testadas de 10, 20 ou 40 µg/ mL de NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Dessa forma eles concluíram que as NPs reduziram a resposta inflamatória causada por LPS possivelmente através da regulação negativa da expressão da via TLR4/MYD88 em macrófagos. Porém eles detectaram uma diminuição nos níveis de iNOS e consequentemente de NO, o que não está de acordo com os nossos resultados (CHEN et al., 2020).

Em suma, a determinação da concentração ideal de NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> realizada através do ensaio de MTT foi importante para uma melhor elucidação dos resultados obtidos. Foi possível

observar a importância das NPs no ambiente inflamatório e suas diversas aplicações na medicina. Foi observado que a concentração de 30 µg com LPS apresentou uma tendência de diminuir a produção de NO, podendo assim estar relacionado a um efeito anti-inflamatório. Porém, na análise de genes da inflamação, foi possível perceber um aumento na expressão de iNOS no grupo tratado com NPs 30 µg e estimulado com LPS no período de 24 horas. Outro resultado interessante foi a diminuição da expressão do gene TLR 4 de macrófagos de forma significativa em todos os tempos podendo indicar, também, uma atividade anti-inflamatória. Em geral, mais estudos são necessários para entender completamente a interação entre as NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e os diversos tipos celulares, buscando evoluir nos estudos para aplicações médicas.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo mostraram que as células RAW 264.7 foram capazes de fagocitar as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  que reverteram, significativamente, a expressão de TLR-4 induzida por LPS, sugerindo um controle dos níveis de NO que pode ser utilizado como estratégia terapêutica em doenças de importância inflamatória.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em conjunto, os dados gerados abrem perspectivas para novos estudos em relação ao uso de NPs como moduladora de mecanismos da imunidade inata, especificamente relativo aos macrófagos. Vimos que por meio das  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  pode-se alterar o reconhecimento de PAMPs e interferir num processo patogênico. Desta forma, as  $\text{NPsFe}_2\text{O}_3$  podem ser utilizadas para regular a ativação mediadores inatos, alterar a expressão gênica e proteger os hospedeiros de invasores como os vírus, por exemplo, que muitas vezes utilizam os TLRs como uma estratégia para invadir a célula. Além disso, a fagocitose de NPs pode ser uma estratégia para rastreamento celular.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. L.; MEYER, E. R.; CICERO, T. J. **Effects of Nitric Oxide-Related Agents on Opioid Regulation of Rat Testicular Steroidogenesis**"*BIOLOGY OF REPRODUCTION*,1996.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. **Toll-like receptor signalling**. *Nature Reviews Immunology*Nature Publishing Group, , 2004.

ALPHANDÉRY, E. **Iron oxide nanoparticles for therapeutic applications**. *Drug Discovery Today*Elsevier Ltd, , 1 jan. 2020.

BAMRUNGSAP, S. et al. **Nanotechnology in therapeutics: A focus on nanoparticles as a drug delivery system**. *Nanomedicine*, ago. 2012.

BEZEMER, G. F. G. et al. Activation of pulmonary dendritic cells and Th2-type inflammatory responses on instillation of engineered, environmental diesel emission source or ambient air pollutant particles in vivo. *Journal of Innate Immunity*, v. 3, n. 2, p. 150–166, fev. 2011.

BOGDAN, C.; RIILLINGHOFF, M. **The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion***International Journal for Parasitology*, 1998.

BORASCHI, D. et al. **Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defence**. *Seminars in Immunology*Academic Press, , 1 dez. 2017.

CALDWELL, R. B. et al. **Arginase: An old enzyme with new tricks**. *Trends in Pharmacological Sciences*Elsevier Ltd, , 2015.

CHEN, L.; LIANG, J. **An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents**. *Materials Science and Engineering C*Elsevier Ltd, , 1 jul. 2020.

CHEN, Y. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of toll-like receptor 4 expression. *Journal of Applied Toxicology*, v. 40, n. 8, p. 1067–1075, 1 ago. 2020.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, UDO. **The iron oxides : structure, properties, reactions, occurrence, and uses**. [s.l.] VCH, 1996.

CUENCA, A. G. et al. **Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics.** *Cancer*, 1 ago. 2006.

DAVIES, M. G.; FULTON, G. J.; HAGEN, P.-O. Clinical biology of nitric oxide. **British Journal of Surgery**, v. 82, n. 12, p. 1598-1610, 1995.

DUFRESNE, M. H. et al. **Preparation and characterization of water-soluble pH-sensitive nanocarriers for drug delivery.** *International Journal of Pharmaceutics*. **Anais...** 11 jun. 2004.

DUKHINOVA, M. S. et al. **Metal oxide nanoparticles in therapeutic regulation of macrophage functions.** *Nanomaterials* MDPI AG, , 1 nov. 2019.

DUNCAN, R. **The dawning era of polymer therapeutics.** *Nature Reviews Drug Discovery*, maio 2003.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D. **Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: A review.** *International Journal of Food Science and Technology*, jun. 2013.

ELGQVIST, J. **Nanoparticles as theranostic vehicles in experimental and clinical applications-focus on prostate and breast cancer.** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 20 maio 2017.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. **Origin and Functions of Tissue Macrophages.** *Immunity* Cell Press, , 17 jul. 2014.

FADEEL, B. **Understanding the immunological interactions of engineered nanomaterials: Role of the bio-corona.** *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* John Wiley and Sons Inc, , 1 nov. 2022.

FELDMAN, Paul L. et al. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. **Journal of medicinal chemistry**, v. 36, n. 4, p. 491-496, 1993.

FIGUEROLA, A. et al. **From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications.** *Pharmacological Research*, ago. 2010.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. **Artigo de Revisão** *Rev Ass Med Brasil*, 2000.

FOSTER, S. L.; HARGREAVES, D. C.; MEDZHITOV, R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 972–978, 21 jun. 2007.

FREITAS, R. A. **Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery. International Journal of Surgery**, 2005.

GABBIANI, F. et al. Multiplicative computation in a visual neuron sensitive to looming. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 320–324, 21 nov. 2002.

GEMEINDER, A. C. S.; CASAGRANDE, V.; PINHEIRO, O. L. ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO PARA ESCOLHA DE EXCIPIENTES DE CÁPSULAS PREPARADAS MAGISTRALMENTE. **Revista Contexto & Saúde**, v. 21, n. 43, p. 128–142, 4 out. 2021.

GINHOUX, F.; GUILLIAMS, M. **Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. Immunity** Cell Press, , 15 mar. 2016.

HAIPOUR, M. J. et al. **Antibacterial properties of nanoparticles. Trends in Biotechnology**, out. 2012.

HARISINGHANI, M. G. et al. **Noninvasive Detection of Clinically Occult Lymph-Node Metastases in Prostate cancer. New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 25, p. 2491-2499, 2003.

HARRIS, L. A. et al. **Polymer Stabilized Magnetite Nanoparticles and Poly(propylene oxide) Modified Styrene-Dimethacrylate Networks**. 2002. Tese de Doutorado. Virginia Polytechnic Institute and State University. p. 185, 2008.

HENSLEY, K.; MOU, S.; PYE, Q. N. Nitrite Determination by Colorimetric and Fluorometric Griess Diazotization Assays Simple, Reliable, High-Throughput Indices of Reactive Nitrogen Species in Cell-Culture Systems. Em: **Methods in Biological Oxidative Stress**.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage Cytotoxicity: Role for L-Arginine Deiminase and Imino Nitrogen Oxidation to Nitrite. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 473–476, 23 jan. 1987.

HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. **Nanotechnology: History and future. Human and Experimental Toxicology** SAGE Publications Ltd, , 1 dez. 2015.



- IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56–58, nov. 1991.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. **Toll-like receptor control of the adaptive immune responses**. **Nature Immunology**, out. 2004.
- JUNG, Y. C. et al. Anti-inflammatory effects of galangin on lipopolysaccharide-activated macrophages via ERK and NF- $\kappa$ B pathway regulation. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 36, n. 6, p. 426–432, 1 dez. 2014.
- KHATUA, S.; SIMAL-GANDARA, J.; ACHARYA, K. **Understanding immune-modulatory efficacy in vitro**. **Chemico-Biological Interactions** Elsevier Ireland Ltd, , 25 jan. 2022.
- KUMAR, D. et al. **A review of immunomodulators in the Indian traditional health care system**. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, jun. 2012.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 16–34, jan. 2011.
- KUO, Paul C.; SCHROEDER, Rebecca A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Annals of surgery**, v. 221, n. 3, p. 220, 1995.
- LEE, E. S.; GAO, Z.; BAE, Y. H. **Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology**. **Journal of Controlled Release**, 18 dez. 2008.
- LIANG, R. et al. Oxygen-boosted immunogenic photodynamic therapy with gold nanocages@manganese dioxide to inhibit tumor growth and metastases. **Biomaterials**, v. 177, p. 149–160, 1 set. 2018.
- LIU, P. et al. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. **Artificial Organs**, v. 32, n. 12, p. 925–931, 2008.
- LOSI, P. et al. Tissue response to poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane-fibrin composite scaffolds for controlled delivery of pro-angiogenic growth factors. **Biomaterials**, v. 31, n. 20, p. 5336–5344, jul. 2010.
- LUM, H. K.; BUTT, Y. K. C.; LO, S. C. L. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 205–213, 2002.

- MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–662, dez. 2004.
- MANTOVANI, Alberto et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in immunology**, v. 23, n. 11, p. 549-555, 2002.
- MANTOVANI, A. et al. **Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology**. **Nature Reviews Clinical Oncology** Nature Publishing Group, , 1 jul. 2017.
- MANUJA, A.; KUMAR, B.; SINGH, R. K. Nanotechnology developments: opportunities for animal health and production. **Nanotechnology Development**, v. 2, n. 1, p. 4, 30 jan. 2012.
- MARTINEZ, F. O. **Regulators of macrophage activation**. **European Journal of Immunology**, jun. 2011.
- MIAO, X.; LENG, X.; ZHANG, Q. **The current state of nanoparticle-induced macrophage polarization and reprogramming research**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 6 fev. 2017.
- MILLS, Charles. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 32, n. 6, 2012.
- MILLWARD, J. M. et al. Application of Europium-Doped Very Small Iron Oxide Nanoparticles to Visualize Neuroinflammation with MRI and Fluorescence Microscopy. **Neuroscience**, v. 403, p. 136–144, 1 abr. 2019.
- MITRA, Amitava et al. Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. **Current pharmaceutical design**, v. 12, n. 36, p. 4729-4749, 2006.
- MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 3, p. 311–330, mar. 2005.
- MOHAMMED, L. et al. **Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review**. **Particuology** Elsevier B.V., , 1 fev. 2017.
- MOLGORA, M. et al. **The yin-yang of the interaction between myelomonocytic cells and NK cells**. **Scandinavian Journal of Immunology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 set. 2018.

REGINATO, Bruna Mota. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas com propriedades mucoadesivas para administração oral de zidovudina.** 2014.

MURRAY, P. J. **Immune regulation by monocytes.** *Seminars in Immunology* Academic Press, , 1 fev. 2018.

MUXEL, S. M. et al. **Arginine and polyamines fate in leishmania infection.** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 15 jan. 2018.

NETEA, M. G. et al. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 75, n. 5, p. 749–755, 1 maio 2004.

NOËL, W. et al. **Alternatively activated macrophages during parasite infections.** *Trends in Parasitology* Elsevier Ltd, , 2004.

PARK, E. J. et al. ERK pathway is activated in bare-FeNPs-induced autophagy. *Archives of Toxicology*, v. 88, n. 2, p. 323–336, fev. 2014.

CADIOLI, Luiz Paulo; SALLA, Luzia Dizulina. **Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia.** *Revista de Ciências exatas e tecnologia*, v. 1, n. 1, p. 98-105, 2006.

LUIZ, JOSÉ EDUARDO MONTEIRO DE SÁ. **ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE MATRIZES DE URÂNIO DOPADAS COM EURÓPIO. TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA ENTRE O UO E O Eu.** 3. 2007. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

PAYNE, DERRICE; KUBES, P. A. U. L. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 265, n. 1, p. G189-G195, 1993.

POLLARD, J. W. **Trophic macrophages in development and disease.** *Nature Reviews Immunology*, abr. 2009.

PRADEU, T.; COOPER, E. L. The danger theory: 20 years later. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. SEP, 2012.

PRILEPSKII, A. Y. et al. **Urokinase-Conjugated Magnetite Nanoparticles as a Promising Drug Delivery System for Targeted Thrombolysis: Synthesis and Preclinical Evaluation.** *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 10, n. 43, p. 36764–36775, 31 out. 2018.

SANDHIYA, S.; DKHAR, S. A.; SURENDIRAN, A. **Emerging trends of nanomedicine - an overview.** *Fundamental and Clinical Pharmacology*, jun. 2009.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. **Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 208, n. 1-2, p. 71-80, 2000.

SARKAR, B. et al. **Nanotechnology: A next-generation tool for sustainable aquaculture.** *Aquaculture Elsevier B.V.*, , 15 jan. 2022.

SARKAR, P. K.; DAS MUKHOPADHYAY, C. Ayurvedic metal nanoparticles could be novel antiviral agents against SARS-CoV-2. **International Nano Letters**, v. 11, n. 3, p. 197–203, set. 2021.

SCHWANDNER, R. et al. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 25, p. 17406–17409, 18 jun. 1999.

SHARKEY, J. et al. Functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles provide highly efficient iron-labeling in macrophages for magnetic resonance-based detection in vivo. **Cytherapy**, v. 19, n. 4, p. 555–569, 1 abr. 2017.

SHIN, S. J. et al. **Neuronal and endothelial nitric oxide synthase expression in outer medulla of streptozotocin-induced diabetic rat kidney.** *Diabetologia*, v. 43, p. 649-659, 2000.

SHOENFELT, J. et al. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 2, p. 303–312, 30 abr. 2009.

STENGER, Steffen et al. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 4, p. 1501-1514, 1996.

SUN, J. et al. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v. 3, p. 276–284, 2003.

SUZUKI, Yoshihisa et al. A new drug delivery system with controlled release of antibiotic only in the presence of infection. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials**, v. 42, n. 1, p. 112-116, 1998.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 3–9, 2004.

TAKEDA, Kiyoshi; AKIRA, Shizuo. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. **Genes to Cells**, v. 6, n. 9, p. 733-742, 2001.

TAKEUCHI, Osamu et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 443-451, 1999.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. **Pattern Recognition Receptors and Inflammation**. CellElsevier B.V., , 2010.

THOREK, D. L. J. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 34, n. 1, p. 23–38, jan. 2006.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 2, p. E128–E147, jun. 2007.

VUONG, T. K. O. et al. Synthesis of high-magnetization and monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles via thermal decomposition. **Materials Chemistry and Physics**, v. 163, p. 537–544, 1 ago. 2015.

WANG, W. et al. **Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration**. **Journal of Nanobiotechnology**BioMed Central Ltd., , 10 jul. 2019.

WANG, Y. X. J.; HUSSAIN, S. M.; KRESTIN, G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: Physicochemical characteristics and applications in MR imaging. **European Radiology**, v. 11, n. 11, p. 2319–2331, 2001.

WENGER, S. L. et al. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. **Bioscience Reports**, v. 24, n. 6, p. 631–639, dez. 2004.

XU, Y. et al. The responses of immune cells to iron oxide nanoparticles. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 543–553, 1 abr. 2016.

YAN, Zhong-qun et al. Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. **Circulation research**, v. 79, n. 1, p. 38-44, 1996.

YEN, H. J.; HSU, S. H.; TSAI, C. L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. **Small**, v. 5, n. 13, p. 1553–1561, 3 jul. 2009.

YOSHIMURA, A. et al. Cutting Edge: Recognition of Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components by the Innate Immune System Occurs Via Toll-Like Receptor 2. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 1, p. 1–5, 1 jul. 1999.

ZANGANEH, S. et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 11, p. 986–994, 1 nov. 2016.

ZHENG, B. et al. Targeted delivery of tungsten oxide nanoparticles for multifunctional anti-tumor therapy: Via macrophages. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 6, p. 1379–1389, 1 jun. 2018.