Fernando Alvieri

**MARCAÇÃO DE GRANULÓCITOS COM NANOPARTÍCULAS
DE ÓXIDO DE FERRO**

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

São Paulo

2018

Fernando Alvieri

**MARCAÇÃO DE GRANULÓCITOS COM NANOPARTÍCULAS
DE ÓXIDO DE FERRO**

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Lionel Fernel Gamarra

São Paulo

2018

A475m

Alvieri, Fernando

Marcação de granulócitos com nanopartículas de óxido de ferro /
Fernando Alvieri. -- São Paulo, 2018.
xviii, 79 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde
Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Labelling granulocytes with iron oxide nanoparticles.*

1. Granulócitos. 2. Nanopartículas de óxido de ferro. 3. Diagnóstico
por imagem. 4. Tomografia computadorizada com tomografia por
emissão de pósitrons. 5. Espectroscopia de ressonância magnética.

NLM – WN 180

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Fernando Alvieri

**MARCAÇÃO DE GRANULÓCITOS COM NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE FERRO**

Presidente da banca: Prof. Dr. Lionel Fernel Gamarra

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Dra. Luciana Cavalheiro Marti

Dra. Jessica Ruivo Maximino

Dr. Leonardo Lima Fuscaldi

Membros suplentes:

Dr. Reynaldo de Jesus Garcia Filho

Dr. George Coura Filho

Aprovada em: 23/01/2019.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, principalmente meus pais, que sempre estiveram do meu lado, me dando muito amor e carinho, mesmo distantes.

Minha gratidão aos amigos do setor de medicina, pela ajuda e confiança. O presente trabalho é também dessa equipe.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela proteção e por iluminar meu caminho.

Agradeço ao Hospital Israelita Albert Einstein pela confiança e oportunidade de realizar meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal.

Ao setor de Medicina Nuclear pelo apoio e suporte para realização desse trabalho.

Ao Dr. Luiz Vicente Rizzo e toda a equipe do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEP). A todos os funcionários em especial à Laudicéia Almeida por todo auxílio e paciência e aos professores do Departamento de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein.

A todos os biomédicos do meu setor, que por muitas vezes se sacrificaram para que eu pudesse realizar experimentos do presente projeto.

Aos técnicos de enfermagem pelo auxílio na coleta dos voluntários e aos voluntários pela contribuição no trabalho.

Aos meus pais pelo suporte e ajuda nessa fase profissional, espero retribuir ao meu futuro filho o amor e carinho que recebi.

Agradeço minha namorada, Tainá Dias, pela paciência, companheirismo e ajuda nesse momento de nossas vidas.

Aos amigos Javier Bustamante e Hélio Rodrigues pelos ensinamentos e colaborações vitais nesse projeto.

A Dra. Luciana Cavaleiro Marti pela contribuição acadêmica e auxílio na construção dessa dissertação.

A Marycel Figols de Barboza pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, que nunca me deixou desistir. Jamais esquecerei e serei eternamente grato por tudo.

Ao meu orientador Dr. Lionel Gamarra, que sempre acreditou no meu trabalho e compartilhou conhecimentos que levarei para toda vida.

A todos meus amigos. Sem a colaboração de todos, esse trabalho não existiria.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste projeto.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e prove o contrário.”
(Albert Einstein)

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiv
Lista de abreviaturas	xv
Resumo	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Resposta inflamatória	5
2.2 Métodos de diagnóstico.....	8
2.2.1 Cintilografia para processos inflamatórios e infecciosos	8
2.2.2 Tomografia por emissão de pósitrons para diagnóstico de inflamação e infecção	9
2.2.3 Cintilografia com leucócitos marcados	11
2.3 Nanopartículas magnéticas	12
2.3.1 Síntese de nanopartículas magnéticas.....	14
2.4 Granulócitos estimulados com lipopolissacarídeo	16
2.5 Imagem por ressonância magnética como alternativa para detecção de processos inflamatórios	18
3 MÉTODOS	21
3.1 Fonte da amostra de sangue para obtenção de granulócitos.....	21
3.2 Coleta do sangue venoso periférico	22
3.3 Processos de separação dos granulócitos	23
3.3.1 Método de densidades usando Percoll.....	23
3.3.2 Método gradientes de Percoll com PBS	24
3.3.3 Método solução balanceada de sais Hank sem vermelho de fenol	25
3.3.4 Método solução balanceada de sais Hank com vermelho de fenol	25
3.3.5 Método gradientes de Percoll e Ficoll.....	26
3.4 Visualização morfológica dos granulócitos	27
3.5 Avaliação da pureza da separação dos granulócitos por citometria de fluxo	28
3.6 Acoplamento do cobre nas nanopartículas revestidas com quitosana	29

3.7	Quantificação do teor de cobre nas nanopartículas revestidas com quitosana mediante a técnica de espectrometria de massas.....	30
3.8	Caracterização da morfologia das nanopartículas revestidas com quitosana e cobre	31
3.9	Caraterização relaxométrica das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana mediante a técnica de imagens por ressonância magnética.....	31
3.10	Marcação dos granulócitos com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana	32
3.11	Visualização da captação das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana pelos granulócitos	33
3.12	Quantificação da internalização de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana pelos granulócitos mediante imagens de ressonância magnética.....	34
3.13	Viabilidade dos granulócitos por citometria de fluxo	35
3.14	Síntese de nanopartículas de óxido de ferro	37
4	RESULTADOS	39
4.1	Processo de separação dos granulócitos	39
4.1.1	Método densidades de Percoll	39
4.1.2	Método gradientes de Percoll com tampão fosfato salino	40
4.1.3	Método solução balanceada de sais Hank sem vermelho de fenol	41
4.1.4	Método solução balanceada de sais Hank com vermelho de fenol	41
4.1.5	Método Percoll e Ficoll	42
4.2	Avaliação da pureza da separação dos granulócitos por citometria de fluxo	44
4.3	Acoplamento do cobre nas nanopartículas revestidas com quitosana	45
4.4	Quantificação do teor de cobre nas nanopartículas de óxido de ferro revestida com quitosana mediante a técnica de espectrometria de massa	46
4.5	Caracterização da morfologia das nanopartículas de óxido de ferro e revestidas com quitosana e cobre acoplado.....	48
4.6	Caraterização relaxométrica das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana mediante a técnica de imagens por ressonância magnética.....	49
4.7	Visualização da captação das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana pelos granulócitos	52
4.8	Quantificação da internalização de NPOF pelos granulócitos mediante IRM.....	53
4.9	Viabilidade dos granulócitos nos métodos de isolamento	56
4.10	Viabilidade dos granulócitos marcados	60

4.10.1 Viabilidade dos granulócitos após o isolamento	60
4.10.2 Viabilidade dos granulócitos marcados com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado.....	60
4.10.3 Viabilidade dos granulócitos marcados com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado com adição de N–acetil–L cisteína	61
4.10.4 Viabilidade dos granulócitos marcados com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado com ativação por lipopolissacarídeos	63
4.11 Sínteses de nanopartículas de óxido de ferro pelo método de coprecipitação.....	65
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES	72
7 REFERÊNCIAS	74
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Processo de maturação dos neutrófilos na medula óssea até sair para corrente sanguínea.....	7
Figura 2. Aplicações das nanopartículas magnéticas.....	13
Figura 3. Características das nanopartículas de óxido de ferro.....	14
Figura 4. Processo de ativação bioquímica na presença do lipopolissacarídeos	18
Figura 5. Desenho experimental do estudo	21
Figura 6. Representação esquemática do processo para marcação com cobre das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana.....	30
Figura 7. Representação esquemática do processo de coprecipitação para a síntese de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana.....	38
Figura 8. Resultado final do método gradientes de Percoll	40
Figura 9. Método Percoll com PBS, mostrando a sedimentação de todas as células no fundo tudo Falcon.....	40
Figura 10. Resultado da centrifugação do sangue total com Percoll sem vermelho de fenol.....	41
Figura 11. Método de separação de neutrófilos utilizando gradientes de Percoll formando dois halos (I e II)	42
Figura 12. Método de separação de neutrófilos utilizando gradientes de Percoll (formando níveis I e II).....	43
Figura 13. Comparação dos métodos Percoll solução balanceada de sais Hank e vermelho de fenol com a adição posterior do Ficoll.....	43
Figura 14. Avaliação da eficiência de separação de granulócitos por citometria de fluxo	44
Figura 15. Células contaminantes do método Percoll e Ficoll	45
Figura 16. Etapas do procedimento para acoplamento de cobre nas NPOF _{qui}	46
Figura 17. Gráfico da intensidade, em unidades de contagem por segundo (cps), determinado por espectrometria de massas <i>versus</i> concentração de cobre (Cu), em unidades de ppb, de amostras padrão	47
Figura 18. Gráfico de barras da carga de cobre em nano gramas (ng), determinada mediante escetometria de massas, nas amostras de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado-Cu nas condições de pH 3; 4 e 5,5.....	47

Figura 19. Curva da intensidade do sinal em unidades arbitraria (U.A.), <i>versus</i> o diâmetro, em nanômetros (nm) representando a distribuição do tamanho hidrodinâmico para nanopartículas de óxido de ferro e quitosana com cobre acoplado	48
Figura 20. Imagens obtidas mediante a técnica de imagens por ressonância magnética utilizando a sequência SE-MS nas diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre (0,5,10,15,20,25,30,35,40 e 50µg/mL).....	49
Figura 21. Curvas da intensidade do sinal (U.A.) de IRM em função do TE (ms) para amostras de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado nas concentrações de 5 a 50µgFe/mL	50
Figura 22. Gráfico de barras do tempo de relaxação transversal (T2) em função da concentração de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana nas concentrações de ferro analisadas.....	51
Figura 23. Correlação entre a taxa de relaxação $R_2=1/T_2$ e a concentração nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana nas concentrações de ferro analisadas	51
Figura 24. Avaliação da marcação por azul de Prússia da marcação dos granulócitos com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana na ausência (A,C) e presença de LPS (B,D). (A,B) 100x, (C,D)40x.....	52
Figura 25. Avaliação da marcação por azul de Prússia da marcação dos neutrófilos com NPOFqui-Cu na ausência (A,C) e presença de LPS (B,D). (A,B) 60x, (C,D)40x...	53
Figura 26. Imagens obtidas mediante a técnica de ressonância magnética utilizando a sequência <i>Spin Echo – Multi Slice</i> de granulócitos (10^6), sob a influência de lipopolissacarídeos, marcados com 30µgFe/mL de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana.....	54
Figura 27. Curvas da intensidade do sinal (U.A.) em função do tempo de <i>echo</i> (ms) para amostras de granulócitos (10^6), evidenciando a influência de lipopolissacarídeos, marcados com 30µgFe/mL de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana.....	55
Figura 28. Histograma do tempo de relaxação transversal, T2 para amostras de granulócitos (10^6), evidenciando a influência de lipopolissacarídeos, marcados com 30µgFe/mL de nanopartículas.....	56
Figura 29. Viabilidade celular dos granulócitos isolados pelo método de isolamento gradientes de Percoll.....	57

Figura 30. Viabilidade celular dos granulócitos isolados pelo método de isolamento Percoll mais Ficoll.....	58
Figura 31. Granulócitos isolados pelo método gradientes de Percoll e coloração de Panótico em aumento de 40x.....	59
Figura 32. Granulócitos isolados pelo método Percoll mais Ficoll e coloração de Panótico em aumento de 40x.....	59
Figura 33. Viabilidade celular dos granulócitos isolados pelo método de isolamento Percoll mais Ficoll.....	60
Figura 34. Viabilidade celular dos granulócitos isolados e marcados com NPOFqui-Cu	61
Figura 35. Viabilidade celular dos granulócitos marcados com NPOFqui-Cu com adição de 10mM/mL de NAC	62
Figura 36. Viabilidade celular dos granulócitos marcados com NPOFqui-cu com adição de 30mM/mL de NAC	63
Figura 37. Viabilidade celular dos granulócitos ativados com LPS e marcados com NPOFqui-cu.....	64
Figura 38. Histograma de apoptose nas diferentes condições para avaliar a viabilidade dos granulócitos realizados por citometria de fluxo	65
Figura 39. Imagens mostrando as etapas do processo de síntese de nanopartículas a base de oxido de ferro	66

Lista de tabelas

Tabela 1. Gradientes de densidades diferentes de Percoll para isolamento de granulócitos dos leucócitos totais	24
Tabela 2. Gradientes de densidades de Percoll com PBS.....	24
Tabela 3. Gradientes de densidades diferentes de Percoll com HBSS sem vermelho de fenol.....	25
Tabela 4. Gradientes de Percoll com solução balanceada de sais Hank com vermelho de fenol.....	26
Tabela 5. Anticorpos e suas respectivas quantidades no volume de amostra de granulócitos	28
Tabela 6. Programa de temperatura e pressão no micro-ondas TITAN (PerkinElmer) para a digestão das nanopartículas revestidas com quitosana acopladas cobre	30
Tabela 7. Valores da carga de cobre, em nano gramas, determinadas mediante a técnica de espectrometria de massas para amostra de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado nas três condições de pH analisadas	48
Tabela 8. Distribuição das concentrações de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana no <i>phantom</i> em solução de agarose 1% e valores de T2 incluindo as incertezas $\Delta T2$	50
Tabela 9. Valores de t2 e resultados da quantificação determinados por ressonância magnética para amostras de granulócitos (10^6), evidenciando a influência de lipopolissacarídeos, marcados com 30 μ gFe/mL de nanopartícula de óxido de ferro revestida com quitosana.....	56

Lista de abreviaturas

^{64}Cu	Isótopo de cobre radioativo 64
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnécio99 meta estável
CD	Grupo de diferenciação
CT	Tomografia computadorizada
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra acético
F^{18}	Flúor ¹⁸
FDG	Flúor deoxiglucose
GLUT	Transportadores de glicose
HBSS	Solução balanceada de sais de Hank
hG-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos humanos
HMPAO	Hexametilpropileno–amino–oxime
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
IFN	Interferon
^{111}In	Índio111
IRF3	Fator regulatório de interferons -3 (<i>Transcription factor regulatory</i>)
KeV	<i>Kilo eletron Volt</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
LSO	Oxiortosilicato de lutécio
LYSO	Oxiortosilicato de lutécio e ítrio
MeV	<i>Mega eletron Volt</i>
NAC	N-Acetil-L-cisteína
NaF	Fluoreto de sódio
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NP	Nanopartículas
NPOF	Nanopartículas de óxido de ferro
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PBS	Tampão fosfato salino (<i>phosphate buffer saline</i>)
PEG	PolietineloGlicol

PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PET/CT	Tomografia por emissão de pósitrons com tomografia computadorizada
PET/RM	Tomografia por emissão de pósitrons com ressonância magnética
PI	Iodeto de propídio
RM	Ressonância magnética
RPM	Rotações por minuto
SE-MS	<i>Multi-contrast turbo-spin echo</i>
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único (<i>single positron emission computer tomography</i>)
TE	Tempo de <i>echo</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
VF	Vermelho de fenol

Resumo

Introdução: Um processo inflamatório desencadeia um acúmulo de granulócitos na área de injúria, essas células são importantes na defesa contra patógenos e reparo tecidual. O diagnóstico precoce de uma inflamação pode encurtar o tempo de internação e diminuir mortalidade e morbidade, tendo em vista a fisiopatologia dos granulócitos, a marcação dessas células com agentes de contraste podem auxiliar no diagnóstico em equipamentos de imagem. A marcação com nanopartículas de óxido de ferro e um isótopo radioativo nos granulócitos podem contribuir no diagnóstico com uso de equipamentos híbridos como tomografia por emissão de pósitrons combinados com ressonância magnética. **Objetivos:** Realizar a marcação de granulócitos com nanopartículas de óxido de ferro recobertas de quitosana, estudo de viabilidade e sensibilidade no equipamento híbrido PET/RM. **Métodos:** O isolamento dos granulócitos, afim de conseguir alta pureza celular foram testados em 5 metodologias diferentes, confirmado por citometria de fluxo. A síntese das nanopartículas de ferro com cloreto de cobre estável foi realizada e avaliada por espectroscopia de massa e imagens de ressonância magnética. Os granulócitos foram marcados com nanopartículas de óxido de ferro e revestidas com quitosana e acoplado cobre na forma estável. Na marcação os granulócitos foram ativados pela presença de lipopolissacarídeos na tentativa de aumentar a carga de ferro internalizado nos granulócitos. Foram adicionados previamente as nanopartículas N-acetil_l_cisteína para reduzir o número de apoptose dos granulócitos. A viabilidade dos métodos de isolamento e de marcação foi realizada para adequar o melhor método. **Resultados:** O método de separação dos granulócitos que apresentou melhor pureza foi com gradientes de Percoll seguidos de Ficoll, técnica que apresentou 95% de granulócitos contra 82% dos outros métodos com 99% de células viáveis. O acoplamento do cobre nas nanopartículas revestidas com quitosana foi mais eficaz com pH de 5,5, tanto as nanopartículas com cobre estável como as somente revestidas com quitosana foram marcadas nos granulócitos isolados, com e sem ativação por lipopolissacarídeos, a internalização foi visualizada pela coloração de azul de Prússia e por imagens de ressonância magnética apresentando uma maior internalização nas células ativadas com menor sinal de T2 e maior concentração da coloração sem alteração significativa da viabilidade. A adição de N-acetil_l_cisteína nos granulócitos reduziu o número de

apoptose em granulócitos marcados com NPOF 22% para 1,2%. **Conclusão:** O isolamento com alta pureza de granulócitos foi necessário para melhorar a eficiência de detecção do processo inflamatório. A técnica combinada de Percoll e Ficoll apresentou alta pureza de granulócitos; estas células que podem ser marcadas com nanopartículas de óxido de ferro com quitosana e nanopartículas de óxido de ferro com quitosana e cobre como agente de contraste em imagens por ressonância magnética, a adição de N-acetil_l_cisteína tem um papel protetor nos granulócitos quando marcados com nanopartículas, as células ativadas internalizam mais carga de ferro aumentando o contraste, sem sofrer apoptose e podendo ser uma alternativa como diagnóstico por imagem.

1 INTRODUÇÃO

Um processo inflamatório pode ser descrito como uma combinação de eventos que ativam uma resposta imunológica, neutralizando e removendo e iniciar etapas de cicatrização. Ou seja, o sistema imunológico é compreendido por um conjunto sofisticado de estruturas biológicas que desencadeiam estratégias funcionais para proteger o organismo.^(1,2)

O diagnóstico e localização dos processos inflamatórios e infecciosos permitem um tratamento bem-sucedido e diminuem a morbidade associada. Isso inclui exames clínico e exames laboratoriais, e em casos de difícil acesso, imagens metabólicas e anatômicas.^(3,4)

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) tem, potencialmente, várias vantagens importantes em relação à imagem convencional com gama câmara. O radiofármaco PET ideal para marcar leucócitos deve possibilitar uma elevada eficiência de marcação sem alterar a viabilidade celular. O radiotraçador deve ser de meia-vida física adequada para tornar prática a marcação “*in vitro*” e realizar imagens tardias.⁽⁵⁾

Desafios em diagnóstico por imagem têm levado ao interesse na combinação de modalidades de imagem para interpretar com maior precisão a doença e alterações *in vivo*. Combinações de modalidades de imagem estão sendo investigados por um efeito sinérgico, e a combinação de PET com ressonância magnética (PET/RM) elevou as expectativas para a imagem altamente sensível e de alta resolução.^(6,7) PET e ressonância magnética (RM) são complementares entre si, dada a alta resolução espacial anatômica da RM e a alta sensibilidade e imagem funcional de PET.⁽⁸⁾ Monitoramento não invasivo de anomalias fisiológicas *in vivo* promete aumentar consideravelmente o conhecimento e tratamento de doenças.

Duas técnicas de imagem da medicina nuclear são atualmente utilizadas como ferramentas para o diagnóstico de doenças infecciosas e inflamatórias como o PET e a tomografia por emissão de fótons únicos (SPECT). Em geral é realizada utilizando leucócitos radiomarcados.⁽⁹⁾

O citrato-⁶⁷Ga é utilizado na pesquisa de inflamação, pois é um análogo da transferrina (proteína que se eleva em reações inflamatórias), mas que apresenta algumas desvantagens: baixa resolução e especificidade, longo tempo para realizar imagem e captação fisiológica no intestino.⁽¹⁰⁾

A marcação de leucócitos com oxima- ^{111}In foi muito utilizada para o diagnóstico de inflamação e/ou infecção.^(11,12) Esta técnica tem como desvantagem a emissão de fótons gama de alta energia e do radioisótopo ter uma meia vida física longa de 67 horas, forçando o paciente a fazer imagem em dois dias.⁽¹⁰⁾ Outro radiotraçador é o tecnécio $^{99\text{m}}\text{Tc}$ meta estável ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) que por intermédio do hexametilpropileno-amino-oxime (HMPAO) é um marcador de leucócitos com menor taxa de exposição e tem como vantagem a facilidade de adquirir o $\text{Tc}^{99\text{m}}$ por meio de geradores; porém apresenta uma imagem com menos resolução espacial devido a emissão de fótons únicos.⁽¹¹⁾

O flúor ^{18}F com um análogo da glicose flúor deoxiglicose (FDG) administrado de forma endovenosa é amplamente utilizado para a imagem de uma variedade de neoplasias através de imagens metabólicas, porém o FDG pode se acumular em locais de infecção e inflamação, sendo um marcador não específico.⁽¹²⁾ A marcação de leucócitos humanos com FDG- ^{18}F PET tem várias vantagens sobre a cintilografia convencional com outros marcadores por apresentarem maior resolução espacial em equipamentos híbridos como PET-CT, e possui vantagens como alta sensibilidade e especificidade se comparada ao FDG- ^{18}F endovenoso, e a alta qualidade de imagem do PET, porém o processo de marcação de leucócitos com FDG- ^{18}F é variável e instável e devido à meia vida curta de duas horas, imagens tardias são comprometidas.^(13,14)

O isótopo de cobre radioativo (^{64}Cu) é um metal carregado positivamente, e com a utilização de um agente quelante pode marcar células leucocitárias. Apresenta vantagem em relação a outros métodos, pois é um radionuclídeo emissor de pósitrons com tempo de meia vida física de 12,7 horas, adequado para marcação de leucócitos na realização de imagens tardias, para observar acúmulo dessas células em processos inflamatórios e infecciosos. O Cu^{64} oferece propriedades apropriadas que combinam três tipos de decaimento, captura de elétrons (41%), β^- (40%) e β^+ (19%) e também resulta em emissão de elétrons Auger com potencial terapêutico. A química de produção do Cu^{64} podem potencialmente ser ligados a peptídeos e outras moléculas, anticorpos, proteínas e nanopartículas (NP) biologicamente relevantes.^(15,16)

Por outro lado, a nanotecnologia tem emergido como uma excelente ferramenta para a geração de NP para diagnóstico ou fins terapêuticos. Entre as NP, os inorgânicos têm atraído grande interesse, dadas as suas propriedades físicas

intrínsecas e dimensões adequadas para uso na nanomedicina. O melhor exemplo pode ser encontrado nas nanopartículas de óxido de ferro (NPOF) que podem ser utilizadas como agentes de contraste para RM.⁽¹⁷⁾

Estas NPOF podem ser ligadas a diversos radionuclídeos como ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu , entre outras. Desta forma seria possível obter uma NP multifuncional que poderia ser detectada tanto pela técnica de RM como no PET. Particularmente, a conjugação de NPOF com o Cu^{64} tem um grande potencial de aplicação clínica, sendo uma destas aplicações a detecção dos processos infecciosos/inflamatórios quando marcados nos leucócitos. A importância da marcação com ^{64}Cu se sustenta porque possui meia-vida de 12,7 horas, decaindo através da emissão de pósitrons β^- e β^+ e captura eletrônica. Os pósitrons emitidos são partículas β^+ com energia de 1,92MeV. Quando o pósitron aniquila-se com um elétron, emite dois fótons gama, em direções opostas, com energia de 511KeV cada. Como o ^{64}Cu é um emissor de pósitrons e, portanto, captado através de câmara PET, ele fornece uma imagem com qualidade, sensibilidade e velocidade superiores em comparação aos obtidos com gama câmara convencional, utilizando índio111 (^{111}In) e/ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Isso facilita o diagnóstico da doença quando esta não pode ser detectada por imagem estrutural, através de tomografia computadorizada (TC) e/ou imagens por Ressonância Magnética (IRM).^(16,18-20)

Portanto uma técnica de isolamento, com alta pureza, de células importantes para um processo inflamatório, como os granulócitos, e sua marcação com agente de detecção se apresentam como promissoras para auxiliar no diagnóstico de difícil acesso em equipamentos de RM e PET.

1.1. Objetivos

1. Marcar granulócitos com nanopartículas à base de óxido de ferro recobertas de quitosana e acopladas com cobre como estratégia translacional para estudos de processos inflamatórios e infecciosos de difícil acesso.
2. Separar os granulócitos a partir do sangue venoso periférico.
3. Avaliar a pureza de separação dos granulócitos por citometria de fluxo.

4. Realizar o acoplamento de cobre nas NPOF recobertas com quitosana (NPOF_{qui-Cu}) assim como a quantificação do acoplamento.
5. Realizar a caracterização morfológica e relaxométrica das NPOF_{qui}.
6. Realizar a marcação dos granulócitos com NPOF_{qui} e NPOF_{qui-Cu} e sua visualização microscópica.
7. Quantificar a internalização das NPOF após marcação dos granulócitos mediante a técnica de IRM.
8. Realizar marcações com NPOF_{qui} e NPOF_{qui-Cu} dos granulócitos ativados pela presença de LPS.
9. Obter a viabilidade celular após o processo de isolamento e marcação dos granulócitos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resposta inflamatória

A função imunológica de um organismo é didaticamente dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata representa uma resposta rápida e guiada por estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes patogênicos.^(1,2)

As principais células efectoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *natural killer* (NK). Fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata, ativados em processos inflamatórios.⁽²¹⁾

Inflamação é um processo biológico de diferentes etiologias, que pode ser acionado com a ultrapassagem, de um agente físico, químico e biológico das barreiras de defesa do organismo.⁽²⁾ Tem como função recompor o tecido lesado e combater à agentes patógenos, através da ativação de componentes específicos e não específicos do sistema imune. Durante um processo inflamatório decorrente de um agente patógeno ocorre alguns eventos celulares e vasculares. Entre eles podemos destacar: Dilatação de vasos sanguíneos, que aumentam a permeabilidade e fluxo sanguíneo, acúmulo de líquidos na região, compostos por proteínas plasmáticas e anticorpos, deslocamento de células de defesa de dentro dos vasos para a área de interesse, esses eventos podem gerar sinais clássicos como calor, rubor, dor, tumor e perda de função.⁽²²⁾

Os leucócitos são células que tem como principais funções; combater a um agente patógeno; remoção de células degradadas e reparo tecidual. Os leucócitos são células do tecido sanguíneo que correspondem a 30% de sua constituição. Em seres humanos normais o valor médio de leucócitos deve ficar entre 4 a 12 mil células por microlitro de sangue.⁽²³⁾

Todas as células que constituem o sangue são derivadas das células troncos hematopoiéticas multipotentes da medula óssea, dessas células se

originam células progenitoras da linhagem mielóide e células progenitoras da linhagem linfóides.^(23,24)

As células progenitoras da linhagem linfóide darão origem às células NK e aos linfócitos. As células progenitoras da linhagem mielóide são precursores de mastócitos e os granulócitos.⁽²⁵⁾

Os granulócitos são nomeados de tal forma pois apresentam grânulos em seu citoplasma, essas células podem ser referidas também como leucócitos polimorfonucleares.⁽²⁵⁾ Dentro dos granulócitos podemos destacar três tipos celulares diferentes: os eosinófilos os basófilos e os neutrófilos. Os eosinófilos, apresentam em seu citoplasma grânulos com afinidade ao corante eosina. Essas células estão envolvidas em principalmente defesa contra infecções por parasitas. Os basófilos que se apresentam com grânulos de grande tamanho em todo seu citoplasma tem função de liberar histamina e fatores quimiotáticos para outras células. Os neutrófilos são as células de defesa mais abundantes do sangue. São caracterizados por seu núcleo lobulado e grânulos no seu citoplasma, apresentam formato esférico de aproximadamente 10 a 15 μm e são as primeiras células a se deslocar do vaso até o local de inflamação.^(25,26)

Os neutrófilos representam aproximadamente 70% dos leucócitos e mais de 10^{11} células são produzidas na medula óssea diariamente.⁽²⁷⁾ Foram descobertos por Paul Erlich quando por técnicas de coloração pode observar os núcleos lobulados com afinidade à corantes neutros, assim denominados neutrófilos.

Apresentam em seu citoplasma grânulos que contem enzimas citotóxicas, hidrolíticas e catiônicas responsáveis pelo combate à um agente patógeno fazendo a defesa do hospedeiro.⁽²⁸⁾ São células que não tem a habilidade de se autorregenerar. Para os neutrófilos se tornarem células maduras e saírem da medula para a circulação, devem passar por um processo de maturação. Esse processo passa pelos estágios de mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito e depois neutrófilo maduro, como mostrado a figura 1.

1: Célula tronco hematopoéticas pluripotentes; 2: Células progenitoras mielóides; 3: mieloblasto; 4: promielócitos; 5: mielócito; 6: metamielócito; 7: neutrófilo maduro.

Fonte: Traduzido e adaptado de Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol.* 2018;9:113. Figure 2, Granulopoiesis. Neutrophils are produced in the bone marrow. From a self-renewing hematopoietic stem cell (HSC), a multipotent progenitor (MPP) cell is formed. MPPs give rise to lymphoid-primed multipotent progenitors (LPMP), which differentiate into granulocyte-monocyte progenitors (GMP). These GMPs, under control of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) commit to neutrophil generation by turning into myeloblasts, which then follow a maturation process that includes the stages of promyelocyte, myelocyte, metamyelocyte, band cell, and finally a mature neutrophil; p. 3.⁽⁶⁾

Figura 1. Processo de maturação dos neutrófilos na medula óssea até sair para corrente sanguínea

Durante a maturação o núcleo sofre mudanças adquirindo o formato lobulado e ganha receptores em sua membrana.⁽²⁶⁾

Os neutrófilos quando atingem seu desenvolvimento final, estão aptos deixar a medula óssea e ir para a circulação sanguínea. A liberação dos neutrófilos é controlada, uma vez que apenas 1 ou 2% de todos os neutrófilos no corpo são encontrados no sangue em condições homeostáticas normais.⁽²⁷⁾

Uma citocina importante na maturação, regulação e proliferação dos neutrófilos é chamada de fator estimulante de colônia de granulócitos humanos (hG-CSF). Essa citocina é produzida por células do estroma da medula óssea, algumas células endoteliais e células de defesa como monócito e macrófagos. O hG-CSF tem como característica ser uma cadeia de peptídeos com 174 aminoácidos e apresentar uma cisteína livre.⁽²⁹⁾ A produção e liberação dessas citocinas são reguladas por interleucinas, fatores estimuladores de macrófagos e detecção da presença de lipopolissacarídeos (LPS).⁽³⁰⁾

O estímulo inflamatório regula a migração de células de defesa, para a área de interesse. O movimento de migração de leucócitos da corrente sanguínea para um tecido é chamado de Diapedese. A diapedese ocorre em três etapas: rolamento, adesão e transmigração.⁽²⁷⁾

O primeiro contato das células de defesa com o tecido é chamado de rolamento, o qual ocorre com o fluxo lento dos leucócitos sobre o tecido através de moléculas de adesão, as quais podemos destacar as selectinas e as integrinas. A principal função dessas moléculas de adesão é promover ligações entre os granulócitos e o endotélio. Com o aumento da aderência ocorre a diminuição do rolamento até seu completo estacionamento, iniciando a etapa de adesão.⁽²⁸⁾ Após aderidos no endotélio começa a etapa de migração para área de interesse.^(30,31)

2.2 Métodos de diagnóstico

O diagnóstico e localização dos processos inflamatórios e infecciosos permitem um tratamento bem-sucedido e diminuir a morbidade associada. Isso inclui exame clínico e exames laboratoriais, em processos inflamatórios de difícil acesso ou ocultos imagens metabólicas e anatômicas podem contribuir no diagnóstico.

Métodos de imagem anatômicas ou moleculares, tais como TC, RM, PET, tomografia por emissão de fóton único (SPECT - *single photon emission computer tomography*) e ultrassom, são técnicas de diagnóstico por imagem que podem auxiliar em processos inflamatórios e infecciosos. Cada uma destas modalidades tem as suas próprias limitações em termos de resolução espacial, sensibilidade e profundidade de penetração do sinal, que pode ser superado através da combinação de duas ou mais modalidades. O ultrassom, TC e RM são técnicas eficazes na detecção da inflamação sempre que a lesão tenha causado alterações na anatomia local, permeabilidade capilar ou tecidos moles; já SPECT e PET podem auxiliar no diagnóstico com imagens metabólicas.⁽³²⁾

2.2.1 Cintilografia para processos inflamatórios e infecciosos

A cintilografia é um exame de imagem que usa características de isótopos radioativos para um diagnóstico de processos inflamatórios e infecciosos. Um isótopo utilizado para diagnóstico de inflamação e infecção é o Gálio 67. O Gálio é um elemento da tabela periódica com comportamento biológico semelhante ao do ferro. Tem meia vida de 78 horas e emite três fotopicos de energia gama de 185, 300 e 394 KeV.⁽³³⁾ Em sua forma de citrato quando injetado na circulação sanguínea é ligado à

transferrina e a lactoferrina plasmática e tem sua eliminação corpórea pela urina e principalmente intestinal.^(33,34)

Após a administração do Gálio 67, o mesmo é transportado pela transferrina ao local de inflamação ou infecção devido ao aumento do fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular na área. Os neutrófilos também possuem um papel indireto no acúmulo de Gálio⁶⁷ na região doente, pois os neutrófilos ao perderem seus grânulos depositam uma grande quantidade de lactoferrina, para tentar inibir o crescimento bacteriano, permitindo assim sua ligação com o isótopo.⁽¹³⁾

A aquisição das imagens pode ser realizada após 24 ou 48 horas após a sua administração, tempo para ocorrer um acúmulo de material na área de interesse. Imagens de corpo inteiro e localizadas da área de interesse devem ser adquiridas para o diagnóstico.⁽⁷⁾

Devido a sua ligação com a transferrina acúmulo do material em fígado, baço e medula óssea e intestino são considerados como captações da biodistribuição normal. Captações fora da normalidade dentro de um estudo clínico podem ser consideradas como processos de infecciosos e inflamatórios.

A cintilografia com Gálio⁶⁷ tem como desvantagem a baixa resolução das imagens e sua baixa especificidade.

2.2.2 Tomografia por emissão de pósitrons para diagnóstico de inflamação e infecção

A PET é realizada com a detecção simultânea dos dois fótons provenientes da aniquilação do par elétron-pósitron.^(12,35)

O pósitron é uma partícula similar à um elétron, se diferenciando pela sua carga elétrica, que é positiva.⁽³⁶⁾

Em equipamentos PET, as imagens são formadas pela detecção em coincidência eletrônica dos fótons de aniquilação do par elétron pósitron pelos detectores em anéis do aparelho a linha que liga os dois detectores acionados é denominado de linha de resposta.⁽³⁶⁾

Para um evento ser considerado em coincidência, o intervalo do registro em dois detectores deve ser menor ou igual a um valor de 100ns, este valor pode variar da tecnologia do fabricante. Durante uma aquisição vários números de

eventos são registrados pelos detectores, porém as coincidências registradas não são, necessariamente oriundas de uma mesma aniquilação.⁽³⁷⁾

Fótons provenientes de uma mesma aniquilação e que atingem detectores simultâneos em sentidos opostos são chamados de coincidências verdadeiras gerando uma linha de resposta. Quando uma linha de resposta é registrada de fótons provenientes da mesma aniquilação, porém há um desvio com interação com a matéria recebe o nome de coincidência espalhada. Um evento registrado proveniente de duas aniquilações distintas é chamado de coincidência aleatória.⁽³⁶⁾

Sistemas PET compostos por uma tomografia computadorizada (TC) formam um equipamento híbrido chamado de PET/CT. Esse sistema permite aquisição de imagens por transmissão de raios x e imagens por emissão de pósitron. Permitindo imagens morfológicas e funcionais metabólicas.⁽³⁸⁾

A PET é um equipamento que utiliza pequenos blocos de detectores, dispostos em anéis. Os blocos são constituídos de cristais que atualmente podem ser de oxiortossilicato de lutécio (LSO) ou oxiortossilicato de lutécio e ítrio (LYSO).

O radionuclídeo mais utilizado em PET é o ^{18}F é produzido em um acelerador de partículas ciclotron, tem meia vida física de 109 minutos e decai por emissão de β^+ , ou seja, um elétron de carga positiva, originário do núcleo, chamado pósitron. Este interage com um elétron da eletrosfera, neste encontro as partículas se aniquilam, gerando dois fótons de 511keV em sentidos opostos.^(37,38)

A fluorodesoxiglicose marcada com F^{18} é um radiofármaco análogo da glicose e é usado como traçador do metabolismo glicolítico. O FDG- ^{18}F adentra à célula por um sistema transportador de glicose (GLUT) proteico expressado na membrana, e assim como a glicose sofre ação das enzimas responsáveis pela glicólise em especial a hexocinase. O FDG- ^{18}F ganha um fosfato pela ação enzimática e é retida no meio intracelular, e não é metabolizado, pois não serve de substratos para as demais vias glicolíticas.⁽³⁶⁾

Em processos infecciosos e inflamatórios há um processo glicolítico intenso, para quimiotaxia para células de defesa e reparo tecidual.⁽¹⁴⁾

Com equipamento híbrido PET/CT há a possibilidade de unir imagens anatômicas e metabólicas. Essa tecnologia com a união da FDG- ^{18}F pode auxiliar em um diagnóstico de inflamação.

2.2.3 Cintilografia com leucócitos marcados

Como alternativa para aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico de inflamação e infecção em 1970 foi iniciada a cintilografia com leucócitos marcados com a fisiologia corroborando com o diagnóstico por imagem.

O primeiro radioisótopo utilizado para marcação de leucócitos foi o Índio¹¹¹ decai por captura eletrônica emitindo radiação gama em fotópicos de 173 e 247 KeV. Sua meia vida física é de 67 horas.⁽³⁹⁾

O Índio¹¹¹ ligado a um complexo de 8- hidroxiquinolona (oxina) se torna uma molécula lipossolúvel sendo capaz de se internalizar por células. Ao ocorrer a internalização há dissociação da oxima do isótopo, assim o Índio¹¹¹ se liga a proteínas nucleares e citoplasmáticas e a oxima se difunde para o meio extracelular.⁽³⁹⁾

Devido suas características o oxima-In¹¹¹ é capaz de marcar indiscriminadamente qualquer célula sanguínea, hemácias, granulócitos, plaquetas ou linfócitos. Por esse motivo há a necessidade de separar os leucócitos do sangue total antes dessa marcação.⁽⁴⁰⁾

Esta técnica tem como desvantagem a emissão de fótons gama de alta energia e de ter uma meia vida física longa de 67 horas, o custo da produção do Índio¹¹¹ e sua disponibilidade também auxilia na sua não utilização.

Outro radiotraçador é o tecnécio^{99m} metaestável (^{99m} Tc) que por intermédio do HMPAO é capaz de realizar a marcação de leucócitos. O Tc^{99m} apresenta uma meia vida de 6 horas com emissão de fótons gama de 140 KeV. O ^{99m} Tc é o radioisótopo mais utilizado na medicina nuclear, sendo facilmente adquiridos por meio de geradores de Molibdênio⁹⁹-Tecnécio^{99m}. Suas características físicas são perfeitas para a marcação de vários fármacos e para realização de imagem em gama câmara.⁽⁴¹⁾

O HMPAO-^{99m} Tc é um radiofármaco utilizado também em estudos de perfusão cerebral. Dentro de uma célula se transforma em um composto hidrofílico e fica retido nas mitocôndrias e no núcleo.⁽⁴¹⁾

As duas marcações de leucócitos apresentam as mesmas biodistribuições normais: como fígado, baço e medula óssea. É necessária a separação prévia dos leucócitos, após a marcação os leucócitos devem ser injetados novamente no paciente. Os protocolos de aquisição das imagens também são similares, imagens

tardias de 24 horas, após a administração, deve ser realizada, assim respeitando o tempo do acúmulo de leucócitos marcados na área de interesse.^(39,41)

A marcação de leucócitos com HMPAO ^{99m} Tc apresenta doses reduzidas e tem como vantagem a facilidade de adquirir o Tc99m por meio de geradores comumente utilizados em uma rotina de serviços de medicina nuclear.

2.3 Nanopartículas magnéticas

A nanotecnologia é a ciência que trabalha com escala nanométrica, isto é, os tamanhos das partículas utilizadas em tais estudos se encontram na escala de 10^{-9} metros, sendo que a faixa de aplicação biomédica ideal está entre 1 e 100nm. Entre estas materias se destacam as NP com características magnéticas, como as NPOF, que são materiais com características singulares, de tamanho controlado, caráter magnético e biospecificidade.⁽⁴²⁾

As NPOF têm sido amplamente utilizadas para inúmeras aplicações biomédicas e de bioengenharia, tais como: tratamento direcionado ao câncer por hipertermia, administração guiada de medicamentos, terapia genética, análise de DNA e contraste para RM (Figura 2).⁽⁴³⁾

Fonte: Traduzido de Bohara RA., Thorat ND, Pawar SH. Role of functionalization: strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. RSC Advances. 2016;6(50):43989-4012. Review. Figure 14, Representing different nano-bioapplications of magnetic nanoparticles; p. 44003.⁽⁴³⁾

Figura 2. Aplicações das nanopartículas magnéticas

As NPOF apresentam características superparamagnéticas e por isso são capazes de gerar imagens hipointensas por RM, localizando assim as células ou leucócitos marcados com estas NPOF.⁽⁴⁴⁾

Estabilidade coloidal e biocompatibilidade das NPOF são requisitos importantes para a aplicação clínica. De um modo geral, as NPOF são compostas por um núcleo de um ou mais cristais magnéticos incorporados num revestimento de estabilização, como por exemplo, dextrano, citrato, polietilenoglicol (PEG) entre outras.^(44,45)

Existem diversos métodos de síntese de NPOF, sendo que a co-precipitação é um método amplamente utilizado, onde acontece a mistura de sais ferrosos e férricos em meio aquoso, na presença de estabilizadores, tais como polímeros hidrofílicos (Figura 3). Este processo tem sido comercialmente adaptado a geração de um número de agentes de contraste de RM baseados em múltiplos de óxido de ferro encapsulados dentro de núcleos de um revestimento de dextrana, quitosana.

Devido as características das NP com núcleo de óxido de ferro é possível a sua internalização em granulócitos já testado *in vivo* em modelos de inflamação de células do sistema nervoso. Na inflamação há um acúmulo de células de defesa que podem ser internalizadas por NPOF, resultando em um hiposinal de T2 quando submetidos em RM.⁽⁴⁶⁾

Como alternativa o uso de NPOF como contraste na RM, pode ser utilizado também como marcadores de moléculas de adesão, com anticorpos de selectinas, podendo gerar contraste em um processo inflamatório e infeccioso.⁽⁴⁶⁾

Fonte: Traduzido e adaptado de Sharifi S, Seyednejad H, Laurent S, Atyabi F, Saei AA, Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo molecular and cellular imaging. Contrast Media Mol Imaging. 2015;10(5):329-55. Figure 1, The different physiochemical properties of SPIONs affect their biokinetics and fate in vivo. These changes can be observed in uptake, distribution, metabolism, and excretion of SPIONs from body. Protein corona is yet another factor that is influenced by various physiochemical features of NPs and can, in turn, affect the targeting capabilities of SPIONs in imaging applications. Not only can protein corona alter the toxicity, uptake, targeting, and circulation time of SPIONs, but it can also affect the relaxivity of SPIONs as MRI contrast agents; p. 332.⁽⁴⁶⁾

Figura 3. Características das nanopartículas de óxido de ferro

Para realizar a síntese de NP magnéticas (NPM), destacam-se dois métodos: (1) processo sol-gel e (2) processo de coprecipitação. Descritos brevemente a seguir.

2.3.1 Síntese de nanopartículas magnéticas

Os avanços na nanotecnologia permitem a produção de NP com morfologias específicas e a adaptação de suas superfícies para manipular suas

características para atender aplicações específicas. Para tal, são desenvolvidas e executadas diversas técnicas para a obtenção de nanopartículas magnéticas. Entre elas, se destacam as técnicas de decomposição térmica, microemulsão, sol-gel, evaporação gasosa e coprecipitação. Cada qual possui vantagens e desvantagens e estas peculiaridades impactam diretamente nas características estruturais, magnéticas e morfológicas do material. Já para a síntese de NPM a base de óxido de ferro os métodos de síntese mais utilizados são o processo sol-gel e coprecipitação.

2.3.1.1 Sol-gel

O método de sol-gel baseia-se em solutos que são dissolvidos em meio alcoólico produzindo um gel, em temperatura ambiente. Entretanto, é necessário um tratamento em alta temperatura para a obtenção de um estado final cristalino. Assim, é possível reconhecer as propriedades magnéticas pelo aumento da reatividade nas superfícies das NP.⁽⁴⁷⁾

Vários parâmetros podem influenciar a síntese por sol-gel, são eles: pH, concentração, temperatura, agitação e propriedades do gel.

A técnica de sol-gel é amplamente utilizada por apresentar um bom controle quanto ao tamanho, estrutura e homogeneidade das NPM, fatores que mantêm a estabilidade e propriedades das mesmas. Entretanto, os resultados apresentam ligações enfraquecidas e baixa resistência ao desgaste.⁽⁴⁸⁾

2.3.1.2 Coprecipitação

O método mais convencional para produção de NPM é a coprecipitação. Este método consiste, basicamente, em dois processos que garantem o controle de distribuição e de tamanho das NP: a nucleação (formação de centros de cristalização) e o consequente crescimento de NP.

Para tal, se faz uso da coprecipitação de uma solução entre Fe^{3+} e Fe^{2+} em meio alcalino, com pH entre 8 e 14. Esta solução ocorre de acordo com a reação química:

Simultaneamente à supersaturação dos sais, ocorre a etapa de nucleação e, logo após, se dá o crescimento. Assim, se formam NPM esféricas e bem distribuídas.⁽⁴⁹⁾

Parâmetros como tamanho, formato e composição das NPM dependem do tipo de sais utilizados, da razão entre os mesmos, do valor do pH, da temperatura, entre outros.⁽⁵⁰⁾ As NP menores são obtidas a temperaturas mais altas. Porém, devido ao baixo limite de temperatura na qual essa síntese pode ser realizada (máximo de 100°C, temperatura de ebulição da água), geralmente há pouco controle de tamanho, distribuição, forma e cristalinidade. Entretanto, a coprecipitação é uma metodologia simples, de fácil reprodutibilidade, apropriado para produções em massa e por ser realizado em meio aquoso, além de resultar em NPM biocompatíveis.⁽⁵¹⁾

2.4 Granulócitos estimulados com lipopolissacarídeo

O sistema imune inato tem a capacidade de reconhecer estruturas produzidas por agentes patógenos. Essas estruturas são denominadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) que podem ser RNA de fita dupla, proteínas específicas de bactérias, e lipídeos sintetizados por microrganismos como os LPS.⁽³¹⁾ Assim como há o reconhecimento e ativação do sistema imune pelos PAMPs, há também um reconhecimento de moléculas liberadas de células que sofreram algum tipo de dano ou até morte celular. Essas substâncias levam o nome de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Algumas células do sistema imune inato produzem e liberam DAMPs para aumentar a resposta de defesa na presença de um agente patógeno.

Tanto os PAMPs como os DAMPs quando ligados à receptores específicos de células de defesa, como principalmente os neutrófilos, ativam vias de transdução de sinal capazes de promover funções de combate à patógenos e funções pró inflamatórias. Os LPS são moléculas presentes na membrana de bactérias Gram negativas, podendo ser liberado em um meio quando há uma divisão bacteriana ou degradação da bactéria por granulócitos.⁽³¹⁾

O LPS é composto por uma macromolécula glicolipídica com uma porção lipídica bifosforilada. O reconhecimento dessa molécula pelo sistema imune inato ocorre pela ativação do receptor *toll like receptor-4* (TLR4), que são expressos

por monócitos, macrófagos e neutrófilos. Os receptores TLR da superfície dos granulócitos quando reconhecem a molécula de LPS ativam proteínas como a MyD88, que transduz sinal para ativação de *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), responsável pela expressão gênica de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão no endotélio; e ativa uma via de sinalização de TRIF que por sua vez ativa o fator regulatório de interferons -3 (IRF3) induzindo a expressão de interferons (IFN).

Uma das principais vias ativadas pelo LPS é a via do fator de transcrição NF- κ B que é responsável pela regulação transcricional de genes promotores de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Essas citocinas, por sua vez desencadeiam uma sinalização para células do sistema imune. O processo bioquímico é mostrado na figura 4.

Após o reconhecimento e estímulo ao LPS, as citocinas regulatórias da ativação de NF- κ B destacamos chamada de fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina-1 que são um mediador de uma resposta inflamatória aguda na presença principalmente de bactérias pode ativar a via de apoptose, podem agir no hipotálamo elevando a temperatura do indivíduo. A interleucina-6 pode estimular a produção de neutrófilos na medula óssea e induzem os hepatócitos a produzirem fibrinogênio pra contribuir no reparo tecidual.

Os neutrófilos são recrutados ao local de injúria através da produção de TNF, IL-1 e IL-6 secretados no local induzindo a expressão de E-selectina nas células endoteliais assim aumentando a adesão no tecido e estimulando a produção de quimiocinas que se ligam ao neutrófilos aumentando a afinidade das integrinas direcionando os neutrófilos.

Com a presença do LPS e os estímulos descritos geram um processo de inflamação aguda acumulando neutrófilos que se ativam, secundariamente ao estímulo do sistema imune adaptativo gerado pelo próprio antígeno, induzindo a fagocitose e a produção de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio.

Na prática os tratamentos de granulócitos isolados com LPS podem obter maior potencial de internalização de NPOF, aumentando o número de células marcadas e consequentemente seu sinal em imagens de RM.⁽⁵²⁾

Fonte: Adaptado de Cruz-Machado SS. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF-kB. Rev Biol. 2010;4:40-3. Figura 1, Via clássica da ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NF-kB e de outros fatores de transcrição. Maiores detalhes ao longo do texto (Baseado em Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 1998;16:225-60. Review.; Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem. 2002;71:635-700. Review.; Kawai T, Akira S. TLR signaling. Cell Death Differ. 2006;13(5):816-25. Review.; Carmody RJ, Chen YH. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. Cell Mol Immunol. 2007;4(1):31-41. Review.; Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008;42(2):145-151.; Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. Nat Rev Immunol. 2008;8(11):837-48); p. 42.⁽³¹⁾

Figura 4. Processo de ativação bioquímica na presença do lipopolissacarídeos

2.5 Imagem por ressonância magnética como alternativa para detecção de processos inflamatórios

A imagem por ressonância magnética (IRM) é uma das técnicas de diagnóstico que possibilita a distribuição das NPOF utilizando imagens hipointensas ponderadas em T2.

O fenômeno de ressonância ocorre quando um objeto é exposto a um ambiente no qual ocorre uma perturbação oscilatória de frequência próxima a frequência natural da amostra. Qualquer tipo de átomo, quando colocado em um meio que apresenta uma oscilação semelhante à sua própria frequência, ganha energia e se a frequência desta oscilação for exatamente igual a sua eles entram em ressonância.⁽³⁸⁾

A aquisição de imagens é realizada por um campo magnético constante conjuntamente com gradientes de campo magnético em três direções e que

na presença de pulsos de radiofrequência permite adquirir imagens mapeando a posição de prótons, que existem em diferentes densidades nos tecidos.

A IRM reconstrói imagens a partir dos sinais eletromagnéticos gerados pela estimulação e relaxamento de hidrogênio. Devido à alta resolução espacial, estabilidade e a capacidade das NPOF de realizar interações à nível atômico e molecular, influenciando o tempo de relaxamento de prótons de hidrogênio contidos em moléculas de água, as mesmas estão sendo usadas em IRM em diversas modalidades como: agente de acompanhamento de migração celular por monitoramento *in vivo* e de diferenciação celular com marcação molecular, agente de contraste, gerando efeitos de realce, como uma diminuição de sinal (negativo), aparecendo em tumores cerebrais como um sinal de hipointensidade em imagem ponderadas em T2.⁽⁴⁹⁻⁵⁴⁾ Imagens por RM têm vantagens, como ao contrário do PET e do TC, não faz o uso de radiação ionizante. Além disso, a IRM produz informações anatômicas com alta definição de tecidos moles, podendo diferenciar anatomicamente tecidos inflamados de tecidos saudáveis. A IRM pode ser aplicada com NPOF devido à vantagens, como baixa citotoxicidade, alta intensidade do sinal magnético e maior contraste quando submetidos a IRM.^(45,55)

As NPOF se apresentam como alternativa no diagnóstico de processos inflamatórios, por IRM, devido sua interação com células de defesa do sangue, principalmente os granulócitos visando um sinal hipotenso em imagens ponderadas em T2. A interação das NPOF com os granulócitos se aumentam quando essas são ativadas pelo contato com LPS, aumentando a carga de ferro intracelular corroborando com o sinal em IRM, podendo auxiliar no diagnóstico devido as características das NPOF e da fisiopatologia dos granulócitos em inflamações.⁽⁵⁶⁾

A união de duas modalidades de imagem em um único equipamento, conhecidas como equipamento híbrido, como a tomografia por emissão de pósitrons com ressonância magnética (PET/RM) estão cada vez mais disponíveis para uso clínico. O equipamento PET/RM combina as características únicas da RM, incluindo excelente contraste de tecidos moles, com as informações fisiológicas quantitativas fornecidas pelo PET.⁽⁵³⁾ A maioria das evidências da utilidade clínica potencial do PET/RM está disponível para neuroimagem e em estudos pediátricos, devido a ausência de radiação ionizante da RM. Outras áreas, nas quais o PET/RM pode desempenhar um papel importante, incluem tumores de cabeça e pescoço, abdominais superiores e pélvicos.⁽⁵⁷⁾

Em processos inflamatórios, estudo com PET/RM podem aumentar a sensibilidade com a sinergia dos dois equipamentos, possuindo uma definição anatômica e a informação funcional. Agentes biomodais como Fe_3O_4 com ^{64}Cu ou ^{18}F -FDG encapsulada por NP podem apresentar um aumento das propriedades relaxométricas mantendo as características radioativas e sem alterar suas funções químicas, podendo ser utilizadas como contraste para detecção de uma inflamação.^(52,57)

Atualmente estudos para pesquisa de inflamação com uso do PET/RM *in vivo* se limitam ao uso do FDG- ^{18}F , para investigação da origem da doença, devido ao acúmulos de sangue, e fluoreto de sódio ($\text{NaF}^{18}\text{-F}$) que é análogo do minerais ósseos ideal para estudo de remodelações e infecções de caráter ortopédico.^(52,57)

3 MÉTODOS

A metodologia foi dividida em 3 etapas (Figura 5): (i) fonte e coleta das amostras; e métodos de separação dos granulócitos, avaliação de pureza e viabilidade dos granulócitos (ii) Desenvolvimento das NP acoplado ao cobre estável (frio), (iii) marcação com NPOFqui e NPOFqui-Cu dos granulócitos com e sem ativação por LPS, avaliação de viabilidade de marcação e sua quantificação.

Fe₃O₄: óxido de ferro; NPOF: nanopartículas de óxido de ferro; LPS: lipopolissacarídeos; Cu: cobre na forma estável; IRM: imagens por ressonância magnética; s/LPS: sem ativação por LPS.

Figura 5. Desenho experimental do estudo

3.1 Fonte da amostra de sangue para obtenção de granulócitos

A coleta de sangue venoso periférico foi realizada em seis voluntários após aplicação do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) preenchendo os critérios de inclusão e exclusão. O TCLE foi aprovado pelo Comitê de

Ética do Hospital Albert Einstein com número de parecer 2.023.173 e CAAE: 66749517.0.0000.0071.

Critérios de inclusão: Foram incluídos no presente trabalho voluntários humanos de ambos os gêneros e de qualquer faixa etária.

Critérios de exclusão: Não foram incluídos voluntários gestantes; com hipersensibilidade aos materiais de coleta venosa periférica; voluntários internados e com histórico de doenças de coagulação e/ou doenças autoimune.

3.2 Coleta do sangue venoso periférico

Antes do procedimento de coleta do sangue, em duas seringas de 10mL foram adicionados 100 U.I de heparina sódica em cada seringa, evitando assim a coagulação do sangue que fora coletado. A heparina foi recoberta por toda a extensão da seringa puxando o embolo até o seu limite e espalhando pelas paredes com movimentos giratórios. Após esse procedimento o embolo foi retornado ao local de origem. Uma tampa na seringa foi colocada para evitar derramamento do material.

As coletas foram realizadas em membros superiores, preferencialmente na fossa antecubital, seguindo sempre o mesmo procedimento e materiais. O membro escolhido para a coleta foi garroteado para a visualização da veia e realizado a assepsia com *swab* alcoólico. A punção da veia foi realizada com Intima (SDsafe) contendo uma agulha de calibre 20G. Após a introdução da agulha o Intima foi fixado na pele com um micropore, evitando assim o deslocamento da agulha e perda de veia já puncionada. Após a punção, o garrote foi retirado, e a agulha retraída para sua capa de proteção, ficando apenas um tubo de silicone na veia.

Foram preparadas duas seringas com heparina sódica e preenchidas lentamente com sangue venoso, para evitar a lise celular. Após o preenchimento, movimentos circulares foram feitos para que a heparina se misture com o sangue coletado. Foi realizada mais uma coleta de 3mL de sangue que seguidamente foram transferidos para um tubo contendo etilenodiaminotetracético (EDTA). Totalizando 23mL de sangue coletado de cada voluntário.

Para finalizar a coleta o intima foi retirada e realizada uma compressa no local para evitar hematomas. O processo de separação celular foi começado imediatamente após o término da coleta.

3.3 Processos de separação dos granulócitos

Os processos de separação de granulócitos foram realizados por cinco métodos com o intuito de encontrar o método com melhor eficiência de separação. Em todos os métodos, o sangue coletado foi depositado em um tubo Falcon de 50mL, de forma lenta pela parede do tubo evitando formação de espumas e lise celular. No tubo com EDTA foi realizada a contagem celular em um contador (Sismex – XE 2100), para uma avaliação inicial da população de granulócitos presentes na amostra.

Todos os métodos utilizaram Percoll (Sigma Aldrich) em gradientes de densidades diferentes para auxiliar a separação das fases sanguíneas. Os métodos utilizados foram:

- Método de densidade usando Percoll;
- Método gradientes de Percoll com tampão fosfato salino (PBS - *phosphate buffer saline*);
- Método solução balanceada de sais Hank sem vermelho fenol;
- Método solução balanceada de sais Hank com vermelho fenol;
- Método gradientes Percoll e Ficoll.

3.3.1 Método de densidades usando Percoll

Foram preparadas duas soluções de gradientes de densidade de Percoll de acordo com o *guideline* para marcação de leucócitos com ^{99m}Tc -HMPAO,⁽³²⁾ baseado na separação inicial de leucócitos totais para seguidamente realizar o isolamento dos granulócitos.

Foram coletados 20mL de sangue em uma seringa de 60mL, onde foi adicionado 5mL de um expansor plasmático de alto peso molecular (Voluven - hidroxietilamido mais cloreto de sódio - Fresenius Kabi – Brasil) para acelerar a sedimentação. Após 90 minutos foi formado 3 fases sanguíneas, onde a primeira fase corresponde ao plasma, que se apresenta menos denso. A segunda fase no sedimento

as hemácias, que são mais densas e na interface das camadas correspondente aos leucócitos.

Com uma pipeta o plasma foi descartado e a camada intermediária foi separada e transferidas para outro tubo. O material transferido foi centrifugado por 5 minutos em 200G. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado obtendo-se um pellet de leucócitos totais com hemácias no fundo tubo.

Em um novo tubo Falcon de 15mL foram adicionados os gradientes de densidades diferentes de Percoll preparados conforme a tabela 1. Inicialmente foi adicionado 4mL da solução B no fundo do tubo de forma lenta e pela parede do tubo, posteriormente 4mL do gradiente A lentamente evitando a mistura das fases, e superiormente os leucócitos com hemácias, que já foram separados. Esses gradientes mais os leucócitos foram centrifugados por 30 minutos em 150G na temperatura de 22°C para obtenção dos granulócitos separados pelas densidades dos gradientes de Percoll.

Tabela 1. Gradientes de densidades diferentes de Percoll para isolamento de granulócitos dos leucócitos totais

Reagentes	Gradiente A (mL)	Gradiente B (mL)
NaCl 9%	1	1
Percoll	5,5	7
Água para injeção	3,4	1,9

NaCl: cloreto de sódio.

3.3.2 Método gradientes de Percoll com PBS

O método de separação de granulócitos usando gradientes de Percoll com PBS foi realizado nas mesmas condições que o item 3.3.1 mudando os gradientes de Percoll como descrito na tabela 2.

Tabela 2. Gradientes de densidades de Percoll com PBS

Reagentes	Gradiente A (μ L)	Gradiente B (μ L)
Percoll	1800	2100
PBS 1x	990	645
PBS 10x	210	255

PBS: tampão fosfato salino.

Em um tubo Falcon de 15mL foi colocado 3mL do gradiente B, posteriormente 3mL do gradiente A e por último 3mL do sangue total, sem separação prévia dos leucócitos, os gradientes mais o sangue foram centrifugados por 300G por 30 minutos a 22° C, esperando isolar os granulócitos a partir do sangue total.

3.3.3 Método solução balanceada de sais Hank sem vermelho de fenol

Para realização desse método, foi necessária a preparação previa de dois gradientes, com densidades diferentes de Percoll; contendo solução balanceada de sais Hank (HBSS) 10 vezes concentrada e sem vermelho de fenol (VF), (LCGLab) e sem cálcio e sem magnésio e água MiliQ, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3. Gradientes de densidades diferentes de Percoll com HBSS sem vermelho de fenol

Reagentes	Gradiente A (μ L)	Gradiente B (μ L)
Percoll	1800	2100
HBSS 10X sem vermelho de fenol	300	300
Água MiliQ	900	600

HBSS:solução balanceada de sais Hank.

A montagem dos gradientes foi feita em um tubo Falcon de 15mL, aonde foi adicionado 3mL do gradiente mais denso (gradiente B),de forma lenta e pela parede do tubo, evitando a formação de bolhas, posteriormente 3mL do gradiente menos denso (gradiente A) foi adicionado superiormente ao B, lentamente e de forma continua, pois ele que ficará na interface dos gradientes seguidamente 3mL do sangue total foi adicionado. Os gradientes foram centrifugados 400G por 30 minutos, retirando a desaceleração da centrífuga, esperando que os granulócitos se posicionem entre os gradientes, os mononucleares por cima dos gradientes e as hemácias como sedimento.

3.3.4 Método solução balanceada de sais Hank com vermelho de fenol

Para realização do presente método, foi necessária a preparação previa de dois gradientes, com densidades diferentes de Percoll, contendo HBSS 10

vezes concentrada e com VF, (Sigma Aldrich) sem cálcio e sem magnésio e água MiliQ conforme a tabela 4.

Tabela 4. Gradientes de Percoll com solução balanceada de sais Hank com vermelho de fenol

Reagentes	Gradiente A (μL)	Gradiente B (μL)
Percoll	1800	2100
HBSS 10X com vermelho de fenol	300	300
Água MiliQ	900	600

HBSS: solução balanceada de sais Hank.

A montagem dos gradientes segue os mesmos procedimentos do método de separação de granulócitos com HBSS sem VF anteriormente descritas no item 3.3.3 esperando que os granulócitos se posicionem entre os gradientes, os mononucleares por cima dos gradientes e as hemácias como sedimento.

3.3.5 Método gradientes de Percoll e Ficoll

Para a realização do presente método foi seguido três etapas.

– Primeira Etapa: foi iniciado com o método de separação de granulócitos utilizando gradientes de Percoll com HBSS com VF. O procedimento segue o padrão já descrito no item 3.3.3. Após a centrifugação final, se obtém 4 fases. A primeira fase corresponde ao plasma; a segunda fase um pequeno halo corresponde aos mononucleares; a terceira fase as soluções de HBSS com VF e por último o mais denso, as hemácias.

O plasma e o halo de mononucleares foram retirados e desprezados com uma pipeta cuidadosamente, para evitar a contaminação das outras fases. A interface entre o halo de mononucleares e hemácias foi retirado e transferido para um novo tubo, evitando a presença de hemácias.

– Segunda etapa: em um tubo Falcon de 15mL foi adicionado 4mL de Ficoll Paque Plus (Sigma Aldrich) e posteriormente adicionado os 4mL recuperados da primeira etapa (interface entre o halo e as hemácias) de forma lenta e pela parede do tubo. Formando assim um novo gradiente de Ficoll mais Percoll e HBSS. Esse novo gradiente foi centrifugado por mais 30 minutos em 400G retirando a desaceleração da centrifuga.

Com o término da centrifugação foi formado um sedimento que corresponde aos granulócitos, que foi transferido para um novo tubo e ressuspensos com HBSS.

– Terceira etapa: as células isoladas da técnica combinada de Percoll e posteriormente Ficoll foram lavadas para retirada dos gradientes utilizados na separação e conjuntamente foi realizada a lise das hemácias que eventualmente ficaram no processo.

Com os granulócitos, foram adicionados 4mL de água MiliQ e realizando movimentos para a mistura da água com as células e assim também fazendo a lise de possíveis hemácias na amostra.

No final da etapa de hemólise foi adicionado 4mL de HBSS 1x concentrada com cálcio e com magnésio para recuperar a osmolaridade das células. Vertendo o tubo para a mistura das soluções. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos em 150G. Os granulócitos ficaram no fundo do tubo e o sobrenadante foi desprezado.

As células foram ressuspensas em 1mL de HBSS 1x concentrada e com cálcio e com magnésio. Com um contador de células automático foi realizada a contagem de granulócitos isolados na amostra para verificação da pureza celular resultante desse método.

3.4 Visualização morfológica dos granulócitos

Para visualizar a morfologia das células foi realizada a coloração de Panótico rápido (InterLab). Antes da coloração 50 μ L da amostra de células foram colocadas por cinco minutos na citocentrífuga (Cientec – CT 2000) e rotacionado a 1800RPM para se obter um aglomerado de células em uma lâmina de microscopia. A secagem do material na lamina foi em temperatura ambiente antes da coloração.

A coloração Panótico rápido consiste em 3 corantes que devem ser utilizados em sequência. A lâmina ficou totalmente submersa em cada solução por 30 segundos. A primeira solução da coloração é composta de Triarilmetano 0,1%, cuja a função é de fixação. A segunda solução, é composto de Xanteno 0,1%, com aspecto vermelho que tem função de corar estruturas afins de corantes ácidos. A terceira solução é composto por Tiazina 0,1% que apresenta aspecto violeta e cora células

afins de corante básicos. Os grupamentos ácidos dos ácidos nucleicos e proteínas do núcleo celular e do citoplasma tem afinidade por esse último corante.

Depois das três etapas a lâmina foi enxaguada com água corrente e secada em temperatura ambiente, e observada em microscopia ótica.

3.5 Avaliação da pureza da separação dos granulócitos por citometria de fluxo

Os granulócitos isolados na técnica Percoll mais Ficoll, foram submetidas a citometria de fluxo para realizar uma análise quantitativa da separação, identificando sua pureza e outras células presentes na amostra. Os testes foram realizados em citometro LSRFortessa (BDBiosciencis) e foram usados os seguintes parâmetros:

Forward scatter (FSC) para separar células da amostra por seu tamanho pela dispersão frontal dos raios de luz, e *side scatter* (SSC) para caracterizar a complexidade citoplasmática das células nas amostras, como por exemplo a granulosidade por uma dispersão lateral da luz.

Fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais para possibilitar a marcação específica de um constituinte celular. Para o estudo de pureza dos granulócitos, um painel com vários marcadores celulares foi utilizado (Tabela 5), para identificar o valor da pureza e alguns dos seus contaminantes.

Antes da análise, o resultado da última etapa de separação, foi centrifugado e 1500RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento submetido a um tampão de lise de hemácias por mais 5 minutos, assim evitando uma contaminação nos resultados dessa amostra. Com as células isoladas e sem a presença de hemácias foi realizado um painel (Tabela 5) de anticorpos para o estudo de pureza de granulócitos na amostra.

Tabela 5. Anticorpos e suas respectivas quantidades no volume de amostra de granulócitos

Anticorpos	Volume (μ L)
CD45 – PerCP-Cy5-5A	8
CD15 FITC-A	5
CD13 – PE-A	5
CD3 AlexaFluor700-A	5
CD14 PE-Cy-A	2
CD19 APC-Cy7-A	5

CD: grupo de diferenciação.

3.6 Acoplamento do cobre nas nanopartículas revestidas com quitosana

O processo do acoplamento das NPOF com o cobre ($\text{NPOF}_{\text{qui-Cu}}$) foi realizado em NP biocompatíveis comerciais contendo NP revestidas com quitosana NPOF_{qui} (FluidMAG-Chitosan®, cat. 4118-S; Chemical GmbH, Berlim, Alemanha), formado por NP à base de óxido de ferro com núcleo cristalino correspondente a fase cristalina da magnetita com tamanho do núcleo de 10nm e recobertas com quitosana, β - (1–4) - D-glucosamina ligada e N-acetil-D-glucosamina, com diâmetro hidrodinâmico de 100nm, concentração de ferro de 25mg/mL, número de partículas $\approx 2,2 \times 10^{14}/\text{g}$, densidade $1,25\text{g}/\text{cm}^3$ e grupo funcional amina ($-\text{NH}_2$).

Para lavagem da suspensão das NPOF em suspensão coloidal foi utilizada solução isotônica salina 0,9% (Isofarma®, Industria Farmaceutica Ltda.; CE, Brasil). Assim, 5mg de Fe contidas em um volume de 200 μL das NPOF_{qui} foram adicionadas a 5mL da solução salina e lavadas cinco vezes mediante separação magnética utilizando ímã de Neodímio. Após lavagem as NPOF foram dispersas em 380 μL de solução salina. Em um tubo Falcon de 50mL foram adicionados 24mg de cloreto de cobre (II) dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich) onde foram adicionados a 24mL de PBS e o pH ajustado para 5,5. Seguidamente foram adicionadas 120 μL da solução de PBS contendo cobre a solução salina contendo as NP e o pH foi ajustado para 5,5. Visando analisar a influência do pH na marcação com cobre foram preparadas duas amostras adicionais com pH 3 e 4. A mistura foi submetida a ultrassom durante 10 minutos e mantidas no *shaker* por 30 minutos. Após o período de estabilização da reação química as NPOF foram lavadas três vezes com solução salina e mediante separação magnética. O esquema da figura 6 mostra o processo seguido para o acoplamento das NPOF com o cobre. O material resultante, NPOF_{qui} foi ressuspensão em 5mL para estudos da determinação da carga de Cu mediante a técnica de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

NPOFqui: nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: cloreto de cobre dihidratado; PBS: tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline*); Cu^{+2} : íon de cobre; NPOFqui-Cu: nanopartículas de óxido de ferro revestida com quitosana e cobre acoplado; US: ultrassom; ICP-MS: espectrometria de massas com plasma acoplado.

Figura 6. Representação esquemática do processo para marcação com cobre das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana

3.7 Quantificação do teor de cobre nas nanopartículas revestidas com quitosana mediante a técnica de espectrometria de massas

A determinação da concentração do teor de cobre nas $\text{NPOF}_{\text{qui-Cu}}$ que foram obtidas para diferentes condições de pH (3; 4 e 5,5) foi determinada pela técnica de ICP-MS utilizando o equipamento Nexion 350x (Perkin Elmer).

A determinação da carga de cobre das NPOF_{qui} acoplados ao cobre nas condições de pH diferentes foram suspensas em água miliQ em um volume de 5mL e as amostras foram então levadas aos porta amostras e onde foi adicionado 5mL de ácido nítrico 70% para digestão no micro-ondas TITAN (Perkin Elmer, EUA), seguindo o programa de temperatura e pressão mostrada na tabela 6.

Tabela 6. Programa de temperatura e pressão no micro-ondas TITAN (PerkinElmer) para a digestão das nanopartículas revestidas com quitosana acopladas cobre

Etapa	Temperatura alvo (°C)	Pressão máxima (bar)	Tempo de rampa (min)	Tempo de espera (min)	Potência (%)
1	160	30	5	5	80
2	190	30	1	10	90
3	50	30	1	10	0

Após a digestão, as amostras foram injetadas no equipamento de ICP-MS para determinação do teor de cobre de cada amostra, sendo realizadas em triplicata. A quantificação foi baseada em uma curva de calibração usando padrão de Cu certificado pela Perkin Elmer (NexION # N8145054) nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20 ng Fe/mL (ppb). Uma amostra de NPOF_{qui} não acopladas com cobre foi usada como controle ([Cu]=0 ppb).

3.8 Caracterização da morfologia das nanopartículas revestidas com quitosana e cobre

A caracterização morfológica, das NPOF_{qui-Cu} foi realizada na amostra que apresentou melhor eficiência no acoplamento com o cobre na superfície das NPOF_{qui}. As medidas da distribuição do tamanho hidrodinâmico das NPOF_{qui-Cu} foram realizadas utilizando o equipamento Malvern Zetasizer NanoS (Malvern, Reino Unido). As distribuições hidrodinâmicas ponderadas em número foram determinadas em um ângulo de 173° por espalhamento de luz dinâmica (DLS-Dynamic Light Scattering) em modo manual. O número de médias usadas foi 20 e o tempo de medida padronizado foi de 5s por média. Todas as medidas foram realizadas em modo de posição fixa na temperatura de 37°C, com um tempo de equilíbrio de 60s.

Utilizou-se 2mL de cada amostra de NPOF_{qui-Cu} dispersas na água e a análise foi feita na concentração de 30 µg Fe/mL. Durante o experimento as amostras foram mantidas a 37°C, a fim de preservar as condições nas quais a marcação celular é realizada.

3.9 Caracterização relaxométrica das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana mediante a técnica de imagens por ressonância magnética

A caracterização relaxométrica das NPOF_{qui} foi realizada mediante a técnica de IRM utilizando um *phantom* formado por dispersões de NPOF_{qui} em agarose 1% (Invitrogen Corporation, CA, USA), em diversas concentrações de ferro em placa de cultura de 24 poços. As concentrações das amostras analisadas foram 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 50 µg Fe/mL. Logo em seguida, diluiu-se 2g de agarose em

200mL de água mili-Q aquecida a uma temperatura de 40°C. Esta mistura foi rapidamente homogeneizada e colocada no volume de 1000µL em cada poço contendo NPOF_{qui}. Esperou-se aproximadamente 5 minutos para endurecimento da mistura e então preencheu-se totalmente a placa de cultura com a solução de agarose 1%. A placa foi resfriada a 4°C e até que ficasse pronta para análises subsequentes.

As IRM foram adquiridas com um tomógrafo híbrido PET/RM de corpo inteiro de 3Tesla (Trio, SIEMENS, Alemanha) ponderadas no tempo de relaxação transversal (T2), com a sequência T2 (multi-contrast turbo-spin echo, SE_MC) com 31 tempos de *echo* (TE=8; 16; 24; ... ;256ms) e tempo de repetição TR=3000ms. As MRI foram obtidas utilizando uma bobina de cabeça de 32 canais com fatias de 3mm, campo de visão de 15,9x20,0cm, matriz 256x256 e 16 médias. A intensidade do sinal foi medida usando uma região de interesse (ROI) circular e homogênea de 20mm². O T2 de cada amostra foi obtido mediante ajuste à curva de decaimento, intensidade do sinal *versus* TE, com um algoritmo monoexponencial linear:

$$\text{Intensidade} = C * e^{-\frac{TE}{T2}} \quad (2)$$

O valor de relaxividade transversal, r2 foi determinada mediante o ajuste linear pelo método dos mínimos quadrados da inclinação do gráfico 1/T2 *versus* concentração de ferro ([Fe]) das amostras de NPOF_{qui}.

3.10 Marcação dos granulócitos com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana

Após determinado o melhor método de separação dos granulócitos foi realizado a marcação nas seguintes condições:

- Marcação dos granulócitos com NPOF_{qui-Cu}
- Granulócitos estimulados com LPS e marcadas com NPOF_{qui-Cu}
- Marcação dos granulócitos com NPOF_{qui}
- Granulócitos estimulados com LPS e marcadas com NPOF_{qui}

Para o processo de marcação de granulócitos com NPOF_{qui} e NPOF_{qui-Cobre}, as células granulocíticas foram isoladas e purificadas pelo método de separação com gradientes de Percoll e Ficoll.

As células isoladas foram ressuspensas com meio de cultura *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (LGCBio) e marcadas com NPOF_{qui} e NPOF_{qui-Cu}. Para a marcação foi utilizada uma placa de cultura com 48 poços. Em três poços foram colocados 10⁶ granulócitos e posteriormente adicionados NPOF_{qui} na concentração de 20µg/mL. O tempo de incubação foi de duas horas na estufa a 37°C.

Após o tempo de marcação as células foram transferidas para um tubo Falcon de 15mL no qual foi adicionado 5mL de PBS para realizar a lavagem das células e retirando as NPOF que não foi incorporado pelos granulócitos, sendo então submetido a centrifugação (1200RPM) por 5 minutos. O resultado da centrifugação foram células marcadas com as NPOF formando um *pellet* no fundo do tubo, onde estas células ressuspensas em 1mL de PBS. O processo de lavagem foi acompanhado com a avaliação de azul de Prússia permitindo observar a presença das NPOF nos granulócitos.

Na marcação dos granulócitos ativados foram utilizados LPS (*Escherichia coli* sorotipo O:111 - Sigma Aldrich) foram utilizados 10ng em cada poço contendo 10⁶ granulócitos e incubados na estufa por duas horas a 37°C. Após a ativação das células, o procedimento de marcação NPOF_{qui} e NPOF_{qui-Cu} foi iniciado.

3.11 Visualização da captação das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana pelos granulócitos

Para confirmar a marcação dos granulócitos com as NPOF_{qui} e NPOF_{qui-Cu} com e sem LPS, foi realizada a coloração por azul de Prússia (AP), para identificação de ferro na célula na forma de ferritina ou hemossiderina. A reação é gerada na interação de íons de ferrocianeto com íons férricos no interior celular, produzindo um precipitado de cor azul-esverdeado chamado ferrocianeto férrico:

(3)

Onde o núcleo de óxido de ferro reage com a solução, e assim indica a presença das NPOF marcando as mesmas em coloração azul. A solução de AP foi obtida a partir de HCL a 5% e com $K_4Fe(CN)_6$ resultando em uma solução final $K_4Fe(CN)_6HCl$ 5%.

Após marcação das células com NPOF, foi colocado 50uL por cinco minutos na citocentrífuga e rotacionado a 1800RPM, resultando no aglomerado de células na lâmina de microscopia, seguidamente foi adicionado 500μL de azul de Prússia na lâmina com os granulócitos marcados e deixados para reagir por 5 minutos e finalmente foi registrado as imagens no microscópio Nikon TiE.

3.12 Quantificação da internalização de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana pelos granulócitos mediante imagens de ressonância magnética

Dado que o objetivo do trabalho é a marcação com $NPOF_{qui}$ dos granulócitos e sua posterior detecção com equipamentos de IRM, foi realizado a determinação dos parâmetros de T2 e sua posterior quantificação da carga de ferro nos granulócitos. Com esse propósito após a marcação foi preparado *phantom* de agarose ao 1%, contendo 10^6 células, e levando em consideração as melhores condições encontradas em experimentos anteriores, os granulócitos foram marcadas com $NPOF_{qui-Cu}$ levando em consideração a melhor carga de cobre ligado na superfície das NPOF determinada pela técnica de ICP-MS.

O protocolo por IRM foi baseado nas sequencias spin eco coronal. A intensidade do sinal foi medida usando uma região circular homogênea de interesse de $20mm^2$. O tempo de relaxação transversal do próton T2 foram deduzidos a partir do ajuste dos valores experimentais da intensidade do sinal obtidos com a sequência spin eco com um tempo de repetição TR (com TR de 25-300ms e com tempo ao eco [TE] fixo) e de TE (com TE de 10-600ms e com TR fixo), respectivamente, utilizando a equação 3.

Definido o protocolo no equipamento de IRM, o *phantom* foi submetido a exame de IRM para determinar os valores do tempo de relaxação transversal dos granulócitos marcadas ($T_2^{g-marcada}$) e da amostra controle ($T_2^{g-controle}$)

que corresponde a granulócitos não marcadas. Consequentemente, o teor de ferro internalizado pelos granulócitos foi determinando mediante a relação:

$$[Fe] = \frac{\frac{1}{T_2^{g-marcada}} - \frac{1}{T_2^{g-controle}}}{r_2} \quad (4)$$

3.13 Viabilidade dos granulócitos por citometria de fluxo

A viabilidade celular foi dividida em duas etapas: viabilidade dos métodos de isolamento de granulócitos com gradientes de Percoll; e Percoll mais Ficoll; seguidamente foi realizada a viabilidade das células marcadas com NPOFqui-cu com e sem estimulação por LPS.

O estudo de viabilidade celular foi realizado em um citometro de fluxo LSRFortessa (BDsciençis), utilizando como marcadores a anexina V e iodeto de propídio (PI).

A anexina V tem afinidade pela fosfatidilserina presente na membrana celular, em condições normais, a fosfatidilserina se encontra na porção interna da bicamada da membrana. Em um processo de apoptose inicial a fosfatidilserina é translocada para a superfície da membrana, assim possibilitando a marcação com a anexina V.

O iodeto de propídio é um corante com afinidade por ácidos nucleicos e necessita de uma alteração na permeabilidade da membrana celular para ocorrer a marcação. Em células preservadas ou em um processo de apoptose inicial não ocorre a marcação devido a integridade celular, porém ao final do processo de apoptose ou necrose há a presença de poros na membrana, assim permitindo a inserção do PI na célula e sua respectiva marcação. A aplicação da citometria de fluxo, através do uso simultâneo da anexina V conjugada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e do iodeto de propídeo (PI), permite a distinção entre a apoptose inicial e tardia.

Na primeira etapa de viabilidade, após o isolamento dos granulócitos, tanto no método gradientes de Percoll e Percoll mais Ficoll, as células isoladas foram transferidas à um tubo Falcon e adicionados 4mL de meio de cultura

DMEM, para assim manter a integridade celular dos granulócitos. Para realizar o estudo de viabilidade dos métodos de isolamento foram utilizados 100µL de cada amostra (método gradientes de Percoll e Percoll mais Ficoll) em três tubos diferentes. No primeiro tubo foram adicionados 5µL de Anexina V- FITC e 5µL de PI-PE, no segundo foram adicionados apenas 5µL de Anexina V- FITC e no ultimo tubo apenas 5µL de PI-PE. Em todos os tubos foram adicionado 300µL um tampão de lise de hemácias sem fixador (Excellyse Live – Czech Republic) para evitar lise também dos granulócitos, deixados reagir por 20 minutos sem a presença de luz. Após o término do tempo de reação foi adicionado 300µL de um *buffer* para parar a reação. Os tubos foram centrifugados em 500G por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. Os granulócitos, no fundo do tubo, foram ressuspensos e mensurados no citômetro de fluxo. O processo de viabilidade foi realizado após 4 horas de separação, na tentativa de simular um processo de futura reinjeção dos granulócitos nos pacientes.

Posteriormente o mesmo método de viabilidade foi realizado com granulócitos, isolados pelo método Percoll mais Ficoll, marcados com NPOF e marcados sob influência do LPS.

Como alternativa de manter os granulócitos viáveis após receberem as NPOF, foram adicionados N-acetil-L-cisteína (NAC) (Sigma Aldrich – Brasil) nas células 15 minutos antes da marcação com as NPOF; na tentativa de evitar o estresse oxidativo nos granulócitos pela formação de espécies reativas de oxigênio no processo de internalização das NPOF. Foram realizadas duas abordagens de adição de NAC nos granulócitos em concentrações distintas, 10mM e 30mM para avaliar se a concentração tem influência na proteção celular.

Portanto o estudo de viabilidade dos granulócitos foram abordados em cinco condições: (i) Viabilidade dos granulócitos isolados pelo método Percoll e Ficoll, usado como controle das marcações; (ii) Viabilidade após a marcação com NPOFqui-cu; (iii) viabilidade das células marcadas com adição prévia de NAC em uma concentração de 10mM/mL; (iv) com adição de NAC 30mM/mL e (v) viabilidade da marcação dos granulócitos com NPOFqui-cu após a ativação com LPS.

3.14 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro

Como possível alternativa no projeto foi sintetizado NPOF pelo processo químico de coprecipitação. Este processo foi escolhido devido a facilidade de obtenção do material bem como ao custo do processo.⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾

O processo de síntese, basicamente consiste na mistura de cloreto férrico e ferroso, sais inorgânicos em ambiente aquoso usando água miliQ. O processo se inicia com a preparação das soluções de $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, 98% - 102%) e $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, $\geq 99\%$) em ácido clorídrico (HCl; Sigma Aldrich, 37%). Para a preparação da primeira solução 2 gramas de cloreto ferroso foram dissolvidas em 5mL de HCl com concentração molar 2M; a segunda solução foi preparada dissolvendo 3,2 gramas de cloreto férrico em 20mL de HCl 2M. As soluções foram preparadas sob agitação magnética a temperatura ambiente. As duas soluções foram misturadas sob agitação magnética. A precipitação do oxi-hidróxido de ferro acontece na presença de hidróxido de amônia (NH_4OH ; 29,6%), adicionado lentamente a mistura das soluções, na frequência aproximada de uma gota por segundo, utilizou-se 30mL de hidróxido de amônia concentrado que levou a solução até um nível básico com pH 10. Após adição do hidróxido de amônia a solução foi mantida sob agitação magnética por um período de 1h. Seguidamente o precipitado foi lavado com água miliQ, visando eliminar eletrólitos de cloreto de amônia, e com utilização de um ímã de neodímio para a separação magnética do precipitado da fase aquosa; A lavagem foi repetida cinco vezes. Então, após a lavagem magnética, o nanomaterial foi submetido ultrassom a fim de diminuir a formação de grandes aglomerados de NP. Por fim, o material sintetizado foi submetido a centrifugação por cinco minutos à 14500RPM para melhor separação entre precipitado e suspensão. Após dois ciclos de lavagem com centrifugação, foi obtido o nanomaterial em estado de solução coloidal.

Seguidamente o nanomaterial foi lavado com etanol e levadas a estufa na temperatura de 37°C , após evaporação foi obtido o pó de NP. Para o revestimento das NP foi preparada 100mL de uma solução de ácido acético 5%(V/V) e adicionado 20mg de quitosana, a diluição em meio ácido aconteceu na temperatura ambiente sob agitação magnética por um período de 30 minutos. Finalmente, 300mg do nanomaterial sintetizado foi disperso na solução de quitosana e mantidas em *shaker* durante 16 horas. Após tratamento térmico a 60°C , para evaporação da água

superficial, foi obtida uma suspensão aquosa, viscosa e escura que consiste de NP a base de óxido de ferro revestidas com quitosana. A figura 7 representa uma visão esquemática do processo da síntese de NP revestidas com quitosana.

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: cloreto ferroso hidratado; HCl : ácido clorídrico; $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$: cloreto férrico hidratado.

Figura 7. Representação esquemática do processo de coprecipitação para a síntese de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana

4 RESULTADOS

4.1 Processo de separação dos granulócitos

4.1.1 Método densidades de Percoll

No método densidades de Percoll, os gradientes foram preparados com os leucócitos previamente separados, após o término do processo foram visualizadas 4 fases. A primeira fase correspondente ao plasma remanescente (Figura 8A), a segunda fase se apresenta como um pequeno halo de células (Figura 8B), seguidamente a terceira fase corresponde aos gradientes de Percoll (Figura 8C) e finalmente a última fase como o resíduo de hemácias (Figura 8D).

Todas as fases foram isoladas e contadas em um contador de células Symex e realizado a coloração de Panótico rápido para visualizar a morfologia das células isoladas. Na primeira fase não foram registradas nenhuma célula pelo contador e também não foram visualizadas nenhuma célula na microscopia. O primeiro halo teve uma contagem apenas de mononucleares confirmados pela microscopia na presença de principalmente linfócitos, seguidamente a terceira fase também não apresentou nenhuma célula, por sua vez, a última fase apresentou hemácias e granulócitos caracterizados pelo contador e pela microscopia.

O método de separação por densidade de Percoll foi possível separar os granulócitos dos leucócitos isolados anteriormente. Porém não é possível a separação das hemácias dos granulócitos, pois se encontram em íntimo contato, como é mostrada na figura 8D.

(A) Plasma; (B) halo de mononucleares; (C) gradientes de Percoll; (D) hemácias e granulócitos como sedimento no tubo.

Figura 8. Resultado final do método gradientes de Percoll

4.1.2 Método gradientes de Percoll com tampão fosfato salino

No método de gradientes de Percoll com PBS o sangue total foi adicionado aos gradientes montados conforme a tabela 2. Neste método não foi realizado a separação prévia dos leucócitos diferenciando-se do método de separação por gradientes de Percoll. Após a centrifugação dos gradientes, todas as células foram sedimentadas, não observando nenhuma separação como mostrado na figura 9.

Figura 9. Método Percoll com PBS, mostrando a sedimentação de todas as células no fundo do tubo Falcon

4.1.3 Método solução balanceada de sais Hank sem vermelho de fenol

A montagem dos gradientes foi realizada com sangue total conforme a tabela 3, resultando nas mesmas fases e características do método densidades de Percoll, não sendo possível a separação dos granulócitos das hemácias (Figura 10).

(A) plasma; (B) halo de mononucleares; (C) Gradientes de Percoll sem células; (D) hemácias mais granulócitos como sedimento do tubo.

Figura 10. Resultado da centrifugação do sangue total com Percoll sem vermelho de fenol

4.1.4 Método solução balanceada de sais Hank com vermelho de fenol

No método a HBSS com VF, os gradientes foram montados (Tabela 4) com o sangue total. Após a centrifugação foi possível a visualização de 4 fases, sendo a primeira correspondente ao plasma, a segunda em forma de halo formado por mononucleares, a terceira por sua vez apresenta uma pequena mudança de cor em relação aos gradientes montados e a quarta fase correspondendo a hemácias.

Diferentemente dos outros métodos a terceira fase, apresentou no contador e na microscopia, a presença dos granulócitos e mononucleares. Tendo em

média 82,75 % de granulócitos isolados e 10,95 % de mononucleares, sendo um método possível para separação dos granulócitos a partir do sangue total, porém com uma contaminação de mononucleares como mostrado na figura 11A-H.

Após o registro com a coloração panótico foi determinado a seleção de mononucleares na região (I) do tubo falcon e granulócitos não puro no nível (II). As imagens registradas do nível I são (A-D) e imagens do nível (II) são mostrados em (E-H). (A,E)10x, (B,F)40x, (C,G)60x e (D,H)100x.

Figura 11. Método de separação de neutrófilos utilizando gradientes de Percoll formando dois halos (I e II)

4.1.5 Método Percoll e Ficoll

Com o objetivo de melhorar a eficiência do método anterior (método de Percoll com HBSS e VF) que contém a contendo granulócitos e células contaminantes (terceira fase) foram isoladas e centrifugadas com Ficoll Paque Plus para poder realizar a separação dos mononucleares dos granulócitos, resultando em um sedimento contendo apenas granulócitos, confirmados pelo contador de células e microscopia, aumentando a pureza em relação ao método HBSS com VF como mostrado na figura 12.

Seguidamente é utilizado Ficoll formando a região III. Após o registro com a coloração panótico foi determinado a seleção de mononucleares em na região (I) do tubo Falcon e granulócitos não puro no nível (II). As imagens registradas do nível I são (A-D) e imagens do nível (III) são mostrados em (E-H). (A,E)10x, (B,F)40x, (C,G)60x e (D,H)100x, demonstrando a pureza após a centrifugação com Ficoll.

Figura 12. Método de separação de neutrófilos utilizando gradientes de Percoll (formando níveis I e II)

Com a adição da centrifugação com Ficoll foi obtido 95,85% de granulócitos em média e apenas 1% de contaminantes de mononucleares. Mediante a coloração de panótico rápido podemos visualizar a diferença entre os métodos com e sem Ficoll como mostrado na figura 13.

A-C método apenas Percoll. D-F método Percoll mais Ficoll. (A,D)40x, (B,E)60x, (C,F)100x.

Figura 13. Comparação dos métodos Percoll solução balanceada de sais Hank e vermelho de fenol com a adição posterior do Ficoll

4.2 Avaliação da pureza da separação dos granulócitos por citometria de fluxo

O método de isolamento de granulócitos com Percoll e Ficoll apresentou alta eficiência de separação de granulócitos que foi confirmado pela análise por citometria de fluxo sendo possível verificar uma pureza de 95,2% de granulócitos na amostra.

No estudo com SSC e FSC foi possível verificar uma grande quantidade de células apresentando tamanho e granulosidade similar (Figura 14A), a marcação com CD45 PerCp-Cy5-5A mostra que as células isoladas são de leucócitos e quando associados a SSC se mostram leucócitos com granulosidade (Figura 14B). Já na marcação com CD15 FITC-A e CD13 PE-A mostra a quantidade de granulócitos na amostra, como ilustrado na figura 14C.

(A): Em azul a quantidade de células separadas por tamanho e granulosidade; (B): Separação por granulosidade e marcação de leucócitos totais; (C): pureza de granulócitos na amostra.

Figura 14. Avaliação da eficiência de separação de granulócitos por citometria de fluxo

As marcações com CD3 AlexaFluor700-A; CD19APC-Cy7A e CD14PE-Cy7-A apresentaram juntos uma contaminação de 4,3 % da amostra sendo desses 4,3% 13,6 % de linfócito T; 14,0 % de monócito e 11,3% de linfócitos B como na figura 15.

(A): contaminação de linfócitos T e monócitos da amostra; (B): presença de linfócitos B na amostra.

Figura 15. Células contaminantes do método Percoll e Ficoll

4.3 Acoplamento do cobre nas nanopartículas revestidas com quitosana

O processo do acoplamento do cobre nas $NPOF_{qui}$ foi realizado como descrito no procedimento experimental Pala et al.⁽¹⁸⁾ e como mostrado na figura 16. Inicialmente as $NPOF_{qui}$ dispersas em água (Figura 16A) são misturadas com a solução de cloreto de cobre (Figura 16B), após período de reação, a fase sólida foi separada da fase líquida ou sobrenadante mediante campo magnético produzido pelo ímã de neodímio (Figura 16C) e o sobrenadante descartado (Figura 16D), o processo de lavagem magnética foi realizado cinco vezes para garantir a eliminação de cloretos, impurezas e de cobre que não foi ligado na superfície das $NPOF_{qui}$. Finalmente, como mostrado na figura 16E, foram obtidas $NPOF_{qui}$ e acopladas com cobre. O processo de acoplamento foi realizado em três condições de pH (3; 4 e 5,5), como descrito na metodologia.

(A) Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana dispersas na água; (B) Solução de cloreto de cobre em PBS; (C) Separação magnética da mistura de cloreto de cobre com as nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana; (D) nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana ; separadas do sobrenadante mediante campo magnético produzido pelo ímã de neodímio (lavagem); (E) nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana ; acopladas ao cobre após 5 lavagens.

Figura 16. Etapas do procedimento para acoplamento de cobre nas $NPOF_{qui}$

4.4 Quantificação do teor de cobre nas nanopartículas de óxido de ferro revestida com quitosana mediante a técnica de espectrometria de massa

Visando obter uma correlação precisa entre a quantidade de cobre ligada na superfície das $NPOF_{qui}$ para diferentes condições de pH em estudo, foi realizada a quantificação do teor de cobre de amostras de $NPOF_{qui-Cu}$ dispersas na água na concentração de ferro de 5mg/mL, que foram obtidas em diferentes condições de pH (3; 4 e 5,5), mediante a técnica de ICP-MS.

A técnica permitiu a determinação de íons metálicos de cobre presentes na dispersão aquosa de $NPOF_{qui-Cu}$ na amostra digerida no micro-ondas (TITAN), a quantificação da carga de cobre é iniciada com a construção de uma curva de calibração, mostrada na figura 17, a partir de uma solução padrão 200ppb de Cu (200µg/L em 2% de HNO_3).

R: o ajuste linear produz a equação da curva de calibração para amostras de cobre; Cu: íon de cobre estável.

Figura 17. Gráfico da intensidade, em unidades de contagem por segundo (cps), determinado por espectrometria de massas *versus* concentração de cobre (Cu), em unidades de ppb, de amostras padrão

Com base na curva de calibração, foi possível determinar o teor de cobre das amostras analisadas. A figura 18 mostra o histograma da carga de cobre determinada por ICP-MS em função do pH utilizado na síntese das amostras, evidenciando que a marcação com cobre se incrementa com o valor do pH.

Figura 18. Gráfico de barras da carga de cobre em nanogramas (ng), determinada mediante espectrometria de massas, nas amostras de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado-Cu nas condições de pH 3; 4 e 5,5

A eficiência do acoplamento do cobre nas NPOF_{qui} em função do pH é mostrada nos valores de quantificação, mostrada na tabela 7, sugerindo que há uma carga maior de cobre quando o acoplamento é realizado no pH 5,5.

Tabela 7. Valores da carga de cobre, em nano gramas, determinadas mediante a técnica de espectrometria de massas para amostra de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado nas três condições de pH analisadas

pH	Carga de Cu (ng)
3	132,63±11,21
4	932,71±87,32
5,5	1144,56±106,21

Cu: Íon de cobre estável.

4.5 Caracterização da morfologia das nanopartículas de óxido de ferro e revestidas com quitosana e cobre acoplado

As NPOF_{qui}-Cu foram submetidas a análise do tamanho hidrodinâmico, a amostra foi escolhida considerando a maior carga de cobre contido na dispersão de NP analisadas determinada mediante ICP-MS, marcação com cobre na condição pH 5,5. A figura 19 mostra o resultado da medida de espalhamento de luz dinâmica.

nm: nanômetros; U.A.: unidades aritméticas. O pico apresenta valor máximo em ~100nm.

Figura 19. Curva da intensidade do sinal em unidades arbitrária (U.A.), *versus* o diâmetro, em nanômetros (nm) representando a distribuição do tamanho hidrodinâmico para nanopartículas de óxido de ferro e quitosana com cobre acoplado

A figura 19, mostra uma curva representativa das NPOF_{qui-Cu} polidispersas, com diâmetro hidrodinâmico médio das NP corresponde ao pico máximo da curva com valor aproximado de 100nm.

4.6 Caracterização relaxométrica das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana mediante a técnica de imagens por ressonância magnética

Os estudos de relaxometria foram realizados para o cálculo de relaxação transversal (T_2) e a constante de relaxometria r_2 de uma suspensão NPOF_{qui-Cu} com tamanho de 100nm utilizando imagens ponderadas no tempo de relaxação transversal T_2 obtidas mediante IRM.

As imagens de RM do *phantom* obtidas mediante a sequência SE_MS nas diferentes concentrações estudadas estão apresentadas na figura 20, mostrando o decréscimo da intensidade do sinal pelo incremento da concentração destas NPOF_{qui-Cu}. Em uma mesma imagem com um tempo TE determinado, a perda do sinal é alta para amostras mais concentradas, mostrando que altas concentrações das NPOF_{qui-Cu} correspondem a uma perda alta do sinal devido ao encurtamento de T_2 .

Nesta figura são mostradas como exemplo algumas das imagens obtidas para diferentes tempos de TE (*echo*).

Figura 20. Imagens obtidas mediante a técnica de imagens por ressonância magnética utilizando a sequência SE-MS nas diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre (0,5,10,15,20,25,30,35,40 e 50ug/mL)

A determinação dos valores de T_2 para cada concentração das NPOF_{qui-Cu} foi realizada com o ajuste dos dados de intensidade do sinal medida usando-se uma região de interesse (ROI) em função do TE, conforme apresentado na figura 21. Nesta figura, observa-se a redução de T_2 associado ao incremento das

concentrações de NPOFqui-Cu no *phantom*. Em altas concentrações, o efeito do tempo de relaxação T_2 é predominante.

Figura 21. Curvas da intensidade do sinal (U.A.) de IRM em função do TE (ms) para amostras de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado nas concentrações de 5 a 50 $\mu\text{gFe/mL}$

Os valores de T_2 de suspensões coloidais de NPOFqui-Cu resultantes do ajuste das curvas de intensidade *versus* TE para diferentes concentrações estão sumarizados na tabela 8 e mostrados no histograma para melhor análise na figura 22. O efeito induzido pelas NPOFqui no tempo de relaxação T_2 na diminuição da intensidade do sinal ocorre devido aos domínios de magnetização espontânea nessas NP que alinham seus momentos de dipolo magnético tornando-se fortemente magnetizados por um campo magnético externo. A presença das NPOFqui aumenta localmente o campo magnético externamente aplicado, produzindo heterogeneidade que, por sua vez, promove defasagem resultando em perda do sinal, alterando assim o tempo de relaxação T_2 .

Tabela 8. Distribuição das concentrações de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana no *phantom* em solução de agarose 1% e valores de T_2 incluindo as incertezas ΔT_2

[Fe] ($\mu\text{g/mL}$)	0	5	10	15	20	25	30	35	40	50
T_2 (ms)	97,2	38,7	25,9	19,1	18,4	14,0	12,5	11,5	10,4	9,0
ΔT_2 (ms)	4,2	1,3	1,0	0,8	0,9	0,7	0,7	0,6	0,6	0,5

T_2 : tempo de relaxação; ΔT_2 : incertezas de T_2 .

Figura 22. Gráfico de barras do tempo de relaxação transversal (T2) em função da concentração de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana nas concentrações de ferro analisadas

A relaxividade r_2 foi determinada mediante o ajuste linear pelo método dos mínimos quadrados da inclinação do gráfico $1/T_2$ versus concentração de ferro das amostras de NPOFqui nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 50 µgFe/mL, como mostrado na figura 23.

Figura 23. Correlação entre a taxa de relaxação $R_2=1/T_2$ e a concentração nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana nas concentrações de ferro analisadas

4.7 Visualização da captação das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana pelos granulócitos

Os granulócitos isolados e marcados com NPOFqui e NPOFqui-Cu sob ativação celular com LPS e sem ativação, foram submetidas à coloração de azul de Prússia para visualizar a internalização das NPOF nas células em diferentes condições.

A figura 24 demonstra a internalização das NPOFqui, visualizada por coloração de azul de Prússia nos granulócitos sem a ativação por LPS e com ativação por LPS e a figura 25 ilustra os granulócitos com internalização das NPOFqui-Cu sob a ativação LPS e sem LPS. Visualmente a membrana dos granulócitos apresentam maior carga de ferro, se apresentando mais coradas, quando ativadas pela presença de LPS, o mesmo efeito ocorre no interior celular, há um aumento de coloração no citoplasma dos granulócitos.

NPOF: nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana; LPS: lipopolissacarídeos.

Figura 24. Avaliação da marcação por azul de Prússia da marcação dos granulócitos com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana na ausência (A,C) e presença de LPS (B,D). (A,B) 100x, (C,D) 40x

NPOF: nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana; LPS: lipopolissacarídeos.

Figura 25. Avaliação da marcação por azul de Prússia da marcação dos neutrófilos com NPOFqui-Cu na ausência (A,C) e presença de LPS (B,D). (A,B) 60x, (C,D)40x

4.8 Quantificação da internalização de NPOF pelos granulócitos mediante IRM

Os estudos de relaxometria *in vitro* foram realizados para os tempos de relaxação transversal. Foram analisadas amostras de granulócitos com e sem influência de LPS visando avaliar eficiência de internalização das NPOFqui. Assim, a placa de cultura celular de 96 poços contendo granulócitos, previamente marcados com NPOFqui com concentração de $30\mu\text{gFe/mL}$, dispersos em agarose 1%, foram submetidos a exame pela técnica de IRM com uma sequência de pulsos ponderadas no tempo de relaxação transversal T2. O efeito da concentração de NPOFqui, internalizadas pelos granulócitos sob influência ou não de LPS, no tempo de relaxação nuclear foi analisado.

As imagens de IRM do *phantom* obtidas mediante a sequência SE_MS das amostras de granulócitos (10^6), sob influência ou não de LPS, previamente marcados com $30\mu\text{gFe/mL}$ de NPOFqui, dispersos em agarose 1%, são mostradas na

figura 26, indicando o decréscimo da intensidade do sinal de ressonância devido ao incremento da internalização de NPOFqui influenciada pelo uso LPS na ativação dos granulócitos. Em uma mesma imagem com um tempo TE determinado, a perda do sinal é maior para amostras que contêm granulócitos e tratados com LPS, mostrando assim que altas concentrações das NPOFqui correspondem a uma perda do sinal devido ao encurtamento de T2.

Nesta figura são mostradas como exemplo algumas das imagens obtidas para diferentes tempos de *echo* (TE).

Figura 26. Imagens obtidas mediante a técnica de ressonância magnética utilizando a sequência *Spin Echo – Multi Slice* de granulócitos (10^6), sob a influência de lipopolissacarídeos, marcados com $30\mu\text{gFe/mL}$ de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana

A determinação dos valores de T2 para amostras de amostras de granulócitos (10^6), sob influência ou não de LPS, previamente marcados com $30\mu\text{gFe/mL}$ de NPOFqui, dispersos em agarose 1%, foi realizada mediante ajuste dos

dados de intensidade do sinal medida usando-se uma região de interesse (ROI) em função do TE, conforme apresentado na figura 27, nesta figura, observa-se a redução de T2 associado ao incremento das quantidade de NPOFqui internalizada pelos granulócitos. Para granulócitos tratados com LPS, o efeito do tempo de relaxação T2 é curto em comparação com granulócitos não tratados com LPS.

Figura 27. Curvas da intensidade do sinal (U.A.) em função do tempo de *echo* (ms) para amostras de granulócitos (10^6), evidenciando a influência de lipopolissacarídeos, marcados com 30μgFe/mL de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana

Os valores de T2 das amostras de granulócitos (10^6), sob influência ou não de LPS, previamente marcados com 30μgFe/mL, dispersos em agarose 1%, resultantes do ajuste das curvas de intensidade *versus* TE estão sumarizados na tabela 9 e mostrados em gráfico de barras para melhor análise na figura 28. O efeito induzido pelas NPOFqui no tempo de relaxação T2 na diminuição da intensidade do sinal está associado com o tratamento dos granulócitos com LPS que incrementa a captação de NP.

T2: Tempo de Relaxação; 1/T2: Inversa de T2.

Figura 28. Histograma do tempo de relaxação transversal, T2 para amostras de granulócitos (10^6), evidenciando a influência de lipopolissacarídeos, marcados com 30µgFe/mL de nanopáticulas

Tabela 9. Valores de t2 e resultados da quantificação determinados por ressonância magnética para amostras de granulócitos (10^6), evidenciando a influência de lipopolissacarídeos, marcados com 30µgFe/mL de nanopáticula de óxido de ferro revestida com quitosana

[Fe] (ug/mL)	T2 (ms)	1/T2 (ms ⁻¹)	Fe quantificado (ug/mL)	Fe internalizado (%)
0	57,0±1,8	0,018	--	--
30	38,0±1,2	0,026	4,41	14
30+LPS	22,5±0,8	0,044	13,49	45

4.9 Viabilidade dos granulócitos nos métodos de isolamento

Através de marcadores de morte celular como anexina V e PI e citometria de fluxo foi possível verificar a viabilidade dos granulócitos isolados dos principais métodos de isolamento; o método gradientes de Percoll e Percoll mais Ficoll. A taxa de inviabilidade celular dos granulócitos após 4 horas de isolamento no método gradientes de Percoll foi de 5,4% de células marcadas com PI-PE e 7,4% de marcação com anexina V- FITC como mostrado na figura 29 A-D.

SSC-A: Side Scatter; FSC: Forward Scatter; PI-PE: Iodeto de Propídio; Anexina V-FITC: Anexina com isotiocianato de fluoresceína.

A: granulócitos isolados na presença de hemácias como contaminante; B: células marcadas com PI-PE (5,4%); C: células marcadas com PI-PE e anexina V- FITC simultaneamente e D: células marcadas com anexina V- FITC (7,4%).

Figura 29. Viabilidade celular dos granulócitos isolados pelo método de isolamento gradientes de Percoll

No método de isolamento Percoll mais Ficoll foi obtido 6,2% de células marcadas com PI-PE e 5,7% de marcações com anexina V- FITC, como mostrado na figura 30 A-D. Valores de viabilidade semelhante em ambos os métodos de isolamento.

SSC-A: Side Scatter; FSC: Forward Scatter; PI-PE: Iodeto de Propídio; Anexina V-FITC: Anexina com isotiocianato de fluoresceína. A: granulócitos isolados na presença de hemácias como contaminante; B: células marcadas com PI-PE (5,4%); C: células marcadas com PI-PE e Anexina V- FITC simultaneamente e D: células marcadas com anexina V- FITC (7,4%).

Figura 30. Viabilidade celular dos granulócitos isolados pelo método de isolamento Percoll mais Ficoll

Para corroborar com o resultado da viabilidade por citometria de fluxo foi realizado lâminas de microscopia com coloração de Panótico dos métodos de isolamento ao decorrer do tempo. Lâminas com 1, 2, 3 e 4 horas após o término do isolamento para avaliar morfologicamente o comportamento celular. A figura 31 A-D mostra as imagens em tempos determinados no método gradientes de Percoll e na figura 32 A-D no método Percoll mais Ficoll.

A: após 1 hora de isolamento; B: 2 horas; C: 3 horas e D: 4 horas.

Figura 31. Granulócitos isolados pelo método gradientes de Percoll e coloração de Panótico em aumento de 40x

A: após 1 hora de isolamento; B: 2 horas; C: 3 horas e D: 4 horas.

Figura 32. Granulócitos isolados pelo método Percoll mais Ficoll e coloração de Panótico em aumento de 40x

4.10 Viabilidade dos granulócitos marcados

4.10.1 Viabilidade dos granulócitos após o isolamento

A viabilidade após o isolamento dos granulócitos pelo método Percoll mais Ficoll foi de 99,1%. Como é mostrado na figura 33A-D.

SSC-A: Side Scatter; FSC: Forward Scatter; PI-PE: Iodeto de Propídio; Anexina V-FITC: Anexina com isotiocianato de fluoresceína. A: granulócitos isolados; B: células marcadas com PI-PE (1,3%); C: células marcadas com PI-PE e anexina V- FITC simultaneamente e D: células marcadas com anexina V- FITC (1,1%).

Figura 33. Viabilidade celular dos granulócitos isolados pelo método de isolamento Percoll mais Ficoll

4.10.2 Viabilidade dos granulócitos marcados com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado

A marcação somente com NPOFqui-Cu em uma concentração de 20 μ g/mL apresentou 76,1% de granulócitos viáveis após duas horas de marcação como é mostrada na figura 34A-D.

SSC-A: Side Scatter; FSC: Forward Scatter; PI-PE: Iodeto de Propídio; Anexina V-FITC: Anexina com isotiocianato de fluoresceína. A: granulócitos isolados; B: células marcadas com PI-PE (22%); C: células marcadas com PI-PE e anexina V- FITC simultaneamente e D: células marcadas com anexina V- FITC (26,7%).

Figura 34. Viabilidade celular dos granulócitos isolados e marcados com NPOFqui-Cu

4.10.3 Viabilidade dos granulócitos marcados com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado com adição de N-acetil-L cisteína

A viabilidade dos granulócitos após duas horas de marcação com NPOFqui-Cu com adição prévia de 15 minutos de NAC em uma concentração de 10mM/mL foi de 98,8% como mostrado na figura 35A-D.

SSC-A: Side Scatter; FSC: Forward Scatter; PI-PEIodeto de Propídio; Anexina V-FITC: Anexina com isotiocianato de fluoresceína. A: granulócitos isolados; B: células marcadas com PI-PE (1,2%); C: células marcadas com PI-PE e anexina V- FITC simultaneamente e D: células marcadas com anexina V- FITC (1,8%).

Figura 35. Viabilidade celular dos granulócitos marcados com NPOFqui-Cu com adição de 10mM/mL de NAC

A viabilidade dos granulócitos após duas horas de marcação com NPOFqui-Cu com adição prévia de 15 minutos de NAC em uma concentração de 30mM/mL foi de 98,7% (Figura 36A-D).

SSC-A: Side Scatter; FSC: Forward Scatter; PI-PE: Iodeto de Propídio; Anexina V-FITC: Anexina com isotiocianato de fluoresceína. A: granulócitos isolados; B: células marcadas com PI-PE (1,2%); C: células marcadas com PI-PE e anexina V- FITC simultaneamente e D: células marcadas com anexina V- FITC (3,1%).

Figura 36. Viabilidade celular dos granulócitos marcados com NPOFqui-cu com adição de 30mM/mL de NAC

4.10.4 Viabilidade dos granulócitos marcados com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana e cobre acoplado com ativação por lipopolissacarídeos

A viabilidade dos granulócitos ativados por duas horas com LPS e marcados por mais duas horas com NPOFqui-cu foi de 99,6% (Figura 37A-D).

SSC-A: Side Scatter; FSC: Forward Scatter; PI-PE: Iodeto de Propídio; Anexina V-FITC: Anexina com isotiocianato de fluoresceína. A: granulócitos isolados; B: células marcadas com PI-PE (0,6%); C: células marcadas com PI-PE e anexina V- FITC simultaneamente e D: células marcadas com anexina V- FITC (0,4%).

Figura 37. Viabilidade celular dos granulócitos ativados com LPS e marcados com NPOFqui-cu

O método de isolamento com Percoll e Ficoll, apresentou maior número de pureza celular e foi escolhido como controle das marcações dos granulócitos com NPOFqui-cu em diferentes condições; na tentativa de encontrar a melhor condição de marcação de um ponto de vista de viabilidade celular.

Os granulócitos quando marcados com NPOFqui-cu após 2 horas apresentaram uma taxa de apoptose de aproximadamente 23%. Esse valor foi reduzido a 1% com a adição prévia de NAC, auxiliando na viabilidade da marcação dos granulócitos.

A ativação dos granulócitos com LPS e marcação praticamente não houve diferença de viabilidade em relação ao controle. As diferentes condições de marcação e suas respectivas viabilidades estão na figura 38.

NPOFqui: nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana; NAC10+NPOFqui: adição de 10mMol/mL de N-acetil-L Cisteína na marcação com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana; NAC30+NPOFqui: adição de 30mMol/mL de N-acetil-L cisteína na marcação com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana; LPS+NPOFqui: marcação com ativação dos granulócitos com lipopolissacarídeos e nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana.

Figura 38. Histograma de apoptose nas diferentes condições para avaliar a viabilidade dos granulócitos realizados por citometria de fluxo

4.11 Sínteses de nanopartículas de óxido de ferro pelo método de coprecipitação

As NPOFqui foram sintetizadas pelo processo de coprecipitação. A figura 39 mostra as etapas seguidas no processo de síntese. O processo foi iniciado com a preparação das soluções de cloreto ferroso, solução de cor esverdeada, (Figura 39A) e a solução de cloreto férrico (Figura 39B), caracterizada pela cor avermelhada. Seguidamente foram misturadas as duas soluções de cloreto de ferro (Figura 39C) produzindo uma solução com cor amarelada. A formação dos núcleos de oxido de ferro se inicia com adição de hidróxido de amônia concentrado (Figura 39D). O precipitado de NP de oxido de ferro foi obtido para um pH 10, o precipitado e caracterizado por uma massa preta e viscosa (Figura 39E). Para eliminação de impurezas o precipitado foi lavado com o auxílio do campo magnético utilizando, ima permanente de neodímio (Figura 39F). Finalmente o precipitado limpo de impurezas foi disperso na água

produzindo um ferrofluido caracterizado por carregar o líquido conjuntamente com as NP magnéticas dispersas nele, como mostrado na figura 39G.

(A) solução de cloreto de ferroso; (B) solução de cloreto férrico; (C) mistura das soluções de cloreto de ferro; (D) Adição de hidróxido de amônia concentrado; (E) Precipitado de nanopartículas de óxido de ferro; (F) lavagem magnético utilizando ima permanente de neodímio; (F) nanopartículas de óxido de ferro dispersas na água sob ação de campo magnético.

Figura 39. Imagens mostrando as etapas do processo de síntese de nanopartículas a base de óxido de ferro

5 DISCUSSÃO

Considerando as dificuldades para o adequado isolamento dos granulócitos, sem dúvida, foi a etapa mais desafiadora do estudo, pois devido a variabilidade de células presente no sangue, a separação dos granulócitos requer centrifugações do sangue em meios com diferentes densidades. No presente trabalho a separação com alta pureza de granulócitos foi necessária devido sua importância para marcação eficaz e confiável como método futuro de detecção por imagens de PET/IRM para avaliação de processos inflamatórios e infecciosos.

A primeira estratégia adotada para a separação dos granulócitos foi a utilização do Percoll com PBS em diferentes gradientes de densidade, contudo, diferente de outros trabalhos como o de Woldehiwet et al.⁽⁵⁸⁾ que obteve êxito ao separar granulócitos em sangue de ovelhas, com sangue humano não houve êxito.

A principal ressalva em relação ao método com Percoll descrito por outros autores;^(32,59,60) para a separação de granulócitos, é o grau de pureza na separação, pois ao término do processo ainda apresenta contaminantes como linfócitos que foram detectados por meio do uso de contador automático de células e por meio da coloração com Panótico. Outra ressalva em relação ao método, é a contaminação com hemácias, que a quantidade, demanda a realização de hemólise, com lisantes comerciais, para isolar os granulócitos, não sendo viável de um ponto de vista clínico, além de aumentar o tempo de separação em duas horas, podendo gerar morte dos granulócitos isolados. Apesar de não apresentar uma pureza alta e ter grande quantidade de hemácias na amostra esse método pode ser uma alternativa para separação dos granulócitos dependendo do objetivo do estudo.

Na tentativa de aumentar a pureza de células granulocíticas, foi adotado o método com HBSS e VF com adição de uma centrifugação com Ficoll, para separar as células contaminantes dos granulócitos. A técnica combinada apresentou resultados com alta pureza não encontrados na literatura. Utilizando anticorpos específicos para granulócitos, linfócitos T e B e monócitos, foi possível verificar a eficiência do método Percoll com Ficoll por citometria de fluxo apresentando uma pureza de 95% de granulócitos com 4,5% de Linfócitos, Monócitos e células NK.⁽⁶¹⁾

Após determinado o melhor método de separação dos granulócitos foi realizado o acoplamento do cobre nas NPOF_{qui}. O tempo para atingir o equilíbrio de

adsorção de íons de Cu(II) pela quitosana que recobre as NP, considerado neste estudo foi de ~30 minutos, tempo relatado pela literatura.⁽¹⁸⁾ No entanto, avaliações da capacidade de adsorção de íons de Cu(II) para períodos de 0 até 60 minutos não apresentaram diferenças significativas, assim o equilíbrio da adsorção dos íons de Cu(II) pelas NPOF_{qui} acontece rapidamente (<60 segundos), isto pode ser explicada pelo fenômeno de difusão rápida dos íons metálicos de Cu(II). O aumento na eficiência da adsorção foi adjudicada à elevada área superficial das NP e elevada difusão,⁽⁶²⁻⁶⁵⁾ e associada com parâmetros como baixa concentração de Cu(II), concentração de NP, temperatura de reação, pH, densidade, viscosidade, entre outros. A eficiência da adsorção influenciada pela temperatura diminui com o incremento da temperatura devido a que interação eletrostática entre os íons de Cu e quitosana é menor a altas temperaturas, assim a escolha de preparar as amostras na temperatura ambiente foi seguida de resultados de literatura.⁽⁶⁶⁾

A vantagem que apresenta o nanomaterial avaliado em comparação com NP recobertas com outros materiais biocompatíveis, tal como, NP à base de óxido de ferro recobertas com ácido poliacrílico com grupos de troca iônica eficientes para adsorção de enzimas e corantes é que o nanomaterial não é eficiente para íons pesados. No entanto, NP magnéticas à base de óxido de ferro recobertas com quitosana se apresentam com potencial na adsorção de íons metálicos, incluindo íons de metais pesados, devido aos grupos amido na superfície das NP que podem servir como sítios para quelação.⁽⁶⁷⁾

Para confirmar a eficiência do acoplamento do cobre nas NPOF_{qui} foi realizado a quantificação pela técnica de ICP-MS, onde o efeito na variação da capacidade de adsorção de íons metálicos de Cu(II) por NP recobertas com quitosana é associado a mudanças de pH. Assim a quantificação da carga de Cu determinada mediante ICP-MS mostrou que a capacidade de adsorção do Cu se incrementa com o aumento do pH da solução, explicado pela pequena variação da competitividade de adsorção de íons de hidrogênio.⁽⁶⁶⁾ A adsorção está relacionada com a elevada área superficial da NP, como a quitosana está revestindo as NPOF expõe maiores locais de quelação acessíveis para adsorção dos íons de Cu. Portanto, amostras de NPOF_{qui-Cu} na solução de pH 5,5 mostrou maior adsorção de íons de Cu.⁽⁵³⁾

A caracterização da morfologia das NPOF_{qui-Cu} que evidenciou solução aquosa preparada em pH 5,5 e diâmetro hidrodinâmico médio de ~100nm com uma distribuição polidispersa, com índice de polidispersão média (0,3-0,6),

evidenciando que os núcleos foram sintetizados pelo processo químico de precipitação húmida, polidispersão característica do processo de coprecipitação,^(68,69) esta polidispersão associada a variações nos parâmetros físicos como tamanho, forma, cristalinidade e revestimento das NPOF_{qui-Cu} influencia nas propriedades magnéticas como magnetização de saturação, coercitividade, temperatura de bloqueio e tempo de relaxamento.⁽⁶⁶⁾ Outro dos parâmetros importantes da amostra que será utilizada na marcação dos granulócitos é o valor de r_2 que garante a eficiência na detecção dos granulócitos por técnicas de IRM, assim a relaxividade levemente maior poderia refletir que NPOF_{qui} agregadas geram uma flutuação de campo magnético local um pouco maior do que as NPOF_{qui} dispersas. O fato da relaxividade transversal r_2 ter um valor de $\sim 20 \times 10^4 \text{ ms}^{-1} \text{ ugFe}^{-1} \text{ mL}$ poderia ser atribuído à sensibilidade das NPOF_{qui} para inhomogeneidades magnéticas devido ao tamanho do núcleo magnético das NP. Outra influência no valor da relaxividade é devida ao efeito da espessura da camada biocompatível de quitosana que recobre as NPOF, já que para atingir o efeito máximo do agente de contraste no tempo de relaxação transversal T_2 as ferritas devem ser revestidas com camadas o mais delgadas possíveis, uma vez que a interação entre NP magnéticas e moléculas da água depende da sua distância.^(70,71)

Após encontrado o melhor método de separação dos granulócitos e as melhores condições de acoplar o cobre nas NPOF_{qui}, foi realizado a marcação dos granulócitos e avaliado a eficiência da internalização mediante a técnica de IRM, na presença e ausência de LPS.⁽⁵²⁾

Os granulócitos marcados com NPOF_{Qui} e NPOF_{Qui-Cu} e posteriormente corados com azul da Prússia evidenciaram a células em tons de azul em seu citoplasma evidenciando a internalização das NP, conforme foi evidenciado por outros trabalhos que obtiveram êxito na marcação celular.⁽⁴⁶⁾

A internalização das NPOF pelos granulócitos após sua ativação com LPS, aumentou o número de células marcadas, além de indicar o aumento de carga de ferro devido a maior pigmentação por azul da Prússia.⁽⁴⁶⁾

Além das evidências microscópicas de melhor marcação de granulócitos com o uso de LPS a avaliação da carga de ferro por IRM indicou queda no sinal de T_2 em relação ao grupo de células marcadas e sem a ativação prévia.⁽⁴⁶⁾ Visando o monitoramento por IRM de granulócitos marcados com NPOF_{qui} para realização do processo de transfecção celular *in vivo*, considerando a detecção de contraste em IRM foi avaliado granulócitos tratados e não tratados com LPS e

marcados com NPOF_{qui}. Conforme esperado a avaliação relaxométrica demonstrou que o valor do tempo de T2 diminui com o aumento da captação de NPOF_{qui} pelos granulócitos, ou seja, quanto maior a quantidade de NPOF_{qui} internalizadas pelos granulócitos, maior o contraste por IRM. Assim, a detecção por IRM foi eficaz para granulócitos tratados com LPS mostrando uma internalização de 45% de NPOF_{qui} em relação à captação de NPOF_{qui} pelos granulócitos não tratados com LPS de 22%.

Os dados gerados neste trabalho demonstram que o uso de LPS favorece a internalização de NPOF_{qui-cu} pelos granulócitos. Assim, granulócitos eficientemente marcados com NPOF_{qui-cu} se demonstram como alternativa para avaliação de diagnóstico de processos inflamatórios por IRM.

A viabilidade dos granulócitos foram praticamente similares nos métodos de isolamento usando gradientes de Percoll com o método Percoll mais Ficoll,⁽⁷²⁾ apresentando mais de 80% de células viáveis após quatro horas de isolamento. Portanto o método Percoll mais Ficoll se apresentou o mais útil em experimentos com granulócitos devido à alta pureza celular e baixa taxa de células em apoptose inicial e tardia.

A internalização das NPOF pelos granulócitos apresentou uma apoptose de 22% após três horas de marcação demonstrando que após a internalização, os granulócitos entram em um processo de apoptose, possivelmente pela formação de espécies reativas de oxigênio como foi mostrando em outros trabalhos.^(73,74) Essa taxa de apoptose pode ser reduzida de forma expressiva se antes do processo de marcação for realizada a adição de NAC; com esse processo o número de apoptose reduziu de 22% para 1,2%; devido ao bloqueio de formação de espécies reativas de oxigênio, assim reduzindo o a viabilidade celular.^(74,75)

Os granulócitos ativados pela presença de LPS, além de aumentar a internalização de carga de ferro, manteve a integridade celular durante o processo de marcação, assim sendo o método mais vantajoso de marcação de granulócitos de um ponto de vista de internalização e viabilidade das NPOF e contraste de IRM.

Adicionalmente aos objetivos do projeto foi realizado a síntese de NPOF pelo método de coprecipitação, para que em pesquisas futuras se tenha uma alternativa de contar com este tipo de material desenvolvido laboratorialmente, podendo ser avaliado outros fatores como diversos tamanhos das NPOF que influenciaria na carga de ferro na internalização, na toxicidade, entre outros. Neste sentido foi acrescentado ao trabalho a síntese pelo método de coprecipitação

mostrando reprodutibilidade e polidispersão semelhante às NPOF utilizados no presente trabalho.

6 CONCLUSÕES

1. A marcação de granulócitos isolados com alta pureza do sangue periférico humano e marcados com nanopartículas se evidenciaram como uma alternativa futura na detecção de processos inflamatórios, tendo em vista estratégias de marcação e alteração do sinal de imagens por ressonância magnética.

2. A separação dos granulócitos pelo método conjunto de Percoll e Ficoll apresentou uma alta pureza em relação aos outros métodos, a técnica combinada apresentou 95 % de granulócitos, com contaminantes de linfócitos T e B e monócitos. confirmados pela técnica de citometria de fluxo.

3. As nanopartículas de óxido de ferro recobertas com quitosana e acoplada com cobre possui uma maior eficiência de quando ajustada para pH 5,5 no qual apresentou maior quantidade de cobre acoplado as nanopartículas de óxido de ferro recobertas com quitosana devido a ausência de competição por íon de hidrogênio livres na reação. O acoplamento do cobre não modificou o tamanho da nanopartículas, mantendo suas propriedades paramagnéticas. Estudos por imagens de ressonância magnética com nanopartículas de óxido de ferro recobertas com quitosana em diferentes concentrações, quando submetidos a diferentes tempos de *echo* demonstrou um valor de r^2 , possibilitando avaliar a concentração de ferro nos diferentes processos marcações dos granulócitos.

4. Nas marcações dos granulócitos com nanopartículas de óxido de ferro foi observado o aumento de internalização de carga de ferro quando os granulócitos são submetidos a ativação com lipopolissacarídeos, internalização esta, observada por coloração de azul de Prússia e por imagens de ressonância magnética. As células ativadas apresentaram uma internalização aproximadamente o dobro das células não ativadas, demonstrado por imagens de ressonância magnética e com a redução de T2 no grupo com ativação, gerando uma hipótese plausível de aumento de sinal no diagnóstico por imagem de processos inflamatórios.

5. Os granulócitos isolados mantiveram praticamente a mesma viabilidade celular nos métodos de isolamento Percoll e Percoll mais Ficoll, demonstrado a mínima toxicidade do método de isolamento nas células. A marcação somente com nanopartículas de óxido de ferro recobertas com quitosana nos granulócitos apresentou uma taxa de morte de 22%, que foram reduzidas para 1,2%

em uma adição prévia a marcação de N-Acetil-L cisteína, não apresentando diferenças entre as concentrações de 10 e 30mM. A viabilidade dos granulócitos após a ativação com lipopolissacarídeos e marcação foi de 99,6%, se apresentando uma abordagem ideal para marcação de granulócitos; internalizando mais carga de NPOF sem alterar a viabilidade celular.

7 REFERÊNCIAS

1. Jancar S. Imunidade inata e inflamação. In: Calich VL, Vaz CA. *Imunologia*. 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2009. p. 17–39.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai A. *Imunologia celular e molecular*. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
3. Dumarey N, Egrise D, Blocklet D, Stallenberg B, Remmelink M, del Marmol V, et al. Imaging infection with 18F-FDG-labeled leukocyte PET/CT: initial experience in 21 patients. *J Nucl Med*. 2006;47(4):625-32.
4. Tsopelas C. Radiotracers used for the scintigraphic detection of Infection and Inflammation. *ScientificWorldJournal*. 2015;676719.
5. Aydın F, Kın Cengiz A, Güngör F. Tc-99m labeled HMPAO white blood cell scintigraphy in pediatric patients. *Mol Imaging Radionucl Ther*. 2012;21(1):13–8.
6. Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol*. 2018;9:113. Figure 2, Granulopoiesis. Neutrophils are produced in the bone marrow. From a self-renewing hematopoietic stem cell (HSC), a multipotent progenitor (MPP) cell is formed. MPPs give rise to lymphoid-primed multipotent progenitors (LPMP), which differentiate into granulocyte-monocyte progenitors (GMP). These GMPs, under control of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) commit to neutrophil generation by turning into myeloblasts, which then follow a maturation process that includes the stages of promyelocyte, myelocyte, metamyelocyte, band cell, and finally a mature neutrophil; p. 3.
7. Bhargava KK, Gupta RK, Nichols KJ, Palestro CJ. In vitro human leukocyte labeling with (64)Cu: an intraindividual comparison with (111)In-oxine and (18)F-FDG. *Nucl Med Biol*. 2009;36(5):545–9.
8. Cherry SR. The 2006 Henry N. Wagner lecture: of mice and men (and positrons)—advances in PET imaging technology. *J Nucl Med*. 2006;47(11):1735–45.
9. Cherry SR. Fundamentals of positron emission tomography and applications in preclinical drug development. *J Clin Pharmacol*. 2001;41(5):482–91.
10. Corot C, Robert P, Idée JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(14):1471–504.
11. van Eerd JE, Laverman P, Oyen WJ, Harris TD, Edwards DS, Ellars CE, et al. Imaging of experimental colitis with a radiolabeled leukotriene B4 antagonist. *J Nucl Med*. 2004;45(1):89-93.
12. Thrall JH, Ziessman HA. *Medicina nuclear*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. Capítulo 8, Infecção e Inflamação; p.167-91.
13. Thakur ML, Coleman RE, Welch MJ. Indium-111-labeled leukocytes for the localization of abscesses: preparation, analysis, tissue distribution, and comparison with gallium-67 citrate in dogs. *J Lab Clin Med*. 1977;89(1):217–28.
14. McAfee JG, Samin A. In-111 labeled leukocytes: a review of problems in image interpretation. *Radiology*. 1985;155(1):221–9.

15. Hofman MS, Kong G, Neels OC, Eu P, Hong E, Hicks RJ. High management impact of Ga-68 DOTATATE (GaTate) PET/CT for imaging neuroendocrine and other somatostatin expressing tumours. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2012;56(1):40–7.
16. Toyota T, Hanafusa T, Oda T, Koumura I, Sasaki T, Matsuura E, et al. A purification system for ^{64}Cu produced by a biomedical cyclotron for antibody PET imaging. *J Radioanal Nucl Chem*. 2013;298(1):295–300.
17. Breeman WA, de Blois E, Sze Chan H, Konijnenberg M, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. (68)Ga-labeled DOTA-peptides and (68)Ga-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography: current status of research, clinical applications, and future perspectives. *Semin Nucl Med*. 2011;41(4):314–21.
18. Pala A, Liberatore M, D'Elia P, Nepi F, Megna V, Mastantuono M, et al. Labelling of granulocytes by phagocytic engulfment with ^{64}Cu -labelled chitosan-coated magnetic nanoparticles. *Mol Imaging Biol*. 2012;14(5):593–8.
19. Ohya T, Nagatsu K, Suzuki H, Fukada M, Minegishi K, Hanyu M, et al. Efficient preparation of high-quality ^{64}Cu for routine use. *Nucl Med Biol*. 2016;43(11):685–91.
20. Hilgers K, Stoll T, Skakun Y, Coenen H, Qaim SM. Cross-section measurements of the nuclear reactions $\text{natZn}(d,x)^{64}\text{Cu}$, $^{66}\text{Zn}(d,\alpha)^{64}\text{Cu}$ and $^{68}\text{Zn}(p,\alpha)^{64}\text{Cu}$ for production of ^{64}Cu and technical developments for small-scale production of ^{67}Cu via the $^{70}\text{Zn}(p,\alpha)^{67}\text{Cu}$ process. *Appl Radiat Isot*. 2003;59(5-6):343–51.
21. Pedrosa AM. Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxiuréia [dissertação]. [Fortaleza]: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem; 2013.
22. Carneiro PS. Análise da expressão diferencial dos genes envolvidos na resposta inflamatória aguda e crônica e sua influência na carcinogênese química cutânea em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda [tese]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2009.
23. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
24. Gomes RF. Expressão do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli* [tese]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo, Instituto Butantã; 2010.
25. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002;420(6917):846–52.
26. Gómez-Moreno D, Adrover JM, Hidalgo A. Neutrophils as effectors of vascular inflammation. *Eur J Clin Invest*. 2018;48 Suppl 2:e12940.
27. Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol*. 2018;9:113.
28. Silva VC. Caracterização morfológica e funcional da adesão de neutrófilos em diferentes superfícies de titânio [tese]. [Brasília (DF)]: Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina; 2011.

29. Qin CC, Liu YN, Hu Y, Yang Y, Chen Z. Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. *World J Gastroenterol*. 2017;23(17):3043–52.
30. Akira S, Takeda k. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
31. Cruz-Machado SS. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. *Rev Biol*. 2010;4:40-3. Figura 1, Via clássica da ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NFκB e de outros fatores de transcrição; p. 42.
32. de Vries EF, Roca M, Jamar F, Israel O, Signore A; Inflammation/Infection Taskgroup of the European Association of Nuclear Medicine. Guidelines for the labelling of leucocytes with (99m)Tc-HMPAO. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37(4):842–8.
33. Tsopelas C. Radiotracers used for the scintigraphic detection of infection and inflammation. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:676719.
34. Hwang DW, Choi H, Jang SC, Yoo MY, Park JY, Choi NE, et al. Noninvasive imaging of radiolabeled exosome-mimetic nanovesicle using (99m)Tc-HMPAO. *Sci Rep*. 2015;5(1):15636.
35. Miñana E, Roldán M, Chivato T, Martínez T, Fuente T. Quantification of the chromosomal radiation damage induced by labelling of leukocytes with [18F]FDG. *Nucl Med Biol*. 2015;42(9):720-3.
36. Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular. PET e PET/CT em oncologia. São Paulo: Atheneu; 2011.
37. Cherry SR, Sorenson JA, Phelps ME. Physics in nuclear medicine. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2012.
38. Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein. Princípios básicos de diagnóstico por imagem. Funari MB, Nogueira SA, Silva EF, Guerra EG, coordenadores. (Manuais de especialização Einstein, v. 5). Barueri; 2013.
39. Roca M, de Vries EF, Jamar F, Israel O, Signore A; Inflammation/Infection Taskgroup of the European Association of Nuclear Medicine. Guidelines for the labelling of leucocytes with (111)In-oxine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37(4):835–41.
40. Rini JN, Bhargava KK, Tronco GG, Singer C, Caprioli R, Marwin SE, et al. Pet with FDG-labeled leukocytes versus scintigraphy with 111In-oxine-labeled leukocytes for detection of infection. *Radiology*. 2006;238(3):978–87.
41. Palestro CJ. Radionuclide imaging of infection: what the future holds. *Braz Arch Biol Technol*. 2008;51 Suppl:1-5.
42. Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology*. 2004;2(1):3.
43. Bohara RA, Thorat ND, Pawar SH. Role of functionalization: strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. *RSC Adv*. 2016;6(50):43989–4012. Review. Figure 14, Representing different nano-bioapplications of magnetic nanoparticles; p. 44003.
44. Li L, Jiang W, Luo K, Song H, Lan F, Wu Y, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking. *Theranostics*. 2013;3(8):595–615.

45. Strehl C, Gaber T, Maurizi L, Hahne M, Rauch R, Hoff P, et al. Effects of PVA coated nanoparticles on human immune cells. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:3429–45.
46. Sharifi S, Seyednejad H, Laurent S, Atyabi F, Saei AA, Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo molecular and cellular imaging. *Contrast Media Mol Imaging*. 2015;10(5):329–55.
47. Ennas G, Musinu A, Piccaluga G, Zedda D, Gatteschi D, Sangregorio C, et al. Characterization of iron oxide nanoparticles in an Fe₂O₃–SiO₂ composite prepared by a sol–gel method. *Chem Mater*. 1998;10(2):495–502.
48. Rajput N. Methods of preparation of nanoparticles – a review. *Int J Adv Eng Technol*. 2015;7(4):1806–11.
49. Xia T, Wang J, Wu C, Meng F, Shi Z, Lian J, et al. Novel complex-coprecipitation route to form high quality triethanolamine-coated Fe₃O₄ nanocrystals: their high saturation magnetizations and excellent water treatment properties. *CrystEngComm*. 2012;14(18):5741–4.
50. Francisquini E, Schoenmaker J, Souza JA. Nanopartículas magnéticas e suas aplicações. In: Alves WA. *Química supramolecular e nanotecnologia*. Vol. 10. São Paulo: Atheneu. 2014; 269–88.
51. Branco RM. Nanopartículas magnéticas obtidas por coprecipitação homogênea sonoquimicamente assistida [dissertação]. [Poços de Caldas]: Universidade Federal de Alfenas; 2013.
52. Shanhua H, Huijing H, Moon MJ, Heo SH, Lim HS, Park IK, et al. MR detection of LPS-induced neutrophil activation using mannan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Mol Imaging Biol*. 2013;15(6):685–92.
53. Fairclough M, Prenant C, Ellis B, Boutin H, McMahon A, Brown G, et al. A new technique for the radiolabelling of mixed leukocytes with zirconium-89 for inflammation imaging with positron emission tomography. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2016;59(7):270–6.
54. Sollini M, Berchiolli R, Kirienko M, Rossi A, Glaudemans AW, Slart R, et al. PET/MRI in Infection and Inflammation. *Semin Nucl Med*. 2018;48(3):225–41.
55. Yang X, Hong H, Grailer JJ, Rowland IJ, Javadi A, Hurley SA, et al. cRGD-functionalized, DOX-conjugated, and ⁶⁴Cu-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted anticancer drug delivery and PET/MR imaging. *Biomaterials*. 2011;32(17):4151–60.
56. Grosse S, Stenvik J, Nilsen AM. Iron oxide nanoparticles modulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in primary human monocytes. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:4625–42.
57. Vitor T, Martins KM, Ionescu TM, Cunha ML, Baroni RH, Garcia MR, et al. PET/MRI: a novel hybrid imaging technique. Major clinical indications and preliminary experience in Brazil. *einstein (Sao Paulo)*. 2017;15(1):115–8.
58. Woldehiwet Z, Scaife H, Hart CA, Edwards SW. Purification of ovine neutrophils and eosinophils: anaplasma phagocytophilum affects neutrophil density. *J Comp Pathol*. 2003;128(4):277–82.

59. Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N. Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients. *J Immunol Methods*. 1999;232(1-2):131–43.
60. Sroka J, Kordecka A, Włosiak P, Madeja Z, Korohoda W. Separation methods for isolation of human polymorphonuclear leukocytes affect their motile activity. *Eur J Cell Biol*. 2009;88(9):531–9.
61. Inoue T, Swain A, Nakanishi Y, Sugiyama D. Multicolor analysis of cell surface marker of human leukemia cell lines using flow cytometry. *Anticancer Res*. 2014;34(8):4539–50.
62. Liao MH, Chen DH. Preparation and characterization of a novel magnetic nano-adsorbent. *J Mater Chem*. 2002;12(12):3654–9.
63. Liao MH, Chen DH. Fast and efficient adsorption/desorption of protein by a novel magnetic nano-adsorbent. *Biotechnol Lett*. 2002;24(22):1913–7.
64. Yang HW, Hua MY, Liu HL, Huang CY, Wei KC. Potential of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanotechnol Sci Appl*. 2012;5:73–86.
65. Ruey-Shin J, Ru-Ling T, Feng-Chin W, Shwu-Hwa L. Adsorption behavior of reactive dyes from aqueous solutions on chitosan. *J Chem Technol Biotechnol*. 1997;70:391–9.
66. Chang YC, Chen DH. Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for removal of Cu(II) ions. *J Colloid Interface Sci*. 2005;283(2):446–51.
67. Karthikeyan G, Anbalagan K, Andal NM. Adsorption dynamics and equilibrium studies of Zn (II) onto chitosan. *J Chem Sci*. 2004;116(2):119–27.
68. Juang RS, Shao HJ. A simplified equilibrium model for sorption of heavy metal ions from aqueous solutions on chitosan. *Water Res*. 2002;36(12):2999–3008.
69. Kemal E, Peters R, Bourke S, Fairclough S, Bergstrom-Mann P, Owen DM, et al. Magnetic conjugated polymer nanoparticles doped with a europium complex for biomedical imaging. *Photochem Photobiol Sci*. 2018;17(6):718–21.
70. Gonzales-Weimuller M, Zeisberger M, Krishnan KM. Size-dependant heating rates of iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia. *J Magn Magn Mater*. 2009;321(13):1947–50.
71. Khalil MI. Co-precipitation in aqueous solution synthesis of magnetite nanoparticles using iron(III) salts as precursors. *Arab J Chem*. 2015;8(2):279–84.
72. Mosca T, Forte WC. Comparative efficiency and impact on the activity of blood neutrophils isolated by Percoll, Ficoll and spontaneous sedimentation methods. *Immunol Invest*. 2016;45(1):29–37.
73. Lunov O, Syrovets T, Büchele B, Jiang X, Röcker C, Tron K, et al. The effect of carboxydextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles on c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis in human macrophages. *Biomaterials*. 2010;31(19):5063–71.
74. Chen S, Chen S, Zeng Y, Lin L, Wu C, Ke Y, et al. Size-dependent superparamagnetic iron oxide nanoparticles dictate interleukin-1 β release from mouse bone marrow-derived macrophages. *J Appl Toxicol*. 2018;38(7):978–86.

75. Sharma G, Kodali V, Gaffrey M, Wang W, Minard KR, Karin NJ, et al. Iron oxide nanoparticle agglomeration influences dose rates and modulates oxidative stress-mediated dose-response profiles in vitro. *Nanotoxicology*. 2014;8(6):663–75.

Abstract

Introduction: An inflammatory process triggers an accumulation of granulocytes in the injury site. These cells are important in defense against pathogens and tissue repair. Early diagnosis of an inflammation may shorten length of hospital stay and decrease mortality and morbidity, consider that pathophysiology characteristics of granulocytes, labelling of these cells with contrast agents may contribute with the diagnosis using imaging equipment. Labeling with iron oxide nanoparticles and radioactive isotope in granulocytes may contribute to the diagnosis using hybrid equipment such as positron emission tomography combined with magnetic resonance. **Purpose:** To perform the labelling of granulocytes with iron oxide nanoparticles coated with Chitosan, viability and sensitivity study in hybrid PET/MR equipment. **Methods:** The isolation of the granulocytes to achieve high cellular purity was tested in 5 different methodologies, confirmed by flow cytometry. The synthesis of iron oxide nanoparticles with stable copper chloride was performed and evaluated using mass spectrometry and magnetic resonance imaging. Granulocytes were labeled with iron oxide nanoparticles coated with chitosan and with copper. The labeling with the same iron oxide nanoparticles was made with the granulocytes activated by the presence of Lipopolysaccharides in an attempt to increase the iron load internalized by granulocytes. N-acetyl-l-cysteine was previously added to reduce the number of granulocyte apoptosis. The methods of the isolation and labelling tests were performed to fit the best method. **Results:** The method of separation of the granulocytes that showed better purity was with Percoll gradients followed by Ficoll. This combined technique showed 95% granulocytes versus 82% of other methods. Copper coupling in iron oxide nanoparticles was more effective at pH 5.5, both iron oxide nanoparticles with copper were labelled on isolated granulocytes, with and without LPS activation. Internalization was visualized by Prussian blue and magnetic resonance image, and showed a more internalization in the activated cells with lower signal of T2 and more concentration of the Prussian blue. To add N-acetyl-l-cysteine in the granulocytes reduced the number of apoptosis in granulocytes labeled with 22% iron oxide nanoparticles coated with chitosan to 1.2%. **Conclusion:** Isolation with high purity of granulocytes was necessary to improve the detection efficiency of the inflammatory process. The combined technique of Percoll and Ficoll had high purity of granulocytes. These cells which can be labeled with iron oxide nanoparticles coated

with chitosan and iron oxide nanoparticles coated with chitosan with copper as a magnetic resonance imaging contrast agent. To add N-acetyl-L-cysteine has a protective role in granulocytes when labeled with iron oxide nanoparticles, lipopolysaccharides activated cells internalized more iron loading. May be an alternative for diagnostic by imaging.