

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REBECA BOSSO DOS SANTOS LUZ

ÁCIDO ZOLEDRÔNICO COMO MÉTODO DE DEPLEÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA  
ESTUDAR O PROCESSO FIBRÓTICO

CURITIBA

2021

REBECA BOSSO DOS SANTOS LUZ

LIPOSSOMA ENCAPSULADO COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO COMO MÉTODO DE  
DEPLEÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA ESTUDAR O PROCESSO FIBRÓTICO

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de  
Biomedicina como pré requisito para  
a formação e aquisição do título de  
bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Tarcio Teodoro  
Braga

CURITIBA  
2021

## TERMO DE APROVAÇÃO

REBECA BOSSO DOS SANTOS LUZ

ÁCIDO ZOLEDRÔNICO COMO MÉTODO DE DEPLEÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA  
ESTUDAR O PROCESSO FIBRÓTICO

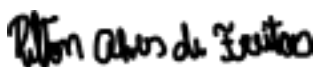
TCC apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.



Prof(a). Dr(a). Tarcio Teodoro Braga  
Orientador(a) – Departamento de Patologia Básica, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



Profa. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga  
Departamento de Patologia Básica, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas  
Departamento de Química, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Curitiba, 11 de fevereiro de 2021.

## RESUMO

A fibrose é um processo que ocorre quando há falha no reparo tecidual, sendo caracterizada pela deposição excessiva de matriz extracelular. Os macrófagos são células do sistema imune que participam destes processos. Entender este processo auxiliará no desenvolvimento de terapias para doenças relacionadas com a falha no reparo tecidual. A depleção de macrófagos é uma maneira de entender a sua função nos processos de regeneração e fibrose. Alguns métodos de depleção utilizam animais transgênicos que não expressam certos genes essenciais para o funcionamento dos macrófagos e outros modelos geneticamente modificados são capazes de depletar tais células após a administração de fármacos específicos. Um outro modelo utiliza lipossomas encapsulados com fármacos bifosfonatos para induzir à apoptose nos macrófagos, que são capazes de fagocitar tais partículas. O fármaco utilizado tradicionalmente para este método é o clodronato. No entanto, ele não é mais produzido no Brasil, assim como também não existem empresas que fabricam soluções contendo lipossomas encapsulados com clodronato, como no exterior. Por isso faz-se necessária uma forma de depleção alternativa, e no presente trabalho, foi escolhido substituir o clodronato por outro fármaco bifosfonato, o ácido zoledrônico. O peixe paulistinha (*Danio rerio*) é uma espécie capaz de regenerar órgãos e até mesmo a nadadeira caudal. Entender os mecanismos da regeneração deste animal, poderá ajudar a entender a fibrose e também desenvolver terapias para esse distúrbio. O presente trabalho tem como objetivo realizar a padronização do método de depleção utilizando lipossoma encapsulado com ácido zoledrônico, testar o método *in vivo* e realizar uma breve comparação entre os métodos existentes.

Palavras-Chave: Macrófagos. Regeneração. Fibrose. Ácido Zoledrônico. Depleção de macrófagos. *Zebrafish*. Lipossoma encapsulado com bifosfonatos.

## ABSTRACT

The fibrosis is a process that occurs when there is a flaw in the tissue repair, being characterized by an excessive extracellular matrix deposition. Macrophages are innate immune cells that participate in this process. To understand of that process will help in the development of tissue repair related diseases therapies. The macrophage depletion is a way to understand its function in fibrosis and regeneration. Some depletion methods use transgenic animals without macrophages and others utilizes animals that do not express certain essentials genes to the macrophage function. Another model utilizes biphosphonate encapsulated liposomes to generate apoptosis in the macrophage that will phagocytize the particle. The drug that is traditionally used for this method is clodronate. However, it is no longer produced in Brazil, just as there are no companies that manufacture solutions containing clodronate encapsulated liposomes, as it exists abroad. Therefore, an alternative form of depletion is necessary. In the present work, it was chosen to replace clodronate with another bisphosphonate drug, zoledronic acid. The animal model *Danio rerio* is a species capable of regenerating organs and even the caudal fin. Understanding the mechanisms of this animal's regeneration may help to understand fibrosis and also develop therapies for this disorder. This work aims to standardize the depletion method using liposome encapsulated with zoledronic acid, test the method in vivo and perform a brief comparison between the existing methods.

Keywords: Macrophages. Regeneration. Fibrosis. Zoledronic acid. Macrophage depletion. Zebrafish. Liposome encapsulated with bisphosphonates.

# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
1.1 JUSTIFICATIVA.....	7
1.2 OBJETIVOS.....	8
1.2.1 Objetivo geral.....	8
1.2.2 Objetivos específicos.....	8
1.3 METODOLOGIA.....	8
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
2.1 MACRÓFAGOS.....	10
2.2 FIBROSE E REGENERAÇÃO TECIDUAL.....	11
2.3 MÉTODOS DE ESTUDO DOS MACRÓFAGOS E O ÁCIDO ZOLEDRÔNICO.....	12
2.3.1 O ácido zoledrônico.....	13
2.4 O MODELO ANIMAL ZEBRAFISH.....	14
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 CONFECÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	16
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO LIPOSSOMA.....	16
3.3 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO.....	16
3.4 MODELO ANIMAL.....	17
3.5 ABLAÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	18
3.6 ANESTESIA, CIRURGIA E INJEÇÃO.....	18
3.7 AQUISIÇÃO DE IMAGENS.....	19
3.8 MEDIDAS DAS IMAGENS.....	19
3.9 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DEPLEÇÃO.....	19
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
4.1 PADRONIZAÇÃO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO.....	21
4.2 TESTE <i>IN VIVO</i> .....	22
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DEPLEÇÃO.....	24
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>26</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é um sistema regulador, cuja principal função é a defesa do organismo. Dividido entre sistema imune adaptativo e sistema imune inato, esse sistema era inicialmente intensamente estudado por sua função de defesa do organismo, principalmente a eliminação de patógenos. Com o avanço das pesquisas, foram sendo descobertas inúmeras outras funções, como funções nas doenças autoimunes, contribuição com a progressão e regressão tumoral, homeostasia de tecidos e órgãos, reações alérgicas, regeneração e fibrose tecidual, este último sendo o foco do projeto, entre outras.

O sistema imunológico também é bastante complexo em seus componentes e, dependendo da função a ser desenvolvida, algumas células e moléculas se destacam mais que as outras. No caso do processo fibrótico e de regeneração tecidual, há uma participação essencial dos macrófagos e dos neutrófilos. O entendimento desses processos é de extrema importância para a elucidação de diversas doenças e traumas que têm como origem uma regeneração prejudicada (JULIER et al., 2017).

Os macrófagos são células do sistema imune inato e, portanto, são parte da primeira linha de defesa do organismo, fagocitando microorganismos e outros elementos invasores, como descoberto por Metchnikoff em 1882 (GORDON, 2016). No entanto, como dito anteriormente, estas células também atuam no processo de remodelamento tecidual, regeneração, fibrose e também fazem parte da regulação da homeostasia nos tecidos. Por possuírem distintas funções, a categorização destas células é algo que é debatido na comunidade científica. Atualmente, sabe-se que os macrófagos transitam entre os fenótipos que podem apresentar (MOSSER e EDWARDS, 2008), mas existe uma forma categórica de denominar os macrófagos que possuem os fenótipos mais distintos, são eles os macrófagos do tipo 1 (M1), com perfil inflamatório e os macrófagos do tipo 2 (M2), com perfil anti-inflamatório (MILLS et al., 2000).

Existem diversas formas de se estudar a função dos macrófagos na regeneração e no processo fibrótico. Atualmente, com as ferramentas genéticas disponíveis, tem se explorado o perfil genético destas células, afim de encontrar genes essenciais nesses processos e assim, depletá-los para poder entender sua influência no processo (BEYER et al., 2012). Outro meio bastante utilizado, inclusive em complementação à meios genéticos, é a depleção por meio de lipossomas encapsulados com fármacos bifosfonatos. Este método, criado e padronizado por van Rooijen na década de 80, utiliza-

se da capacidade fagocítica do macrófago e do mecanismo de ação do fármaco, no caso o clodronato, para causar apoptose nestas células (VAN ROOIJEN e VAN NJEUWMEGEN, 1984).

Os fármacos bifosfonatos são principalmente utilizados no tratamento de distúrbios ósseos, como osteoporose e câncer ósseo. Porém, devido às suas propriedades, mecanismo de ação e afinidade, pôde ser possível adaptar modelos de depleção de macrófagos (BUITING et al., 1996). O ácido zoledrônico (ZOL) é um fármaco pertencente à essa classe, mas pertence à uma subclasse distinta da do clodronato (ROGERS e HOLEN, 2011), fármaco utilizado mundialmente como modelo na pesquisa de macrófagos. No Brasil, o clodronato parou de ser fabricado, portanto, tem-se a necessidade de substituir este fármaco nas pesquisas que utilizam este método para estudar os macrófagos.

Os lipossomas encapsulados com clodronato são então ferramentas essenciais que auxiliaram em importantes descobertas. Como a importância dos macrófagos na ativação dos linfócitos T (ROOIJEN e SANDERS, 1994), o padrão de migração dessas células em lesão caudal de larvas de zebrafish, mostrando a primeira resposta realizada por M1 e a segunda por M2 (NGUYEN-CHI et al., 2017), também mais recentemente, o potencial terapêutico de depletar macrófagos associados à tumores (TAM) no tratamento de alguns tipos de câncer (ZEISBERGER et al., 2006). Estes são apenas alguns exemplos do uso do método para pesquisa, existem muitos outros campos que podem ser explorados.

O modelo animal, *Danio rerio*, conhecido também como *zebrafish*, é uma espécie com alta capacidade regenerativa de seus tecidos, com regeneração completa, ou seja, não apresenta fibrose, desde sua cauda, até órgãos mais complexos como retina, fígado e coração (LIU et al., 2018). Devido a isso, diversos estudos estão sendo realizados para elucidação de processos biológicos que envolvem regeneração, com essa espécie (SHI et al., 2015).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O entendimento do porquê da regeneração de *zebrafish* não levar a um processo de fibrose, e de quais mecanismos levam suas lesões a se regenerarem completamente é de grande interesse científico, com aplicações diversas nas áreas de pesquisa e da saúde, como tratamentos terapêuticos e elucidação de vias de processos biológicos. Por



consequente, este modelo animal foi escolhido para ser utilizado no presente trabalho. Por sua transparência, é possível rastrear os macrófagos, dentro de um modelo de regeneração tecidual e então testar a eficácia do método de depleção a ser padronizado. Como o clodronato não é mais fabricado no Brasil, decidiu-se substituí-lo pelo ZOL, por ele possuir o mesmo objetivo que o fármaco tradicionalmente utilizado para esse meio. Por isso é preciso padronizar a construção do lipossoma com o ácido zoledrônico.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo a padronização do método de depleção de macrófagos que utiliza lipossomas encapsulados com ácido zoledrônico (L-ZOL), testá-lo em *Danio rerio* adulto no modelo de regeneração caudal e também comparar os métodos de depleção existentes.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Confeccionar lipossomas encapsulados com PBS para controle e com ZOL para a depleção de macrófagos.
- Obter parâmetros do lipossoma, como tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulamento.
- Realizar teste biológico dos lipossomas em *zebrafish* adultos transgênicos com marcadores fluorescentes para macrófagos, observando a migração de macrófagos no do modelo de corte da cauda.
- Obter imagens da cauda em diferentes momentos do processo de regeneração, para observar a depleção ou não dos macrófagos.
- Comparar métodos de depleção existente através da pesquisa de artigos.

## 1.3 METODOLOGIA

Foram confeccionados lipossomas encapsulados com PBS e com ZOL. Os primeiros foram utilizados como controle nos experimentos biológicos e o segundo para a depleção dos macrófagos. Esses lipossomas foram padronizados, de forma que foram

mensurados o diâmetro, potencial zeta e a eficiência de encapsulamento, medida através da quantificação do fármaco que não foi encapsulado na solução.

Os testes biológicos foram realizados em *Danio rerio* transgênicos adultos Tg(Lys:DsRed), que possuem então macrófagos marcados em vermelho, sendo 9 animais divididos em 3 grupos. Um grupo recebeu o lipossoma com ZOL antes do corte, outro após o corte e o outro grupo recebeu o lipossoma com PBS.

O modelo de regeneração, para observar a migração de macrófagos, é o corte da nadadeira caudal de todos os animais, esta espera-se que se regenere, por conta da biologia do animal, mas que haja uma diferença nos animais injetados com L-ZOL.

Os macrófagos foram observados com o uso de um microscópio de fluorescência, onde também foram tiradas imagens, para posterior análise, em diferentes dias do processo regenerativo. As imagens foram analisadas utilizando software específico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MACRÓFAGOS

Os macrófagos foram descobertos através do famoso experimento realizado por Élie Metchnikoff, em 1882, (GORDON, 2016) em que ele perfurou uma larva de estrela-do-mar com o espinho de uma rosa e depois observou células tentando eliminá-lo. A primeira função relacionada a estas células, posteriormente denominadas de macrófagos, era então, a de defesa associada a fagocitose. No entanto, Metchnikoff estava procurando entender o processo embriogênico, como os tecidos se organizavam e não respostas sobre o funcionamento do sistema imunológico. Portanto, ao longo de suas pesquisas, além do imenso conhecimento sobre os fagócitos no processo de eliminação de patógenos, ele também acrescentou conhecimentos não relacionados diretamente com o sistema imunológico (TAUBER, 2003).

Durante o período em que Metchnikoff realizava as suas pesquisas sobre a função celular na defesa do organismo, ele enfrentou diversos entraves por parte dos imunologistas que pesquisavam as ações da parte humoral do sistema imunológico, os humoralistas, como eram chamados. Estes cientistas acreditavam que apenas o seu campo de estudo era efetivo para a eliminação de patógenos e que mesmo que as células tivessem algum papel sobre isso, era através de componentes humorais. Essas disputas fizeram com que a imunologia celular ficasse de lado por um longo período. Mas, assim que o foco dos imunologistas se voltou para a imunologia celular, na década de 1960, uma gama de conhecimentos foram adquiridos sobre os macrófagos (SILVERSTEIN, 2009).

Os mecanismos envolvidos na fagocitose, reconhecimento e eliminação de patógenos, ativação da resposta imune, entre outras funções dos macrófagos, eram bem elucidadas nos anos 90 (ADEREM e UNDERHILL, 1999). Mais recentemente vem sendo discutidas outras de suas funções, principalmente a sua polarização em M1 e M2. Essa definição dicotômica foi inicialmente baseada na resposta celular gerada através do estímulo por citocinas produzidas por células T *helper* 1 e 2, respectivamente (MILLS et al., 2000). Porém, vários outros autores questionaram essa definição, por ser limitante e muitas vezes não condizer com o que realmente ocorre, como a ativação celular de M1 poder ser resultado de citocinas típicas de M2. Ela também não leva em consideração a intensa capacidade que estas células tem de transitar entre diversos fenótipos (GORDON,

2003). Um importante trabalho sobre o amplo espectro que os macrófagos apresentam, foi realizado por Mosser e Edwards em 2008, onde são propostas algumas subclassificações para os macrófagos. No artigo, os autores mantêm a classificação dos macrófagos inflamatórios (M1), que são também chamados de classicamente ativados, mas apresentam ressalvas para os M2, também conhecidos como alternativamente ativados. Foi proposto que dentro deste último grande grupo existam outros dois grupos que diferem entre si, principalmente por secretarem diferentes citocinas, são eles os macrófagos cuja função é o reparo tecidual e macrófagos relacionadas à regulação da resposta imune e homeostasia (MOSSER e EDWARDS, 2008).

Os mecanismos que instruem os macrófagos a adotar propriedades pró- ou anti-inflamatórias, pró- ou anti-fibróticas, cicatriciais ou regeneradoras têm sido objeto de pesquisas intensas. As respostas inflamatórias que se desenvolvem após a lesão tecidual estão associadas à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  (KRONER et al.,2014).

## 2.2 FIBROSE E REGENERAÇÃO TECIDUAL

Os processos de inflamação, regeneração e fibrose são as bases para resolução de todos os processos lesivos. Quando há uma lesão, inicialmente, uma grande quantidade de células inflamatórias, como macrófagos, são recrutadas através de quimiotaxia e moléculas de adesão. Os macrófagos recrutados e residentes aumentam em número e sofrem alterações fenotípicas e funcionais devido a respostas à fatores de crescimento e citocinas depositadas no microambiente tecidual (WYNN e VANNELLA, 2016).

A fibrose pode acometer diversos órgãos, causando perda de sua organização estrutural e função. É caracterizada pela excessiva deposição de matriz extracelular (ECM) decorrente de um processo descontrolado de reparo e dano tecidual, que envolve diversas células e componentes do sistema imunológico (GIANNANDREA e PARKS, 2014). O *transforming growth factor beta 1* (TGF- $\beta$ 1), por exemplo, é produzido por macrófagos como um mecanismo de *feedback* regulatório para facilitar a resolução da resposta pró-inflamatória, desencadeando a ativação de fibroblastos e o desenvolvimento de miofibroblastos produtores de ECM, que possuem a capacidade de produção de colágenos do tipo I, III, V e VI, o que contribui para a formação de um tecido fibrótico, e

leva a uma diminuição da atividade de degradação da ECM através da expressão de inibidores de metaloproteinases (PARDALI et al., 2017).

Outros papéis que os macrófagos reparadores têm na regeneração e na fibrose, são através da promoção da proliferação celular, síntese proteica e também influência na angiogênese, por meio da produção e liberação de citocinas, como o VEGF (fator de crescimento epitelial vascular) e IL-1 (interleucina 1). Quando há uma lesão, a ação inicial dos macrófagos é de caráter inflamatório, liberando citocinas e fatores que levam a proliferação celular e desenvolvimento de endotélio vascular, passando mais tarde para um perfil anti-inflamatório, regulando atividades de componentes do sistema imunológico e auxiliando na deposição de tecido de preenchimento. Foi observado que se os macrófagos forem ativados precocemente após a lesão, a resposta fibrótica se torna muito exacerbada. Em contrapartida, a sua retirada pode resultar em uma reparação e regeneração tecidual bem menos eficientes (WYNN e VANNELLA, 2016). Contudo, os macrófagos não são as únicas células que atuam nesses processos, dificultando a análise específica da função dessas células, exclusivamente (KOH e DIPIETRO, 2011). Com o avanço da tecnologia em ferramentas genéticas, cada vez mais é possível se entender os papéis específicos dos macrófagos em cada uma dessas funções.

### 2.3 MÉTODOS DE ESTUDO DOS MACRÓFAGOS E O ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

Recentemente as pesquisas para compreender a transição dos perfis de macrófagos têm usado o mapeamento genético e metabólico destas células, diferentemente do que ocorria até a década de 90 e começo dos anos 2000, quando os macrófagos eram identificados através de marcadores fenotípicos. Técnicas como single cell RNA sequencing (scRNA-seq), Assay for Transposase Accessible Chromatin (ATAC-seq), RNA sequencing (RNA-seq), microarranjo de RNA, entre outras estão entre as mais usadas para caracterizar a atividade de expressão gênica, o que contribui para o entendimento e também para estabelecer marcadores mais confiáveis que possam auxiliar na identificação correta da célula, dando mais credibilidade aos estudos.

Outro meio de estudar a função dos macrófagos, que pode ser usado juntamente com técnicas genéticas, é a depleção dessas células. Assim como as técnicas genéticas que geram animais transgênicos sem macrófagos, por exemplo, também existem variadas técnicas de depleção envolvendo fármacos, principalmente os da classe dos bifosfonatos. Estes fármacos são análogos do pirofosfonato, com um carbono substituindo o oxigênio

central e também são derivados de fertilizantes e agente anticorrosivos, que foram então modificados para a terapia médica (ROGERS e HOLEN, 2011). Eles inibem a perda óssea, sendo então utilizado para o tratamento da osteoporose, como profilaxia para mulheres na pós menopausa, entre outras doenças relacionadas à destruição óssea. A função apoptótica dos bifosfonatos foi explorada na década de 80 pelo pesquisador van Rooijen, que estabeleceu uma técnica de depleção utilizando lipossomas encapsulados com o clodronato dissódico, ou simplesmente clodronato (ROOIJEN e SANDERS, 1994).

Esta técnica utiliza a capacidade fagocítica dos macrófagos, a similaridade desta célula com os osteoclastos, alvos terapêuticos, e a propriedade do fármaco de causar apoptose assim que internalizado pela célula. O clodronato livre não possui a capacidade de permear a bicamada lipídica da membrana e também possui uma meia vida na circulação muito pequena, mas quando dentro de lipossomas, o macrófago realiza a fagocitose e, por conta das enzimas lisossomais, o lipossoma é degradado, liberando o fármaco, que se dissolve no citoplasma (ROOIJEN e SANDERS, 1994). O clodronato é então metabolizado em adenosina 5'- $\beta,\gamma$ -diclorometileno trifosfato (AppCCl<sub>2</sub>p), um metabólito tóxico análogo ao ATP que, ao se acumular dentro da célula, causa morte por apoptose, por promover a inibição de processos celulares, como a síntese de ATP, efeitos na transdução de sinal e metabólicos (FRITH et al., 1997).

Entretanto, no Brasil, existem dois empecilhos para a utilização desta técnica. A importação de soluções preparadas contendo lipossomas encapsulados com clodronato, prontas para o uso, é extremamente burocrática e a demora somada com armazenamento inadequado, implicam na ineficácia da solução, quando aplicada e testada. Uma alternativa é então fazer o próprio lipossoma, porém o clodronato não é mais fabricado no Brasil. Por isso, foi escolhido o ácido zoledrônico como fármaco substituto.

### 2.3.1 O ácido zoledrônico

O ácido zoledrônico, é um fármaco que, assim como o clodronato, pertence à classe dos bifosfonatos, mas dentro de outra subclassificação, sendo uma boa alternativa para a confecção dos lipossomas. O ZOL também é utilizado para o tratamento da osteoporose, mas se difere do clodronato por possuir nitrogênio no radical da molécula principal, sendo então parte da subclassificação dos bifosfonatos nitrogenados, que

contempla fármacos de segunda geração (pamidronato e alendronato) e de terceira geração (ácido zoledrônico e risedronato) (ROGERS e HOLEN, 2011).

Isso faz com que seu mecanismo de ação seja outro, mas o objetivo é o mesmo: causar apoptose. O ZOL age inibindo a prenilação de proteínas através da inibição da farnesil fosfato sintase (SHMEEDA et al., 2013), uma enzima que participa da via do mavelonato, que promove então a prenilação de proteínas sinalizadoras como a Ras (ROGERS e HOLEN, 2011). Além disso, o ZOL também tem a capacidade de induzir a produção de AppCCI2p, diferentemente do clodronato, que é apenas metabolizado neste composto, não sendo capaz de produzi-lo, mas o mecanismo pelo qual o AppCCI2p causa morte celular é o mesmo que no clodronato (ROGERS e HOLEN, 2011). Portanto, o ZOL causa apoptose porque impede eventos vitais da célula, seja causando acúmulo de derivado do ATP ou impedindo a formação de proteínas sinalizadores essenciais em diversas vias metabólicas.

Em vista disso, esse fármaco foi escolhido para substituir o clodronato no método de depleção de macrófagos. Para isso, fez-se necessários estudos de padronização do L-ZOL.

## 2.4 O MODELO ANIMAL ZEBRAFISH

Esse modelo de depleção é comumente utilizado tanto em camundongos quanto em *Danio rerio*, mais conhecido como zebrafish, este último sendo o modelo animal escolhido para a realização deste projeto. Também conhecido como Paulistinha, bandeirinha, peixe-zebra ou zebrafish - como doravante referido -, é um peixe tropical que vem sendo estudado e cada vez mais utilizado, ao longo das últimas três décadas, como modelo animal de experimentação em diversas áreas da ciência. Em sua taxonomia, a espécie faz parte da infraclasse Teleostei e família Cyprinidae. É uma espécie com um tamanho pequeno, aproximadamente 3 centímetros quando adulto, de água doce, encontrada em rios e lagos, e nativa da região do Himalaia. Machos e fêmeas podem ser diferenciados anatomicamente de forma relativamente simples, onde os machos possuem um corpo mais fino, com um formato de “foguetete”, faixas pretas mais destacadas por todo o corpo - origem do nome, peixe-zebra, além de uma coloração notadamente dourada nas regiões da barriga e nadadeiras. As fêmeas, por sua vez, costumam ter a região abdominal mais saliente, principalmente quando estão em período de ovoposição, e possuem menos coloração dourada espelhada pelo corpo.

Diversos fatores contribuem para que o zebrafish seja um modelo adequado para fins de estudo. Comparado à outros modelos animais, como ratos e camundongos, ele requer baixos custos de manutenção, um cuidado muito simples, e um armazenamento muito compacto, por seu tamanho diminuto, em ambiente de laboratório. É um peixe ovíparo de fertilização externa, com o desenvolvimento embrionário muito rápido, durando de 2 a 4 dias. Os embriões e larvas da espécie são translúcidos, o que facilita a visualização de estruturas por microscopia (WIXON, 2000).

Além disso, com as ferramentas genéticas atuais, a manipulação genética de zebrafish se tornou muito popular em meios de pesquisa. Utilizando linhagens mutantes e transgênicas, com *knockin* e *knockout* de genes, bem como superexpressão genética, ablação celular, coloração de proteínas específicas, entre outras técnicas de biologia molecular, é possível a marcação e análise de diversos tipos celulares e teciduais para a observação de células e estruturas específicas, no embrião e mesmo no adulto. Ainda, numa comparação genômica, o zebrafish possui em cerca de 70% de seus genes algum ortólogo à espécie humana, o que estimula ainda mais o estudo dos processos biológicos desta espécie (Wixon, 2000).

O zebrafish foi, inicialmente, muito estudado como modelo para fins de entendimento do desenvolvimento embriogênico de vertebrados e em estudos de hematopoese (NOVOA e FIGUERAS, 2012). Mais recentemente, a espécie se mostrou extremamente promissora para outros tipos de pesquisa. Como característica específica do zebrafish, seu mecanismo de processos de regeneração tecidual é bastante eficaz. Ele é capaz de regenerar grandes porções de tecidos sem que haja processo de fibrose e decorrente perda de função, como tecidos da retina e do coração. Por isso, muitos estudos de regeneração estão sendo realizados com a espécie (GEMBERLING et al., 2013).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CONFECÇÃO DOS LIPOSSOMAS

O lipossoma é composto pelos lipídios 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) e distearoylphosphatidylcholine (DSPC). Para uma solução final de 8mL utilizou-se 8mL de clorofórmio, 16mg de DSPC, 1,488mg de DOPE e 8 mL do fármaco. Esse volume do fármaco corresponde a 400µg de ácido zoledrônico, 0,00012mmol/L.

Os lipídios foram diluídos no clorofórmio, a solução foi transferida para um balão adequado ao rotaevaporador e foi processado nele por cerca de 15 min, até não haver mais líquidos. O rotaevaporador utilizado está localizado no laboratório de biopolímeros do departamento de química da UFPR. Esse processo é realizado duas vezes, uma contendo PBS como controle, e outra com lipossoma com o fármaco.

Depois deste processo, adicionou-se o PBS e em outro balão, o ZOL. Essa solução ficou em banho maria de glicerina por 1h.

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DO LIPOSSOMA

Para determinar o tamanho do lipossoma, foi confeccionado um lipossoma sem o fármaco. O tamanho foi medido utilizando o equipamento de espalhamento de luz dinâmico (dynamic light scattering - DLS) e o potencial zeta utilizando um analisador de potencial zeta. As medições do tamanho do lipossoma foram feitas em diferentes dias durante uma semana e dos diferentes tempos de sonicação. O potencial zeta foi medido apenas uma vez, apenas do tempo 2 (T2) de sonificação. A solução preparada foi dividida em 5 partes iguais e sonicada em 5 tempos diferentes utilizando o sonicador. Todos os equipamentos encontram-se no Laboratório de Biopolímeros do Departamento de Química da UFPR.

#### 3.3 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

Para quantificar, foi realizado um método de quantificação indireta, utilizando o espectrofotômetro, onde foi quantificado o fármaco que não foi encapsulado. Foi feita uma curva padrão com diferentes concentrações do ácido zoledrônico que são equivalentes a

diferentes absorvâncias. Os testes foram feitos com uma mistura de três soluções, seus conteúdos foram descritas na tabela 1. A alteração na luz ultravioleta se dá através da reação do fármaco com o Brometo de Tetrabutílamônio (BTBA) (JIANG et al., 2004). Para quantificar foi vista a absorvância da solução do lipossoma contendo o fármaco e comparada como padrão da curva anteriormente preparada. Os testes realizados seguiram as quantidades de soluções contidas na tabela 2.

TABELA 1: SOLUÇÕES PARA DETERMINAR ABSORVÂNCIA

Solução 1: PBS 1x com pH ajustado para 7
Solução 2: PBS 1,25x com Brometo de tetrabutílamônio 7,25 mM
Solução 3: 80 % PBS 1,25X com Brometo de tetrabutílamônio 7,25 mM (¶f de PBS = 1X e de BTBA = 6 mM) mais 20% de metanol.

TABELA 2: QUANTIDADES UTILIZADAS NOS TESTES DE QUANTIFICAÇÃO

Fármaco	Solução 1	Solução3
200	400	1,2
200	400	4,8
200	-	1,6

### 3.4 MODELO ANIMAL

No trabalho foram utilizados peixes zebrafish adultos de 6 meses de idade em média, de transgênica Tg(Lys:DsRed), advindos do biotério da Universidade de São Paulo. O número amostral deste trabalho foi de 6 animais. Os animais foram mantidos no Laboratório de Toxicologia Ambiental, no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, e foram alimentados pelo menos uma vez por dia, diariamente, e os aquários higienizados com água corrente a cada 4 dias. A alimentação foi feita com ração e artêmias. A ração utilizada para as larvas é da marca Nutrafish, com diferentes floclulações denominadas AP 50, AP 100 e AP 150, de acordo com a idade das larvas. Elas foram mantidas em placas com volume de 300mL, num número máximo de 15 larvas por placa, que resulta numa densidade animal de 0,5g/L de água. Para os adultos, foi utilizada a ração Nutravit e artêmias da marca (Artêmia Salina do RN) cultivadas no próprio laboratório. Eles foram mantidos em aquários de dimensão 18 x 13.4 x 12cm, com um limite de 7 peixes por aquário, numa densidade animal de 3 peixes por litro de água. A reprodução dos adultos foi feita com o auxílio de aquário de reprodução apropriados, que contêm grades que permitem a passagem do ovo depositado pela fêmea, mas não a

passagem dos peixes adultos. Isso é necessário devido à natureza infanticida da espécie. Machos e fêmeas da mesma linhagem transgênica estão alocados no mesmo aquário, numa proporção de 1 para 1. O laboratório é climatizado à 28°C, com fotoperiodização de 14 horas luz e 10 horas escuro.

Todo o trabalho foi realizado com zelo e o cuidado necessário para manter os padrões elevados da bioética e humanidade, visto que os peixes são modelos animais e foram parte de todos os resultados alcançados neste trabalho. Os participantes do projeto são aprovados no Curso de Manipulação Animal pela UFPR. Todas as experimentações animais descritas no presente estudo foram conduzidas na Universidade Federal do Paraná e foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEUA/BIO – UFPR) sob os números de 1217 e 1218, certificando que os procedimentos utilizados estão de acordo com as Diretrizes Brasileiras de Cuidado e Uso de Animais para fins Científicos e de Ensino, estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as diretrizes internacionais para experimentação animal.

### 3.5 ABLAÇÃO DE MACRÓFAGOS

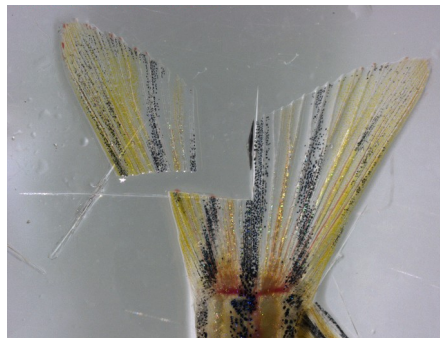
A ablação de macrófagos foi realizada injetando 6 µL do lipossoma contendo ZOL na cavidade peritoneal dos animais e o lipossoma contendo PBS no grupo controle. Os animais foram divididos em 3 grupos: o controle, um segundo grupo que foi injetado antes do corte da cauda, chamado de -1, e um terceiro grupo que recebeu a injeção um dia depois do corte, chamado de +1.

### 3.6 ANESTESIA, CIRURGIA E INJEÇÃO

Os animais foram anestesiados antes da realização do corte na cauda e antes da injeção. Para isso, foi utilizada uma solução de tricáína 0,016% despejada em uma placa de petri, onde os peixes eram colocados e ficavam até os movimentos cessarem. Esse tempo era cronometrado e era de em média 1,5 min. Após os procedimentos, os peixes eram colocados em um recipiente diferente do seu aquário, com água limpa e ambientada, para a recuperação da anestesia.

O corte na nadadeira caudal foi realizado conforme a figura 1. Os peixes, depois de anestesiados, eram colocados sob uma lupa, em uma placa de petri seca, para a realização do corte que foi feito com um bisturi.

As injeções foram realizadas intraperitoneal. Para apoio dos animais, foi feito um corte no centro de uma bucha, os animais eram colocados nesse corte, para que a injeção fosse realizada. A injeção foi feita com uma microseringa graduada da marca Hamilton.



**FIGURA 1:** Exemplo de corte a cauda e sua parte retirada em nossos estudos. FONTE: O próprio laboratório.

### 3.7 AQUISIÇÃO DE IMAGENS

As imagens foram obtidas pelo microscópio fluorescente, localizado no departamento de Patologia Básica da UFPR. Os peixes eram colocados anestesiados em uma placa própria para o microscópio e as fotos eram tiradas. Elas foram feitas no dia do corte e dos dias 1, 4, 8 e 14 após o corte. As imagens foram depois editadas no software ImageJ para sua posterior análise.

### 3.8 MEDIDAS DAS IMAGENS

As medidas foram realizadas utilizando o software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Foi medida toda a cauda amputada dos peixes, não somente a parte regenerada. Foram escolhidas imagens representativas de cada peixe de cada um dos grupos para a realização das medidas.

### 3.9 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DEPLEÇÃO

Foi feita uma pesquisa bibliográfica para comparar os métodos de depleção existentes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PADRONIZAÇÃO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

A proposta inicial era de utilizar o modelo de depleção de macrófagos com o clodronato encapsulado em um lipossoma, como é bem estabelecido pela literatura ((NGUYEN-CHI et al., 2017); (ROOIJEN e SANDERS, 1994)). Porém, este fármaco parou de ser fabricado, portanto não está mais disponível para compra, tanto na fábrica quanto em farmácias. Então, a partir de pesquisas, foi decidido substituir o clodronato pelo ácido zoledrônico. Ambos os fármacos pertencem à classe dos bifosfonatos e possuem a mesma principal função clínica: prevenir o desgaste e fraturas ósseas em pacientes com osteoporose. Devido então às suas semelhanças, foi proposto que o ZOL agiria de forma semelhante ao o clodronato, na depleção dos macrófagos. Como o ácido zoledrônico na solução do fármaco está a uma concentração de 5 mg por 100 ml e também possui uma estrutura química ligeiramente diferente do clodronato, uma nova padronização teve que ser feita.

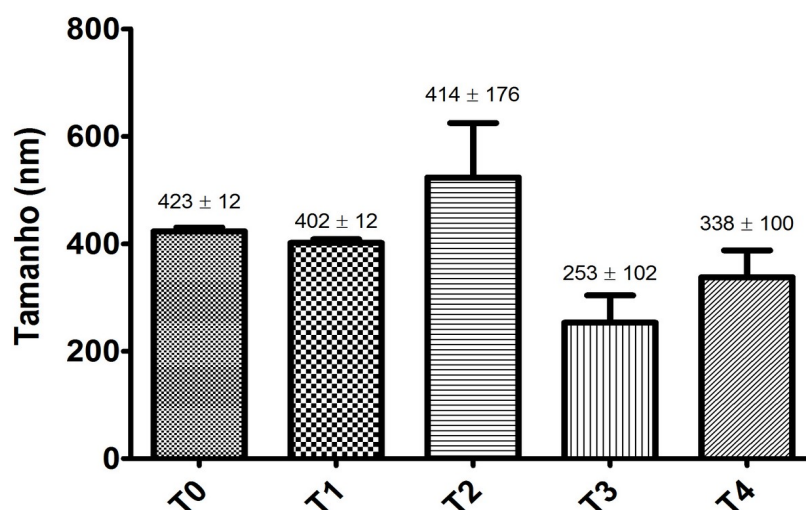
Como resultado da padronização do lipossoma com o ácido zoledrônico, foram obtidos resultados sobre o tamanho e o potencial zeta. Essas características são essenciais na interação dos macrófagos com o lipossoma.

Os tamanhos das partículas nos diferentes tempos após o processo de sonicação (em minutos) estão demonstrados na figura 2. Foi decidido utilizar o lipossoma não sonicado para simplificar o processo, visto que o tamanho ideal para um lipossoma (levando em conta a sua fagocitose pelos macrófagos), de acordo com a literatura, é de pelo menos maior que 200 nm (WU et al., 2019). Como pode ser observado no gráfico de barras demonstrado pela figura 2, no T0, sem sonicação, o tamanho obtido do lipossoma foi 423 nm, portanto maior que 200 nm. O valor do potencial zeta obtido foi de -11,5 mV (dados não apresentados), o que também está dentro dos padrões vistos na literatura (WU et al., 2019).

A quantificação do ZOL é realizada para verificar a eficiência de encapsulamento do lipossoma. Ou seja, quantificando o fármaco na solução, fora do lipossomas, é possível saber a sua concentração no interior do lipossoma e, portanto, a eficiência de encapsulamento. Ela foi realizada pelo método luminescente, utilizando o espectrofotômetro. Foi então feita uma curva padrão, correlacionando a quantidade de ZOL com a absorvância obtida no padrão. Anteriormente, com o uso do clodronato, o

método realizado utilizava como composto reagente o  $\text{FeCl}_3$  (KULJANIN et al., 2002). Vários testes foram realizados utilizando esse método, mas com o ácido zoledrônico, mas não foram obtidos resultados. O ZOL não reagia suficientemente com o  $\text{FeCl}_3$ , ou seja, não era possível observar nenhuma alteração na absorbância. Foram feitos testes com várias concentrações de fármaco e de meio ácido, o que é necessário para evitar a hidrólise do  $\text{FeCl}_3$ , porém, nenhum deles funcionou. Por isso foi testado utilizar o BTBA em vez do  $\text{FeCl}_3$  (JIANG et al., 2004). Foi realizado apenas um teste para verificar a eficiência do método. Nesse teste foi possível observar uma variação na absorbância, porém os dados não puderam ser mostrados pois não foram documentados e salvos.

A intenção era realizar os testes de quantificação com este novo método, porém não foi possível devido à pandemia.



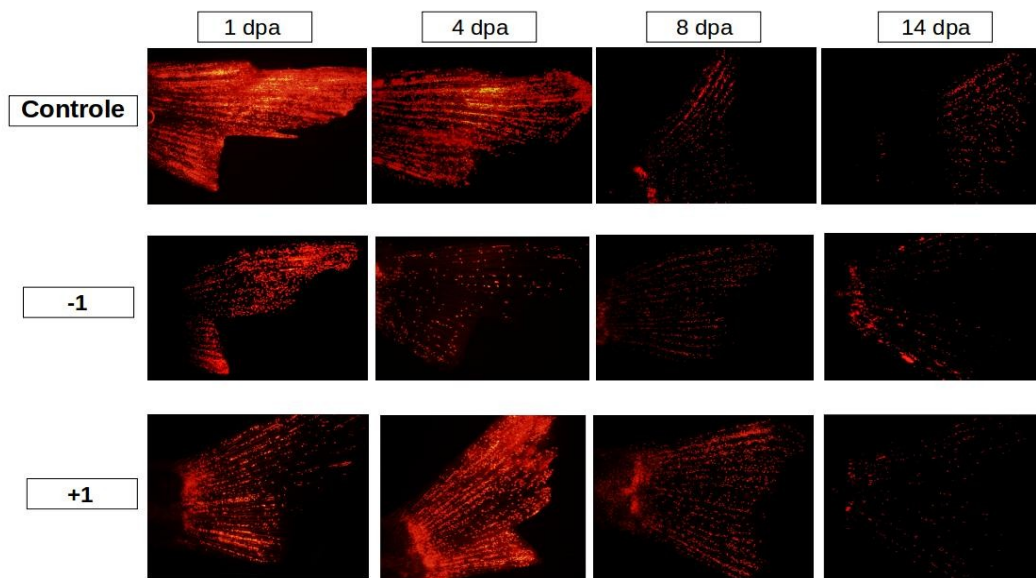
**FIGURA 2:** Diferentes tamanhos dos lipossomas após o processo de sonicação. T0 refere-se à amostra não sonicada. T1, T2, T3, e T4 referem-se a 1, 2, 3 ou 4 minutos de sonicação, respectivamente. Não houve diferença entre os grupos analisados.

## 4.2 TESTE *IN VIVO*

Para os testes do lipossoma no modelo animal, foram usados três grupos. Um grupo controle injetado com o lipossoma contendo PBS e dois grupos em que o lipossoma foi injetado em dois tempos diferentes, um dia antes do corte (-1) e um dia depois do corte (+1). Diferentes tempos de injeção da droga poderia depletar diferentes subtipos de macrófagos, sendo os do tipo M1 depletados após injeção um dia antes do corte, e os macrófagos do tipo M2 depletados com a injeção da droga um dia após a lesão na cauda

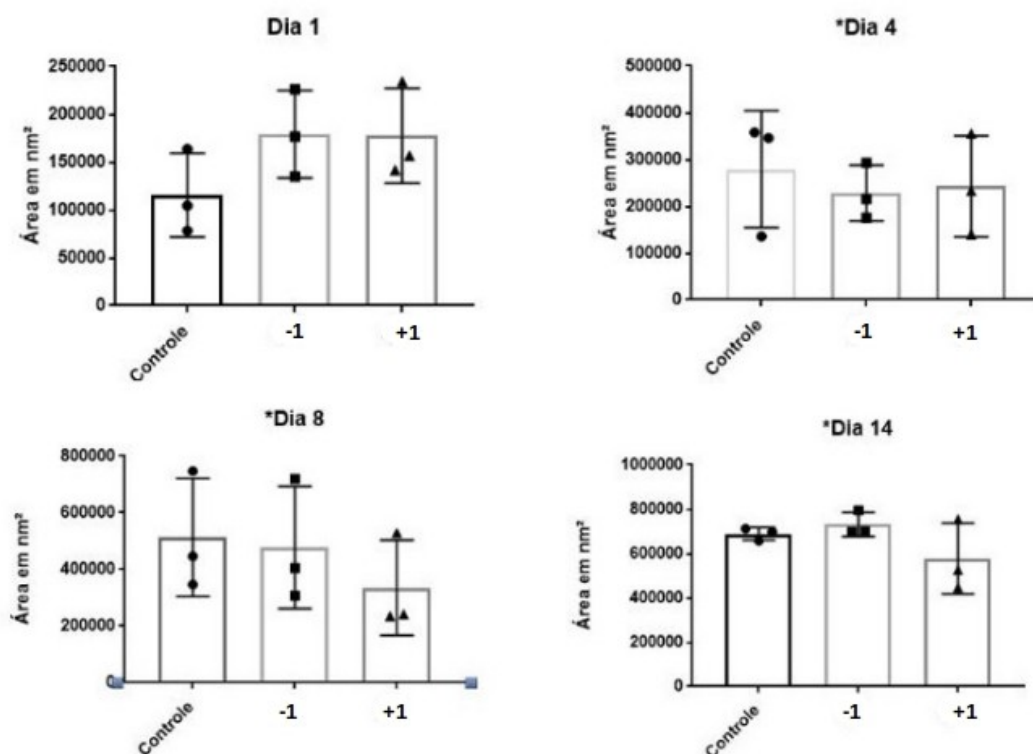
do animal (NGUYEN-CHI et al., 2017). Com isso poderíamos observar se haveriam diferenças na regeneração da cauda.

Ocorreu a perda de um animal do grupo controle, um animal do grupo -1 e dois animais do grupo +1, por erro de injeção. Isso se deu por falta de experiência dos alunos que realizaram as injeções, sendo a primeira vez dos dois em um experimento como este. Essas perdas resultaram em um n de três animais por grupo. As imagens foram obtidas nos dias 1, 4, 8 e 14 após a amputação (FIGURA 3). Nas imagens pode ser observada uma diminuição das células ao longo do tempo no grupo -1, porém, após a realização do teste de Kruskal- Walls (FIGURA 4), não foi possível afirmar que houve a depleção de macrófagos. Também foi possível observar uma diminuição na fluorescência do grupo controle, o que não é esperado, já que esses animais não receberam lipossomas contendo ZOL. É possível que essa diminuição tenha ocorrido por falha no manejo do microscópio, o que justifica a não funcionalidade aparente do nosso modelo de depleção de macrófagos. Porém, novas análises devem ser feitas, desta vez com um n amostral maior.



**FIGURA 3:** Imagens representativas de animais em diferentes dias após a amputação (dpa) demonstrando macrófagos marcados em vermelho. Foram utilizados animais Lysozima red fluorescente protein (Lys RFP) para estas análises. Na primeira linha, animais controles (sem injeção dos lipossomas), na segunda linha animais que foram injetados com os lipossomas um dia antes da amputação da cauda, e na linha de baixo, animais injetados um dia após a lesão. Os animais foram analisados em microscópios de fluorescência. n = 3 animais por grupo analisado.





**FIGURA 4:** Gráficos de quantificação da área ocupada por macrófagos (Lys RFP) marcada em vermelho na cauda dos animais controles (sem injeção dos lipossomas), animais que foram injetados com os lipossomas um dia antes da amputação da cauda (-1), e animais injetados um dia após a lesão (+1). As análises foram feitas nos dias 1, 4, 8 e 14 após a lesão da cauda dos animais. Não houve diferença entre os grupos. Os animais foram analisados em microscópios de fluorescência. n = 3 animais por grupo analisado.

### 4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DEPLEÇÃO

A maioria dos artigos que utilizam o L-ZOL como método de depleção de macrófagos, testam o potencial terapêutico que existe na depleção de TAM's com este método. Um dos primeiros autores a considerar este método desta outra forma, foi Shmeeda em 2010. Por conta da meia vida curta, ele criou diversas composições de lipossomas e testou as formas que permitiam maior permanência na circulação e também a citotoxicidade, porém o artigo não é direcionado para macrófagos, e sim para células tumorais em geral (SHMEEDA et al., 2010).

Já em 2011 sabia-se que os bifosfonatos de terceira geração eram os que causavam mais apoptose entre os bifosfonatos nitrogenados, sendo o ZOL o maior indutor entre os dois meios possíveis de indução da apoptose (ROGERS e HOLEN, 2011). Pelo clodronato e o ZOL pertencerem à subclasses diferentes, não é recomendado que seus efeitos sejam comparados. No entanto, (SABATINO et al., 2014) realizou um

estudo comparando a depleção de macrófagos utilizando todos os bifosfonatos, inclusive o clodronato, e o que mais induziu a depleção foi o ácido zoledrônico.

Um estudo utilizando o L-ZOL em um modelo de câncer direcionado para TAM's mostrou que o método causou toxicidade nos animais testados, que morreram de 5 a 7 dias após a injeção. Os autores acreditam ser por conta de um aumento na expressão de TNF $\alpha$  e citocinas após a injeção do L-ZOL (SHMEEDA et al., 2013). No entanto, os TAM's possuem um perfil de expressão de citocinas diferente do perfil dos macrófagos vistos na regeneração caudal do *zebrafish*, portanto não é certa uma relação dessa toxicidade com o modelo testado, mas é um importante conhecimento para futuros experimentos.

O L-ZOL também foi demonstrado ter uma maior eficácia em inibir M2 (WU et al., 2020), assim como o clodronato (GRIESMANN et al., 2017). No entanto, somente o L-ZOL foi capaz de induzir mudanças na polarização dos macrófagos tumorais, percebido através do aumento da expressão de iNOS, o que não ocorre com o clodronato (ROGERS e HOLEN, 2011)

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como o n amostral foi pequeno e a aquisição das imagens não foi satisfatória, seria realizado um novo experimento para confirmar ou contestar os dados obtidos. Nos próximos testes, seriam utilizadas larvas de zebrafish com 3 semanas de vida, transgênicas Tg(mpeg:mCherry/tnfa:GFP), onde os neutrófilos são duplamente marcados e os macrófagos marcados em vermelho. O modelo de injeção e corte seria o mesmo, mas seria utilizado um microinjetor, visto que seriam utilizados animais com tamanho reduzido. Seria adicionado um grupo controle sem injeção e com o corte e o n seria de 6 por grupo. Por conta da pandemia do novo coronavírus, estes experimentos não puderam ser realizados.

Com este estudo, foi possível encontrar um caminho para posteriores padronização e entendimento da funcionalidade do ácido zoledrônico encapsulado como um método de estudo dos macrófagos, em substituição ao clodronato, que já não é fabricado pela indústria farmacêutica.

Como os estudos existentes com L-ZOL são em sua maioria realizados tendo como alvo os TAM's, uma comparação do ácido zoledrônico com o clodronato, no modelo testado, é imprecisa. Porém, podem ser tiradas algumas conclusões, como que o ZOL induz com mais eficiência a apoptose do que o clodronato e, conseqüentemente, pode ser mais tóxico.

## REFERÊNCIAS

- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 593–623, 1999.
- BEYER, M.; MALLMANN, M. R.; XUE, J.; et al. High-Resolution Transcriptome of Human Macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.
- BUITING, A. M. J.; ZHOU, F.; BAKKER, J. A. J.; et al. Biodistribution of clodronate and liposomes used in the liposome mediated macrophage “suicide” approach. **Journal of Immunological Methods**, v. 192, n. 1–2, p. 55–62, 1996.
- FRITH, J. C.; MÖNKKÖNEN, J.; BLACKBURN, G. M.; RUSSELL, R. G. G.; ROGERS, M. J. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-( $\beta,\gamma$ -dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 9, p. 1358–1367, 1997.
- GEMBERLING, M.; BAILEY, T. J.; HYDE, D. R.; POSS, K. D. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 11, p. 611–620, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2013.07.003>>. .
- GIANNANDREA, M.; PARKS, W. C. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 7, n. 2, p. 193–203, 2014.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, 2003.
- GORDON, S. Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. **Journal of Innate Immunity**, v. 8, n. 3, p. 223–227, 2016.
- GRIESMANN, H.; DREXEL, C.; MILOSEVIC, N.; et al. Pharmacological macrophage inhibition decreases metastasis formation in a genetic model of pancreatic cancer. **Gut**, v. 66, n. 7, p. 1278–1285, 2017.
- JIANG, Y.; ZHANG, X. Q.; XU, Z. R. Analysis of zoledronic acid and its related substances by ion-pair RP-LC. **Chromatographia**, v. 60, n. 7–8, p. 405–409, 2004.
- JULIER, Z.; PARK, A. J.; BRIQUEZ, P. S.; MARTINO, M. M. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 13–28, 2017. Acta Materialia Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.056>>. .
- KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 13, n. July 2011, p. 1–12, 2011.
- KRONER, A.; GREENHALGH, A. D.; ZARRUK, J. G.; et al. TNF and Increased Intracellular Iron Alter Macrophage Polarization to a Detrimental M1 Phenotype in the Injured Spinal Cord. **Neuron**, v. 83, n. 5, p. 1098–1116, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.027>>. .

KULJANIN, J.; JANKOVI, I.; NEDELJKOVI, J.; PRSTOJEVI, D.; MARINKOVI, V. Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations via complex formation with Fe(III) ions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 6, p. 1215–1220, 2002.

LIU, F. Y.; HSU, T. C.; CHOONG, P.; et al. Uncovering the regeneration strategies of zebrafish organs: A comprehensive systems biology study on heart, cerebellum, fin, and retina regeneration. **BMC Systems Biology**, v. 12, n. Suppl 2, 2018.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 2000.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri2448>>. .

NGUYEN-CHI, M.; LAPLACE-BUILHÉ, B.; TRAVNICKOVA, J.; et al. TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. **Cell death & disease**, v. 8, n. 8, p. e2979, 2017a. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.374>>. .

NGUYEN-CHI, M.; LAPLACE-BUILHÉ, B.; TRAVNICKOVA, J.; et al. TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. **Cell death & disease**, v. 8, n. 8, p. e2979, 2017b. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.374>>. .

NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Zebra fish Model for studying Innate Immunity. , v. 946, p. 253–275, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-0106-3>>. .

PARDALI, E.; SANCHEZ-DUFFHUES, G.; GOMEZ-PUERTO, M. C.; TEN DIJKE, P. TGF- $\beta$ -induced endothelial-mesenchymal transition in fibrotic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, 2017.

ROGERS, T. L.; HOLEN, I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2011.

VAN ROOIJEN, N.; VAN NIEUWMEGEN, R. Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate - An enzyme-histochemical study. **Cell and Tissue Research**, v. 238, n. 2, p. 355–358, 1984.

ROOIJEN, N. VAN; SANDERS, A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. **Journal of Immunological Methods**, v. 174, n. 1–2, p. 83–93, 1994.

SABATINO, R.; ANTONELLI, A.; BATTISTELLI, S.; et al. Macrophage depletion by free bisphosphonates and Zoledronate-loaded red blood cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2014.

SHI, W. C.; FANG, Z. B.; LI, L.; LUO, L. F. Using zebrafish as the model organism to understand organ regeneration. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 4, p. 343–351, 2015.

SHMEEDA, H.; AMITAY, Y.; GORIN, J.; et al. Delivery of zoledronic acid encapsulated in folate-targeted liposome results in potent in vitro cytotoxic activity on tumor cells. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 1, p. 76–83, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.028>>. .

SHMEEDA, H.; AMITAY, Y.; TZEMACH, D.; GORIN, J.; GABIZON, A. Liposome encapsulation of zoledronic acid results in major changes in tissue distribution and increase in toxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 3, p. 265–275, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.02.003>>. .

SILVERSTEIN, A. M. **A History of Immunology**. 2009.

TAUBER, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 11, p. 897–901, 2003.

WIXON, J. (Ref) Wixon2000. **Yeast**, v. 17, p. 225–231, 2000.

WU, S.; LIN, X.; CUI, X. Effect of Liposome-Encapsulated Zoledronic Acid on Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma May Depend on the Ratio Between M1 and M2 Polarized Macrophages. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 170, n. 1, p. 69–74, 2020.

WU, Z.; KOH, B.; LAWRENCE, L. M.; et al. Liposome-Mediated Drug Delivery in Larval Zebrafish to Manipulate Macrophage Function. , v. 16, n. 2, p. 171–181, 2019.

WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450–462, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>>. .

ZEISBERGER, S. M.; ODERMATT, B.; MARTY, C.; et al. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: A new and highly effective antiangiogenic therapy approach. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 3, p. 272–281, 2006.