

Estudo de internalização e viabilidade de nanopartículas multimodal para marcação de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano

Study of internalization and viability of multimodal nanoparticles for labeling of human umbilical cord mesenchymal stem cells

Liza Aya Mabuchi Miyaki¹, Tatiana Tais Sibov², Lorena Favaro Pavon²,
Javier Bustamante Mamani², Lionel Fernel Gamarra²

RESUMO

Objetivo: Analisar a estabilidade das nanopartículas magnéticas multimodais-Rhodamine B em meios de cultura para marcação celular e, conseqüentemente, estabelecer o estudo de detecção intracelular de nanopartículas magnéticas multimodais-Rhodamine B nas células marcadas, avaliando a viabilidade celular nas concentrações de 10 μ g Fe/mL e 100 μ g Fe/mL. **Métodos:** Foram realizados: análise da estabilidade das nanopartículas magnéticas multimodais-Rhodamine B em meios de cultura diferentes; marcação das células-tronco mesenquimais com nanopartículas magnéticas multimodais-Rhodamine B; detecção intracelular das nanopartículas magnéticas multimodais-Rhodamine B nas células-tronco mesenquimais e avaliação da viabilidade das células marcadas por meio da cinética de proliferação. **Resultados:** A análise de estabilidade determinou que as nanopartículas magnéticas multimodais-Rhodamine B presentes nos meios de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's-Low Glucose e RPMI Medium 1640* apresentaram boa estabilidade. A marcação das células-tronco mesenquimais com nanopartículas magnéticas multimodais-Rhodamine B descreveu localização intracelular das nanopartículas, as quais se mostraram como grânulos azulados colocalizados nos grumos fluorescentes, caracterizando, assim, as propriedades magnéticas e fluorescentes das nanopartículas magnéticas multimodais-Rhodamine B. **Conclusão:** A estabilidade das nanopartículas magnéticas multimodais-Rhodamine B, presentes nos meios de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's-Low Glucose e RPMI Medium 1640*, garantiu a eficiente marcação intracelular das células-tronco mesenquimais. Esse tipo de marcação não afetou a viabilidade das células-tronco mesenquimais marcadas, já que as mesmas continuaram proliferando ao longo de 5 dias.

Descritores: Células-tronco mesenquimais; Nanopartículas; Rodaminas; Cordão umbilical

ABSTRACT

Objective: To analyze multimodal magnetic nanoparticles-Rhodamine B in culture media for cell labeling, and to establish a study of multimodal magnetic nanoparticles-Rhodamine B detection at labeled cells evaluating their viability at concentrations of 10 μ g Fe/mL and 100 μ g Fe/mL. **Methods:** We performed the analysis of stability of multimodal magnetic nanoparticles-Rhodamine B in different culture media; the mesenchymal stem cells labeling with multimodal magnetic nanoparticles-Rhodamine B; the intracellular detection of multimodal magnetic nanoparticles-Rhodamine B in mesenchymal stem cells, and assessment of the viability of labeled cells by kinetic proliferation. **Results:** The stability analysis showed that multimodal magnetic nanoparticles-Rhodamine B had good stability in cultured Dulbecco's Modified Eagle's-Low Glucose medium and RPMI 1640 medium. The mesenchymal stem cell with multimodal magnetic nanoparticles-Rhodamine B described location of intracellular nanoparticles, which were shown as blue granules co-localized in fluorescent clusters, thus characterizing magnetic and fluorescent properties of multimodal magnetic nanoparticles-Rhodamine B. **Conclusion:** The stability of multimodal magnetic nanoparticles-Rhodamine B found in cultured Dulbecco's Modified Eagle's-Low Glucose medium and RPMI 1640 medium assured intracellular mesenchymal stem cells labeling. This cell labeling did not affect viability of labeled mesenchymal stem cells since they continued to proliferate for five days.

Trabalho realizado no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

¹ Instituto do Cérebro – InCe, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil; Faculdade de Enfermagem do Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

² Instituto do Cérebro – InCe, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Tatiana Tais Sibov – Instituto do Cérebro – InCe, Hospital Israelita Albert Einstein – Avenida Albert Einstein, 627/701, Piso Chinuch, 2º Subsolo – Morumbi – CEP: 05651-901 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: (11) 2151-3727 – E-mail: tatianats@einstein.br

Data de submissão: 1/3/2012 – Data de aceite: 13/6/2012

Conflitos de interesse: não há.

Keywords: Mesenchymal stem cells; Nanoparticles; Rhodamines; Umbilical cord

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células multipotentes que apresentam capacidade de originar outros tipos celulares de forma limitada, como, por exemplo, adipócitos, osteoblastos e condrócitos⁽¹⁻⁴⁾. Além disso, a importância da utilização dessas células em terapia celular se deve ao fato das CTM apresentarem outras características importantes como, por exemplo, facilidade no isolamento, expansão, manipulação e propriedades imunossupressoras⁽⁴⁻⁸⁾.

As CTM, quando comparadas a outros tipos de células-tronco⁽⁹⁾, apresentam algumas vantagens clínicas como, por exemplo, serem prontamente adquiridas de pacientes, facilmente expandidas *ex vivo*, bem como autotransfundidas sem risco de rejeição imunológica e livre de preocupações éticas^(10,11).

A medula óssea (MO) é a principal e mais estudada fonte de obtenção de CTM utilizada em aplicações clínicas e experimentais. No entanto, estudos mostram que as CTM de parede de cordão umbilical humano (PCUh) apresentam características morfológicas, imunofenotípicas e capacidade de diferenciação em células de linhagens mesodérmicas, similares as CTM de MO^(2,4,12-14).

Dessa forma, as CTM representam uma importante e promissora ferramenta terapêutica no tratamento de doenças neuro-cardiovasculares, neurodegenerativas, hematológicas e imunodeficiências, para as quais ainda não há tratamento específico ou efetivo disponível⁽¹⁵⁻¹⁸⁾. Entretanto, o acompanhamento do comportamento dessas células *in vivo* ainda é um dos obstáculos para sua utilização em terapia celular. A possibilidade de estabelecer uma marcação eficiente dessas células com nanopartículas de óxido de ferro (NOF), sem a perda de viabilidade, poderia disponibilizar métodos não invasivos para o acompanhamento dessas células *in vivo*. Assim, a inovação nanobiotecnológica promove o estudo de novas ferramentas para o avanço biomédico.

Materiais nanoestruturados são sistemas constituídos de partículas de dimensões nanométricas. O interesse nanobiotecnológico por esses materiais reside no fato de apresentarem propriedades biofísicas especiais, quando comparadas aos mesmos materiais constituídos por partículas grosseiras⁽¹⁹⁾. Por meio do controle das condições de síntese, podem-se obter suspensões de nanopartículas monodispersas utilizadas na preparação de suspensões coloidais biocompatíveis. Nesse contexto, as NOF têm despontado como um recurso nanobiotecno-

lógico inovador no processo de marcação de células e seu posterior estudo por imagem molecular^(20,21).

Um dos processos utilizados atualmente para acompanhar a migração ou *homing* das CTM é a marcação dessas células com NOF⁽²⁰⁾. Esse processo permite acompanhar a distribuição e o destino das CTM, bem como maximizar seu benefício terapêutico⁽²⁰⁻²²⁾.

Alguns estudos^(23,24) demonstraram a utilização de nanopartículas magnéticas multimodais (NPMM), ou seja, nanopartículas que apresentam propriedades magnéticas e fluorescentes (Rhodamine B – RhB, BioPAL, Worcester, MA, USA) podendo ser demonstradas em imagem por ressonância magnética (IRM) e microscopia de fluorescência.

As NPMM possuem característica fluorescente devido ao fato de serem conjugadas com elementos fluorescentes como, por exemplo, a NOF conjugada com RhB (dois fluoróforos por partícula), na qual o comprimento de onda de excitação da RhB é 555nm e o comprimento de onda de emissão é 565 a 620nm. Essa NPMM (RhB) tem um núcleo magnético de 8nm, com um tamanho hidrodinâmico de 35nm, potencial zeta de -31mV e concentração de 2mg de Fe/mL (BioPAL, Worcester, MA, USA).

Assim, neste estudo, estabelecemos a detecção intracelular de NPMM (RhB), avaliando a viabilidade celular dessa marcação nas CTM de PCUh em diferentes concentrações das nanopartículas (10µg Fe/mL e 100µg Fe/mL) e sua estabilidade em meios de cultura diferentes.

OBJETIVO

O presente trabalho visa analisar a estabilidade das NPMM (RhB) em meios de cultura para marcação celular e, conseqüentemente, estabelecer o estudo de detecção intracelular de NPMM (RhB) nas células marcadas, avaliando a viabilidade celular nas concentrações de 10µg Fe/mL e 100µg Fe/mL.

MÉTODOS

Coleta e processamento das amostras de cordão umbilical

As amostras de PCUh foram coletadas após consentimento informado da mãe (doadora) de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE) – SGPP: 683-09; CEP: 1059. Essas amostras foram coletadas por meio da secção do cordão umbilical no momento do parto e conservadas em *Phosphate Buffered Saline* 1x (PBS, Sigma-Aldrich) com 100mM de anti-

coagulante EDTA e, logo depois, processadas em até 6 horas após a coleta. Após duas lavagens com PBS 1x (Sigma-Aldrich) da veia do cordão umbilical, as CTM foram retiradas da amostra por digestão enzimática utilizando colagenase tipo I (Sigma-Aldrich) por 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, a enzima foi inativada com Soro Fetal Bovino (Gibco®, Invitrogen Corporation), e as células isoladas foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's-low glucose* (DMEM-LG, Gibco®, Invitrogen Corporation).

Cultura das CTM de PCUh

As CTM isoladas foram plaqueadas em placas de 25cm² em uma densidade celular de 10⁷ células/cm² contendo meio DMEM-LG (Gibco®, Invitrogen Corporation) suplementado com 200mM de L-Glutamina, Antibiótico/Antimicótico 10.000U/mL de penicilina sódica, 10.000µg/mL de sulfato de estreptomicina, 25µg/mL de anfotericina B (Gibco®, Invitrogen Corporation) e 10% Soro Fetal Bovino (Gibco®, Invitrogen Corporation). As culturas de CTM foram mantidas em incubadora (Thermo Fisher Scientific Inc 3110, Waltham, MA) a 37°C em 5% de CO₂ e as células não aderentes foram removidas da placa de cultura após 24 horas. Os experimentos foram realizados na quarta passagem celular, com aproximadamente 80% de confluência.

Caracterização imunofenotípica das CTM de PCUh

As CTM isoladas foram caracterizadas por imunofenotipagem realizada por citometria de fluxo. A técnica de marcação utilizada estava de acordo com as instruções técnicas do fabricante. As células foram marcadas com os anticorpos monoclonais e incubadas no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente; após a incubação, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 1%. Os anticorpos monoclonais utilizados foram: CD14 FITC clone:M5E2 (BD Pharmingen, San Diego, CA); CD29 PE clone:MAR4 (BD Pharmingen, San Diego, CA); CD31 PE clone:WM59 (BD Pharmingen, San Diego, CA); CD45 PerCP CY5.5 clone:2D1 (BD Biosciences, San Jose, CA); CD73 PE clone:AD2 (BD Pharmingen, San Diego, CA); CD105 PE clone:43A3 (Biolegend, San Diego, CA); CD90 APC clone:5E10 (BD Pharmingen, San Diego, CA); HLA-A,B e C FITC clone:G46-2.6 (BD Pharmingen, San Diego, CA); CD106 FITC clone:51-10C9 (BD Pharmingen, San Diego, CA); CD133 APC clone:293C3 (Myltenyi Biotec, Germany); e os isotipos controles relacionados. A aquisição dos dados foi realizada no equipamento de citometria de fluxo FACSARIA (BD Biosciences, San Jose, CA) e os resultados analisados com o *software*

FACSDIVA (BD Biosciences) e FLOWJO (Tree Star, Ashland, OR).

Análise da estabilidade das NPMM (RhB) em meios de cultura

A análise da estabilidade de NPMM foi realizada em meios de cultura DMEM-LG (Gibco®, Invitrogen Corporation) e RPMI Medium 1640 (Gibco®, Invitrogen Corporation), com o intuito de avaliar o meio adequado para o estudo da marcação com NPMM (RhB) nas CTM, dado que, na literatura, esses meios de cultura são os mais utilizados no processo de marcação destas células⁽²⁵⁻²⁸⁾. O estudo da estabilidade foi realizado mediante a técnica de *Dynamic Light Scattering* (DLS), com medidas temporais da distribuição do tamanho hidrodinâmico das NPMM (RhB) utilizando um Malvern Zetasizer NanoS (Malvern, UK). A distribuição do tamanho hidrodinâmico ponderada em número foi obtida em um ângulo de 173° em modo manual, com número de médias de 20 e tempo de medida de 5 segundos por média. As medidas foram realizadas em modo de posição fixa. As medidas foram realizadas na temperatura de 37°C, com tempo de equilíbrio de 60 segundos. Utilizaram-se 2mL de cada meio de cultura em uma concentração de 10 e 100µg Fe/mL e 2mL de água Milli-Q com concentração de 100µg Fe/mL como amostra controle. As medidas do tamanho hidrodinâmico foram realizadas em diferentes tempos em um intervalo de 0 até 20 horas. A análise da distribuição do tamanho foi determinada mediante o ajuste da função de correlação das intensidades da luz espalhada com o algoritmo CONTIN.

Marcação de CTM com as NPMM (RhB)

Aproximadamente 1x10⁵ CTM foram plaqueadas em placas de 24 wells e mantidas *overnight* em incubadora (Thermo Fisher Scientific Inc 3110, Waltham, MA) a 37°C em 5% de CO₂, em uma suspensão de NPMM (RhB) nas concentrações de 10µg Fe/mL e 100µg Fe/mL em condição de triplicata. Após o período de incubação, a solução NPMM (RhB)-meio de cultura foi retirada por aspiração e as CTM foram lavadas duas vezes com PBS (1x) para remover as NPMM (RhB) extracelulares. As células controle foram processadas só com meio de cultura, mas nas mesmas condições que as células marcadas.

Detecção intracelular das NPMM (RhB)

As CTM marcadas foram lavadas com PBS 1x (Sigma-Aldrich) para a retirada do excesso de partículas e, em

seguida, fixadas com paraformaldeído 4%. Em seguida, foi realizado o ensaio citoquímico de azul da Prússia 5%, solução de 5% ferrocianeto de potássio (Sigma-Aldrich)/solução de 5% de HCl 37% (Merck, Germany) e fucsina básica (Sigma-Aldrich), para verificar a internalização das partículas nas CTM. A análise foi realizada no microscópio de fluorescência (IX51 Olympus), primeiramente por meio de microscopia comum e, em paralelo, utilizando o filtro Rhodamine (530nm e 550nm).

Cinética de proliferação

Aproximadamente 5×10^4 CTM foram incubadas com NPMM (RhB), nas concentrações de $10 \mu\text{g Fe/mL}$ e $100 \mu\text{g Fe/mL}$ e em triplicata, em seguida lavadas duas vezes com PBS 1x (Sigma-Aldrich) e mantidas em incubadora (Thermo Fisher Scientific Inc 3110, Waltham, MA) a 37°C em 5% de CO_2 . Ao longo de 5 dias, a triplicata de cada uma das concentrações foi lavada com PBS (1x) (Sigma-Aldrich) e as CTM marcadas foram retiradas por digestão enzimática por meio da utilização de Trypsin 0,25% EDTA (Gibco®, Invitrogen Corporation) por 3 minutos a 37°C em 5% de CO_2 . A inativação enzimática foi realizada por meio do meio DMEM-LG 10%, Soro Fetal Bovino (Gibco®, Invitrogen Corporation). As células ressuscitadas foram quantificadas por meio da câmara de Neubauer. O número de células de cada ponto da curva foi representado pela média do número de células das triplicatas.

RESULTADOS

Caracterização morfológica e imunofenotípica das CTM de PCUh

As CTM de PCUh apresentaram morfologia fibroblástica e atingiram a confluência entre 80 e 90% em 7 dias em cultura (Figura 1). O perfil imunofenotípico das CTM de PCUh isoladas já se encontra publicado em outros artigos do grupo^(2,4).

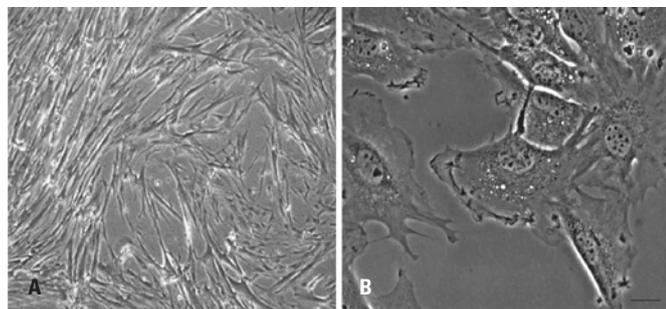


Figura 1. Células-tronco mesenquimais isoladas de parede de cordão umbilical humano. (A) Cultura de células-tronco mesenquimais com aproximadamente 90% de confluência, 200X; (B) Cultura de células-tronco mesenquimais com aproximadamente 80% de confluência, 600X

Estabilidade NPMM (RhB) nos meios de cultura DMEM-LG e RPMI

As variações no tamanho hidrodinâmico ao longo do tempo (resultado da aglomeração de NPMM dispersas em meio líquido) determinam a instabilidade da NPMM e conseqüentemente diminuem a eficiência na captação de NPMM (RhB) pelas CTM. Assim, foram realizadas medidas de DLS para determinar a variabilidade do tamanho hidrodinâmico das NPMM (RhB) dispersas em meio de cultura DMEM e RPMI nas concentrações de 10 e $100 \mu\text{g/mL}$ e da amostra controle nos diferentes tempos, como é mostrado na figura 2.

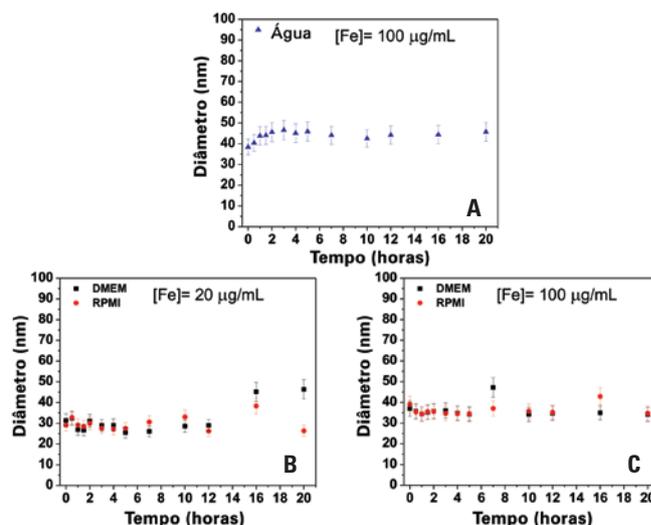


Figura 2. Medidas da variabilidade do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas magnéticas multimodais (Rhodamine B) no tempo (0 até 20 horas). (A) Nanopartículas magnéticas multimodais (Rhodamine B) suspensas em água na concentração de $100 \mu\text{g Fe/mL}$ (amostra controle). Nanopartículas magnéticas multimodais (Rhodamine B) dispersas em meios de cultura DMEM e RPMI nas concentrações de (B) $10 \mu\text{g Fe/mL}$ e (C) $100 \mu\text{g Fe/mL}$

Deteção intracelular das NPMM (RhB) em CTM

A avaliação da distribuição intracelular das nanopartículas com propriedades magnéticas e fluorescentes, utilizadas para a marcação das CTM, foi realizada por meio dos ensaios citoquímicos de azul de Prússia e fucsina básica, por meio de microscopia óptica comum e de fluorescência.

Nos ensaios citoquímicos, a internalização das NPMM (RhB) foi observada como granulações azuladas de localização intracelular (Figuras 3B a 3D, 3H a 3J). Esse processo não foi observado no controle negativo, ou seja, CTM não marcadas (Figuras 3A e 3G).

A deteção intracelular das NPMM (RhB) também pôde ser observada nas marcações utilizando o recurso da microscopia de fluorescência (Figuras 3E, 3F, 3L a 3N), na qual as partículas apresentaram-se como pequenos grupos fluorescentes de colocalização com os

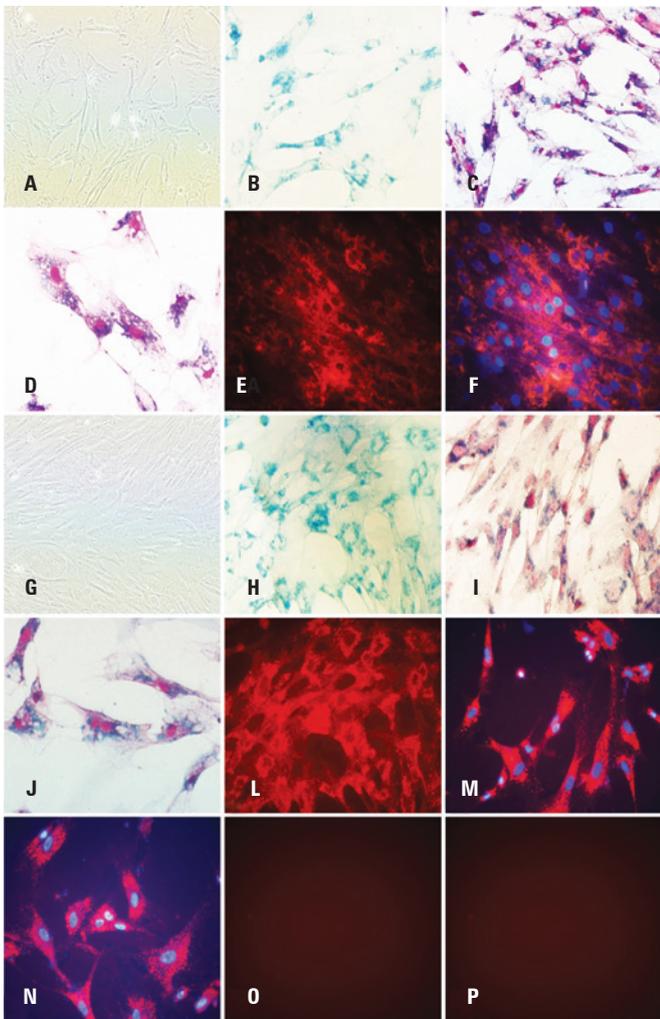


Figura 3. Marcação das células-tronco mesenquimais com nanopartículas magnéticas multimodais (Rhodamine B). (B a F) Suspensão de nanopartículas magnéticas multimodais (Rhodamine B) na concentração de $10\mu\text{g Fe/mL}$. (H a N) Suspensão de nanopartículas magnéticas multimodais (Rhodamine B) na concentração de $100\mu\text{g Fe/mL}$. (A e G) Controle: cultura de células-tronco mesenquimais sem distribuição intracelular de nanopartículas magnéticas multimodais (Rhodamine B), aumento: 100X. (B e H) Citoquímica: azul da Prússia, aumento: 100X. (C, D, I e J) Citoquímica: fucsina básica. (C e I) Aumento: 100X. (D e J) Aumento: 400X. (E e L) Microscopia de fluorescência revelando nanopartículas magnéticas multimodais (Rhodamine B), aumento: 200X. (F, M e N) Microscopia de fluorescência revelando nanopartículas magnéticas multimodais (Rhodamine B) e o núcleo das células-tronco mesenquimais (DAPI); (F) Aumento: 200X. (M e N) Aumento: 400X. (O e P) Controle das reações de microscopia de fluorescência

grânulos azuis revelados pelos testes citoquímicos (Figuras 3H e 3L).

Viabilidade das CTM marcadas

A viabilidade das CTM marcadas com NPMM (RhB) foi avaliada por meio de ensaio de cinética de proliferação celular (Figura 4). A capacidade proliferativa das CTM marcadas revelou que não houve alteração significativa entre os dias que compreenderam o plaqueamento ($5,0 \times 10^4$ células/well), marcação com NPMM

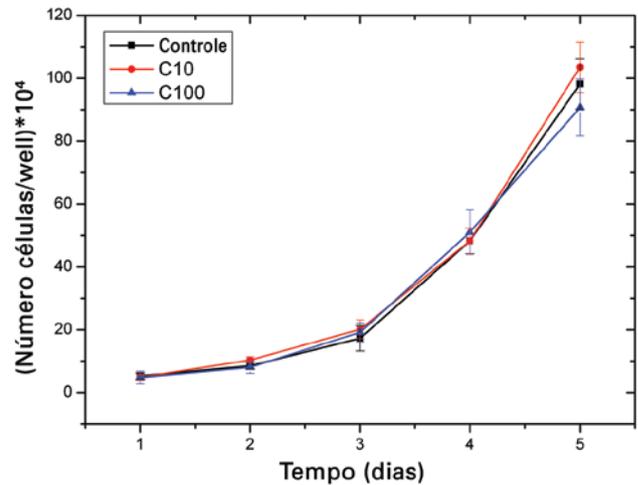


Figura 4. Cinética de proliferação das células-tronco mesenquimais marcadas com nanopartículas magnéticas multimodais (Rhodamine B). Curva de proliferação das células marcadas nas concentrações de C10= $10\mu\text{g Fe/mL}$ e C100= $100\mu\text{g Fe/mL}$ em condição de triplicata

(RhB) ($4,93 \times 10^4$ células/well) e o primeiro dia ($5,0 \times 10^4$ células/well), estabelecido na curva nas concentrações C10 ($4,92 \times 10^4$ células/well), C100 ($4,80 \times 10^4$ células/well) e controle ($5,32 \times 10^4$ células/well).

DISCUSSÃO

As CTM também, definidas como células progenitoras multipotentes, apresentam capacidade de se diferenciarem em algumas linhagens de origem mesodérmica, tais como células adipocíticas, osteoblásticas e condrocíticas⁽²⁹⁻³¹⁾. Além disso, alguns dados da literatura sugerem que as CTM podem originar outros tipos celulares como, por exemplo, cardiomiócitos⁽³²⁻³⁴⁾, células endoteliais⁽³⁵⁾ e, até mesmo, células de origem não mesodérmica, como hepatócitos⁽³⁶⁾, células neurais⁽³⁷⁾ e células epiteliais^(38,39). Com isso, o potencial uso das CTM de PCUh em terapia celular tem gerado um importante interesse em uma ampla variedade de disciplinas biomédicas, incluindo campos emergentes aplicáveis à nanobiotecnologia, estreitando novos recursos para o estudo de imagem molecular *in vitro* e *in vivo*.

Dessa forma, este estudo avaliou a estabilidade das NPMM (RhB) em dois diferentes meios de cultura para a marcação das CTM, já que, na literatura, pode ser encontrada a utilização de diversos meios de cultura. Assim, neste estudo, demonstramos o melhor meio para ser utilizado. Para tal, foi realizado um estudo de detecção intracelular das CTM marcadas com NPMM (RhB) e a viabilidade dessa marcação por meio de uma cinética de proliferação celular.

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade das NPMM (RhB) nos meios de cultura DMEM-LG e

RPMI revelaram que as nanopartículas são estáveis nos dois meios de cultura, sendo que o meio DMEM-LG foi o escolhido para o presente estudo, por ser o mais utilizado segundo referências da literatura como o meio mais utilizado na cultura de CTM^(25,26,40,41).

A estabilidade das NPMM (RhB) em meio líquido foi analisada mediante gráficos de diâmetro hidrodinâmico das partículas em função do tempo mostrados na figura 2. Na figura 2A, apresentamos a estabilidade de NPMM (RhB) suspensas em água, em uma concentração C100=100µg Fe/mL, denominada amostra controle. Nesta figura, observa-se que, considerando a margem de incerteza, o diâmetro hidrodinâmico permanece constante no tempo, excluindo a formação de agregados de NPMM (RhB). A medida foi realizada com o intuito de determinar experimentalmente o diâmetro hidrodinâmico e a dispersibilidade das NPMM (RhB). A estabilidade das NPMM (RhB) em água depende da dimensão da partícula para evitar a precipitação devido às forças gravitacionais e da química de troca na superfície da partícula, que resulta no aumento das repulsões estéricas e de Coulomb. A estabilidade decorre de um equilíbrio muito delicado das interações atrativas e repulsivas entre as NPMM (RhB). A interação dipolar magnética e a de Van der Waals são atrativas, mas as interações repulsivas mais importantes são a estérica e a eletrostática. O equilíbrio entre interações de naturezas opostas e presentes em uma suspensão coloidal de NPMM (RhB) é modulado pelo movimento browniano associado às nanopartículas dispersas na água⁽⁴²⁾.

As figuras 2B e 2C mostraram o comportamento do diâmetro hidrodinâmico ao longo do tempo das NPMM dispersas em meios de cultura DMEM-LG e RPMI nas concentrações de C10=10 e C100=100µg Fe/mL, respectivamente. Analisando o diâmetro hidrodinâmico, apresentando-se como um valor constante no tempo levando em conta as incertezas das medidas, podemos afirmar que NPMM (RhB) são estáveis nas concentrações estudadas e que não houve influência do meio de cultura utilizado na estabilidade nem na formação de agregados das NPMM (RhB). A característica mais importante para marcação intracelular com NPMM (RhB) dispersas em meio de cultura é sua estabilidade, ou seja, a propriedade dessas nanopartículas de permanecerem em suspensão na forma de entidades isoladas (monodomínios), evitando a aglomeração das nanopartículas e subsequente precipitação. Nesse caso, podemos inferir que, devido à dispersão de NPMM (RhB) em meio de cultura, existe um leve desequilíbrio das forças que interagem entre essas nanopartículas, tais como as forças atrativas e repulsivas de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças que resultam de polímeros

adsorvidos⁽⁴³⁾ que têm pouca influência na estabilidade de NPMM (RhB) em meio de cultura, o que garante uma eficiente marcação intracelular. Portanto, NPMM (RhB) são ideais para uma efetiva marcação intracelular nos meios de cultura utilizados, já que a ausência de aglomerados de NPMM (RhB) indica uma boa estabilidade para incubação por períodos de tempo superiores a 20 horas.

Dessa forma, utilizando meios de cultura que conferem estabilidade das NPMM (RhB), a marcação das CTM com essas nanopartículas foi detectada por ensaios citoquímicos (azul de Prússia e fucsina básica) e microscopia de fluorescência, que descreveram localização intracelular das nanopartículas distribuídas pelo citoplasma celular, principalmente ao redor do núcleo como grânulos azulados colocalizados aos grumos fluorescentes, caracterizando, assim, as propriedades magnéticas e fluorescentes das NPMM (RhB). Descreveu-se também que condição de estudo utilizando a concentração C100=100µg Fe/mL revelou uma distribuição de nanopartículas discretamente mais acentuada comparado a C10=10µg Fe/mL.

As CTM marcadas não foram afetadas quanto à viabilidade, já que a curva de proliferação das mesmas demonstrou que as células continuaram proliferando ao longo de 5 dias em cultura, em 2 concentrações diferentes (C10 e C100). Tais resultados corroboram dados obtidos por Addicott et al.⁽²³⁾, quanto à viabilidade técnica do processo de marcação das CTMs *in vitro*. Porém, esses mesmos autores relataram que, em concentrações acima de 30µg Fe/mL, houve um decréscimo da viabilidade das CTM de até 78,8% para C100, o que não ocorreu em nossos ensaios (Figura 4).

Desse modo, este estudo determinou resultados básicos de fundamental importância para a padronização de um protocolo de marcação eficiente das CTM com as NPMM (RhB), já demonstrando a não citotoxicidade desse tipo de marcação por meio do crescimento da curva de proliferação das CTM marcadas.

CONCLUSÃO

Um dos fatores importantes para a internalização das NPMM (RhB) nas células é a estabilidade destas no meio de cultura. Assim, a análise de estabilidade, realizada mediante a técnica de ELD, determinou que as NPMM (RhB) presentes tanto no meio de cultura RPMI quanto no meio DMEM-LG, apresentaram boa estabilidade garantindo, assim, uma adequada marcação intracelular nas CTM.

Uma excelente vantagem de utilização das NPMM (RhB) decorre de sua propriedade multimodal, ou seja,

tais nanopartículas possuem caráter magnético e fluorescente. Considerando que tais nanopartículas são NOFs, estudos de imagem molecular *in vivo* poderiam ser utilizados como ferramenta para análises em RM, no processo de investigação da distribuição e destino de células marcadas. Esse recurso poderia se associar a ensaios *ex vivo* utilizando testes de microscopia de fluorescência, a fim de validar os achados de RM no estudo da localização das NPMM (RhB), maximizando, com isso, possíveis benefícios terapêuticos vinculados a CTMs.

AGRADECIMENTOS

Fontes de auxílio à pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2011/17644-2, Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Kiessling A, Anderson SC. Human embryonic stem cells. Sudbury (MA): Jones and Bartlett; 2003.
- Sibov TT, Pavon LF, Oliveira DM, Marti LC, Guilhen DD, Amaro E Jr, et al. Characterization of adherent umbilical cord blood stromal cells regarding passage, cell number, and nano-biomarking utilization. *Cell Reprogram*. 2010; 12(4):391-403.
- Can A, Balci D. Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;698:51-62.
- Sibov TT, Severino P, Marti LC, Pavon LF, Oliveira DM, Toba PR, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology*. 2012 Feb 12 [Epub ahead of print]. DOI 10.1007/s10616-012-9428-3.
- Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004; 22(4):625-34.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739-49.
- Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshminpathy U, et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*. 2008;112(2): 295-307. Comment in: *Blood*. 2008;112(2):217-8.
- da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-99.
- Aboudy KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(23):12846-51. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(2):777.
- Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*. 2001;7(6):259-64.
- Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J*. 2003;4(2):92-6.
- Covas DT, Siuffi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(9):1179-83.
- Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*. 2008;36(5):642-54.
- Kestendjjeva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev T, Dimitrov A, Nikolov A, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol International*. 2008;32(7):724-32.
- Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells*. 2004;6(4):369-74.
- Schilling T, Nöth U, Klein-Hitpass L, Jakob F, Schütze N. Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;271(1-2):1-17.
- Kim SS, Yoo SW, Park TS, Ahn SC, Jeong HS, Kim JW, et al. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain. *Stem Cells*. 2008;26(9):2217-28.
- Andrews EM, Tsai SY, Johnsonb SC, Farrer JR, Wagner JP, Kopen GC, et al. Human adult bone marrow-derived somatic cell therapy results in functional recovery and axonal plasticity following stroke in the rat. *Exp Neurol*. 2008;211(2):588-92.
- Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology*. 2004;2(1):3.
- Kosztowski T, Zaidi HA, Quiñones-Hinojosa A. Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009;9(5):597-612.
- Chien LY, Hsiao JK, Hsu SC, Yao M, Lu CW, Liu HM, et al. *In vivo* magnetic resonance imaging of cell tropism, trafficking mechanism, and therapeutic impact of human mesenchymal stem cells in a murine glioma model. *Biomaterials*. 2011;32(12):3275-84.
- Wu SY, Ferkowicz M, McClay DR. Ingression of primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo: a precisely timed epithelial mesenchymal transition. *Birth Defects Res C: Embryo Today*. 2007;81(4):241-52.
- Addicott B, Willman M, Rodriguez J, Padgett K, Han D, Berman D, et al. Mesenchymal stem cell labeling and *in vitro* MR characterization at 1.5 T of new SPIO contrast agent: Molday ION Rhodamine B™. *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2011;6(1):7-18. doi: 10.1002/cmml.396. Epub 2010 Aug 5.
- Souza KC, Mohallem ND, Sousa EM. Nanocompósitos magnéticos: potencialidades de aplicações em biomedicina. *Quím Nova*. 2011;34(10): 1692-703.
- Mahmoudi M, Simchi A, Milani AS, Stroeve P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2009;336(2):510-8.
- Jiang J, Fan CY, Zeng BF. Experimental construction of BMP2 and VEGF gene modified tissue engineering bone *in vitro*. *Int J Mol Sci*. 2011;12(3):1744-55.
- Wilhelm C, Gazeau F. Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials*. 2008;29(22):3161-74.
- Rivière C, Boudghène FP, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Laissy JP, et al. Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation. *Radiology*. 2005;235(3):959-67.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
- Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res*. 2003; 82(12):951-6.
- Gao J, Caplan AI. Mesenchymal stem cells and tissue engineering for orthopaedic surgery. *Chir Organi Mov*. 2003;88(3):305-16.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995;18(12):1417-26.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697-705.
- Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM,

- et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004;94(2):223-9.
35. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(3):377-84.
 36. Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood*. 2003;101(8):2973-82.
 37. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61(4):364-70.
 38. Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2397-402.
 39. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):315-21.
 40. Hsiao JK, Tai MF, Chu HH, Chen ST, Li H, Lai DM, et al. Magnetic nanoparticle labeling of mesenchymal stem cells without transfection agent: Cellular behavior and capability of detection with clinical 1.5 T magnetic resonance at the single cell level. *Magn Reson Med*. 2007;58(4):717-24.
 41. Omidkhoda A, Mozdarani H, Movasaghpoor A, Fatholah AA. Study of apoptosis in labeled mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide using neutral comet assay. *Toxicol In Vitro*. 2007;21(6):1191-6.
 42. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans Magn*. 1981;17(2):1247-8.
 43. Myers D. Surfaces, interfaces, and colloids: principles and applications. New York: VCH Publishers; 1991. p.433.