

Avaliação da marcação de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com Dextran e complexadas a Poli-L-Lisina

Evaluation of umbilical cord mesenchymal stem cells labeling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with dextran and complexed with Poly-L-Lysine

Tatiana Taís Sibov¹, Liza Aya Mabuchi Miyaki², Javier Bustamante Mamani¹, Luciana Cavalheiro Marti³, Luiz Roberto Sardinha³, Lorena Favaro Pavon¹, Daniela Mara de Oliveira⁴, Walter Humberto Cardenas¹, Lionel Fernel Gamarra¹

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da marcação de células-tronco mesenquimais obtidas da parede da veia do cordão umbilical com nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas recobertas com dextran e complexadas a um agente transfeutor não viral denominado de Poli-L-Lisina. **Métodos:** A marcação das células-tronco mesenquimais foi realizada utilizando as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas recobertas com dextran complexadas e não complexadas a Poli-L-Lisina. As nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas recobertas com dextran foram incubadas com o Poli-L-Lisina em um sonicador ultrassônico a 37°C por 10 minutos, para a formação do complexo através de interação eletrostática. Em seguida, as células-tronco mesenquimais foram incubadas *overnight* com as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas complexadas e não com Poli-L-Lisina. Após o período de incubação as células-tronco mesenquimais foram avaliadas quanto à internalização do complexo nanopartícula de óxido de ferro superparamagnéticas /dextran/Poli-L-Lisina e nanopartícula de óxido de ferro superparamagnéticas /dextran através de ensaio citotóxico com azul de prússia. A viabilidade celular das células-tronco mesenquimais marcadas foi avaliada através do ensaio de proliferação celular utilizando o método de 5,6-carboxy-fluorescein-succinimidyl-ester e de morte celular através do método de anexinodeto de propídeo, ambos utilizando o recurso de citometria de fluxo.

Resultados: Observamos nos ensaios citotóxicos que as células-tronco mesenquimais que foram marcadas com as nanopartícula de óxido de ferro superparamagnéticas /dextran sem a Poli-L-Lisina, não internalizaram com eficiência as nanopartículas devido pouca detecção de sua presença no interior das células. As células-tronco mesenquimais marcadas com o complexo nanopartícula de óxido de ferro superparamagnéticas /dextran/Poli-L-Lisina internalizaram com eficiência as nanopartículas devido à maior presença destas no interior das células. Os ensaios de viabilidade e morte celular demonstraram respectivamente que as células-tronco mesenquimais marcadas com as nanopartícula de óxido de ferro superparamagnéticas /dextran/Poli-L-Lisina continuam proliferando ao longo de sete dias e a porcentagem de células em apoptose inicial e tardia é baixa em relação à porcentagem de células vivas ao longo de três dias. **Conclusão:** Evidenciamos através de nossos resultados a necessidade da utilização da Poli-L-Lisina complexada com a nanopartícula de óxido de ferro superparamagnéticas /dextran para melhor internalização nas células-tronco mesenquimais. Paralelamente, demonstramos que este tipo de marcação não é citotóxico para as células-tronco mesenquimais já que os testes de morte e viabilidade celular mostraram que as células continuam vivas e proliferando.

Descritores: Células-tronco mesenquimais; Nanopartículas de magnetita; Poli-L-Lisina; Veias umbilicais

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.

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

³ Centro de Pesquisa Experimental, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Universidade de Brasília – UnB, Brasília (DF), Brasil.

Autor correspondente: Tatiana Taís Sibov – Avenida Albert Einstein, 627 – 2º subsolo – Instituto do Cérebro (InCe) – CEP: 05651-901 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: (11) 2151-2044 – E-mail: tatianats@einstein.br

Data de submissão: 7/9/2011 – Data de aceite: 6/6/2012

Conflitos de interesse: não há.

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to evaluate the effect of the labeling of umbilical cord vein derived mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with dextran and complexed to a non-viral transfection agent transfection poly-L-lysine.

Methods: The labeling of mesenchymal stem cells was performed using the superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran complexed and not complexed to poly-L-lysine. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran was incubated with poly-L-lysine in an ultrasonic sonicator at 37°C for 10 minutes for complex formation superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran/poly-L-lysine by electrostatic interaction. Then, the mesenchymal stem cells were incubated overnight with the complex superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran/poly-L-lysine and superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran. After the incubation period the mesenchymal stem cells were evaluated by internalization of the complex superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran/poly-L-lysine and superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran by Prussian Blue stain. Cellular viability of labeled mesenchymal stem cells was evaluated by cellular proliferation assay using 5,6-carboxy-fluorescein-succinimidyl ester method and apoptosis detection by Annexin V- Propidium Iodide assay. **Results:** mesenchymal stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran without poly-L-lysine not internalized efficiently the superparamagnetic iron oxide nanoparticles due to its low presence detected within cells. Mesenchymal stem cells labeled with the complex superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran/poly-L-lysine efficiently internalized the superparamagnetic iron oxide nanoparticles due to greater presence in the cells interior. The viability and apoptosis assays demonstrated that the mesenchymal stem cells labeled and not labeled respectively with the superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran/poly-L-lysine continue to proliferate over seven days and the percentage of cells in early or late apoptosis is low compared to the percentage of live cells over the three days. **Conclusion:** Our results showed that the use of poly-L-lysine complexed with superparamagnetic iron oxide nanoparticles/dextran provides better internalization of these superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mesenchymal stem cells. Thus, we demonstrated that this type of labeling is not cytotoxic to the mesenchymal stem cells, since the viability and apoptosis assays showed that the cells remain alive and proliferating. The efficiency of this type of labeling in mesenchymal stem cells can provide non-invasive methods for monitoring these cells in vivo.

Keywords: Mesenchymal stem cells; Magnetite nanoparticles; Poly-L-lysine; Umbilical veins

INTRODUÇÃO

Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (NOF) têm sido bastante utilizadas em várias aplicações biomédicas *in vitro* e *in vivo*^(1,2). Nestas aplicações, existe a necessidade de alta especificidade, eficiência e rápida internalização das NOF em células alvo específicas, mas isto pode ser limitado por diversos fatores⁽³⁾: (i) agregação de NOF (NOF têm uma relação grande de superfície/volume e por esta razão tendem a se aglo-

merar); (ii) meia-vida curta das NOF na circulação sanguínea (quando as NOF aglomeram, ou adsorvem proteínas plasmáticas, que são rapidamente eliminadas da circulação sanguínea por macrófagos do sistema mononuclear fagocitário antes que possam atingir as células alvo); (iii) e a baixa eficiência da captação intracelular de NOF.

Polímeros biocompatíveis e agentes com alvos específicos são, portanto, ligadas à superfície de NOF para evitar a aglomeração e aumentar a sua absorção não específica intracelular^(4,5).

Todas as aplicações requerem que as NOF tenham altos valores de magnetização e um tamanho menor que 100nm, com uma estreita distribuição entre os tamanhos, de modo que apresentem propriedades físicas e químicas uniformes⁽⁶⁾. A natureza da cobertura da superfície das NOF auxilia na determinação do tamanho total do coloide e também desempenha um papel significativo na biocinética e biodistribuição das NOF *in vivo*^(1,2).

Desde o início da utilização de agentes de contraste na ressonância magnética (1987), a maioria dos óxidos de ferro superparamagnéticos (SPION) e *ultrasmall* óxidos de ferro superparamagnéticos (USPION) são absorvidos por macrófagos, podendo estas partículas serem revestidas por dextran ou outros tipos de revestimentos poliméricos para conseguir uma boa dispersão em água e seletividade⁽⁷⁾. NOF revestidas com dextran (DX), no entanto, não são captadas de forma eficiente pelas células, provavelmente devido à agregação e ao aumento do tamanho da NOF-DX o que pode ocasionar uma endocitose ineficiente pela célula. A não captação de forma eficiente das NOF-DX tem sido reduzida através do revestimento destas NOF com polímeros⁽²⁾.

Compostos catiônicos, tais como, Poli-L-Lisina (PLL)⁽⁸⁾ tem sido utilizado para auxiliar na interação da NOF com a superfície das células que apresentam carga negativa e assim consequente absorção endossomal^(2,8). PLL é um polímero catiônico o qual apresenta alta densidade de cargas positivas em sua cadeia, o que conduz a uma atração e consequente ligação a moléculas predominantemente com cargas negativas⁽⁸⁾.

As CTM são células multipotentes que apresentam capacidade de dar origem a outros tipos celulares de forma limitada, por exemplo, a células adipocíticas, osteoblásticas e condrocíticas^(9,10). O transplante deste tipo celular poderia ser um tratamento eficaz para doenças como, por exemplo, acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) e lesões da medula espinal. No entanto, o acompanhamento do comportamento destas células

in vivo ainda é um dos obstáculos para sua utilização em terapia celular. A possibilidade de uma marcação eficiente destas células com NOF, sem efeitos citotóxicos e perda de viabilidade, poderia disponibilizar métodos não invasivos para o acompanhamento destas células *in vivo*.

Desta forma, a marcação de CTM com NOF tem sido estudada ao longo dos últimos anos^(11,12), mas ainda não há estudos que caracterizem completamente os efeitos citotóxicos deste tipo de marcação na proliferação, sobrevivência e diferenciação celular.

Neste estudo comparamos a eficiência da marcação das CTM utilizando NOF-DX complexadas ou não a PLL, com intenção de analisar a facilidade de incorporação da partícula pelas células e a citotoxicidade deste tipo de marcação. Assim analisamos a viabilidade celular ao longo de sete dias de marcação e a morte celular ao longo de três dias. Nossos resultados demonstraram que as CTM são marcadas com as NOF-DX de forma eficiente não ocasionando efeitos tóxicos para as células em questão.

OBJETIVO

Comparar a eficiência de internalização de NOF-DX complexadas ou não ao PLL pelas CTM. Avaliar se a internalização de NOF-DX-PLL causam citotoxicidade as CTM utilizando técnicas de citometria de fluxo.

MÉTODOS

Coleta das amostras de cordão umbilical

Cinco amostras de cordão umbilical foram coletadas após assinatura do consentimento informado pela mãe (doadora) de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP – nº1059) do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (São Paulo, Brasil). Estas amostras foram coletadas através da secção do cordão umbilical no momento do parto e conservado em Phosphate Buffered Saline 1x (PBS, Sigma-Aldrich) com 100mM de anticoagulante EDTA e logo depois processado ou até 12 horas após a coleta.

Processamento das amostras de cordão umbilical

Após duas lavagens com PBS 1x (Sigma-Aldrich) da veia do cordão umbilical as CTM foram retiradas da amostra por digestão enzimática através da utilização da Collagenase Tipo I (Sigma-Aldrich) por 30 minutos, 37°C em 5% CO₂. Em seguida, a enzima foi inativada com Soro Fetal Bovino (GIBCO/Invitrogen Corporation).

Cultura das CTM

As CTM isoladas das amostras de cordão umbilical foram plaqueadas em placas de 25-cm² a uma densidade celular de 10⁷ células/cm² contendo meio *Dulbecco's Modified Eagle's-Low Glucose* (DMEM-LG, GIBCO/Invitrogen Corporation) suplementado com L-Glutamine 200mM, *Antibiotic-Antimycotic* 10.000U/mL *sodium penicillin*, 10.000 µg/ml *streptomycin sulfate*, 25 µg/ml amphotericin B (GIBCO/Invitrogen Corporation) e 10% Soro Fetal Bovino (GIBCO/Invitrogen Corporation). As culturas de CTM foram mantidas a 37°C em 5% CO₂ e as células não aderentes foram removidas da placa de cultura após 24 horas. O meio de cultura foi trocado em dias alternados. Os experimentos foram realizados na quarta passagem celular com as células em 90% de confluência.

Imunofenotipagem das CTM por citometria de fluxo

O experimento de caracterização das CTM por imunofenotipagem realizado por citometria de fluxo utilizou anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente. A técnica de marcação utilizada estava de acordo com as instruções técnicas do fabricante. Brevemente, as células foram marcadas com os anticorpos monoclonais selecionados e incubadas no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente, após a incubação as células foram lavadas e fixadas com paraformoldeído 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 utilizando *software* FACSDIVA (BD Biosciences) e FLOWJO (Tree Star, Ashland, OR).

Nanopartículas de óxido de ferro recobertas com dextran

NOF recobertas com dextran em dispersão aquosa (fluidMAG-DX) foram adquiridas da *Chemicell*, o ferrofluído apresenta uma concentração de 50mg/mL, com núcleo magnético de fase cristalina identificada

como maguemita ($\text{g-Fe}_2\text{O}_3$), tamanho hidrodinâmico de 50nm, número de partículas $\sim 1,3 \times 10^{16}/\text{g}$, densidade de $\sim 1,25 \text{ g/cm}^3$, grupo funcional *Hydroxyl* e matrix de dextran.

Marcação das CTM com NOF-Dextran-PLL

As NOF-DX ($500\mu\text{g/mL}$) e a PLL ($1,5\mu\text{g/mL}$) foram incubadas a 37°C por 10 minutos no sonicador ultrassônico (*Transsonic T460/H – Elma*). Em seguida, o experimento de marcação das CTM com o complexo NOF-DX-PLL foi realizado em placa de cultura de 24 wells, a uma de concentração $500\mu\text{g/mL}$ de NOF-DX-PLL, para uma concentração celular de aproximadamente 10^5 . A marcação das CTM com o complexo NOF-DX-PLL foi realizada em meio RPMI (GIBCO Invitrogen Corporation) e 10% Soro Fetal Bovino (GIBCO/Invitrogen Corporation), em um período de incubação overnight, mantidas a 37°C em 5% CO_2 .

Análise da internalização das NOF-DX-PLL nas CTM

As CTM marcadas foram lavadas com PBS 1x (Sigma-Aldrich) para a remoção do excesso de partículas, e em seguida fixadas com paraformaldeído 4%. Em seguida, foi realizado o ensaio citoquímico de azul de prússia 5% - Solução 5% Ferrocianeto de Potássio (Sigma-Aldrich) / Solução 5% HCl 37% (Merck, Germany), para verificar a internalização das partículas nas CTM. A análise foi realizada no microscópio *Fluorescence Microscopy* (IX51 Olympus).

Ensaio de proliferação celular - CFSE

Para a análise de proliferação de 10^5 CTM de cada amostra foram ressuspensas em PBS 1x (Sigma-Aldrich) contendo $1\mu\text{M}$ de CFSE (*5,6-carboxy-fluorescein-succinimidyl-ester*, Molecular Probes) e incubados a 37°C durante 10 minutos, após este período foi adicionado 9 ml de PBS 1x (Sigma-Aldrich) - 1% Soro Fetal Bovino (GIBCO/Invitrogen Corporation) as células foram centrifugadas a 400g durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 ml de PBS 1x (Sigma-Aldrich) - 1% Soro Fetal Bovino (GIBCO/Invitrogen Corporation) e incubadas a 37°C durante 15 minutos, após este período as células foram centrifugadas novamente a 400g durante 10 minutos e ressuspensas em PBS 1x (Sigma-Aldrich) - 1% Soro Fetal Bovino (GIBCO/Invitrogen Corporation). O ensaio foi realizado em 24, 72 horas e 7 dias. A aquisição dos dados foi realizada no equipamento de citometria de fluxo FACSARIA (BD Biosciences, San Jose, CA).

Ensaio de morte celular – anexina/iodeto de propídeo

Para o ensaio de morte celular foi utilizado o kit BD *Pharmingem FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences, San Diego, CA). 10^5 CTM de cada amostra foram ressuspensas em 200uL de *Binding Buffer* 1x e em seguida centrifugadas a 400g durante 5 minutos a 4°C . Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas novamente em 200uL de *Binding Buffer* 1x e centrifugadas a 400g durante 5 minutos a 4°C – a seguir o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas no MIX (*Binding Buffer* 1x/Anexina/Iodeto de Propídeo) e incubadas no escuro por 15 minutos – posteriormente foi acrescentado 100uL de *Binding Buffer* 1x. A aquisição dos dados foi realizada antes de se completar uma hora da marcação no equipamento de citometria de fluxo FACSARIA (BD Biosciences, San Jose, CA). A morte celular programada ou apoptose inicial tem como marco a exposição da fosfatidil serina (FS) na membrana plasmática, a qual se liga por afinidade com anexina V. Na morte celular programada tardia ou apoptose tardia além da exposição da FS na membrana celular ocorre o aparecimento de poros na mesma tornando-a permeável ao iodeto de propídeo o que faz com que a célula possua dupla marcação (anexina-IP). Em caso de necrose celular ocorre a permeabilização da membrana plasmática com a consequente marcação pelo iodeto de propídeo, não havendo externalização da FS, porém devido à formação de poros na membrana pode ocorrer também a internalização da anexina V, neste caso não conseguimos diferenciar o processo de apoptose tardia do processo de necrose.

RESULTADOS

Caracterização das CTM isoladas de cordão umbilical por citometria de fluxo

As CTM isoladas das amostras de cordão umbilical apresentaram morfologia fibroblástica e atingiram a confluência entre 80 e 90% em sete dias em cultura (Figura 1). No ensaio de imunofenotipagem realizado por citometria de fluxo as CTM não expressaram positi-

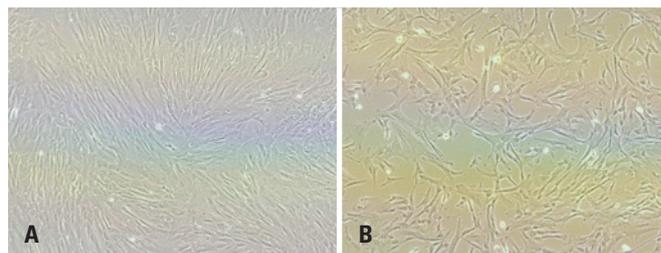


Figura 1. Células-tronco mesenquimais isoladas de amostras de cordão umbilical. A) Cultura de CTM com aproximadamente 90% de confluência – 400x; B) Cultura de CTM com aproximadamente 80% de confluência

vidade para CD14, CD31, CD34, CD45, CD106, CD133 e HLA-DR. Os resultados estão representados por histogramas, que no seu eixo x, mostra a intensidade de fluorescência para cada anticorpo específico. As CTM expressaram positividade para HLA A, B e C (HLA-I),

CD29, CD73, CD90 e CD105, os resultados estão representados por histogramas e as populações de células marcadas positivamente e as células marcadas com os isotipos controles estão sobrepostas no mesmo gráfico (Figura 2).

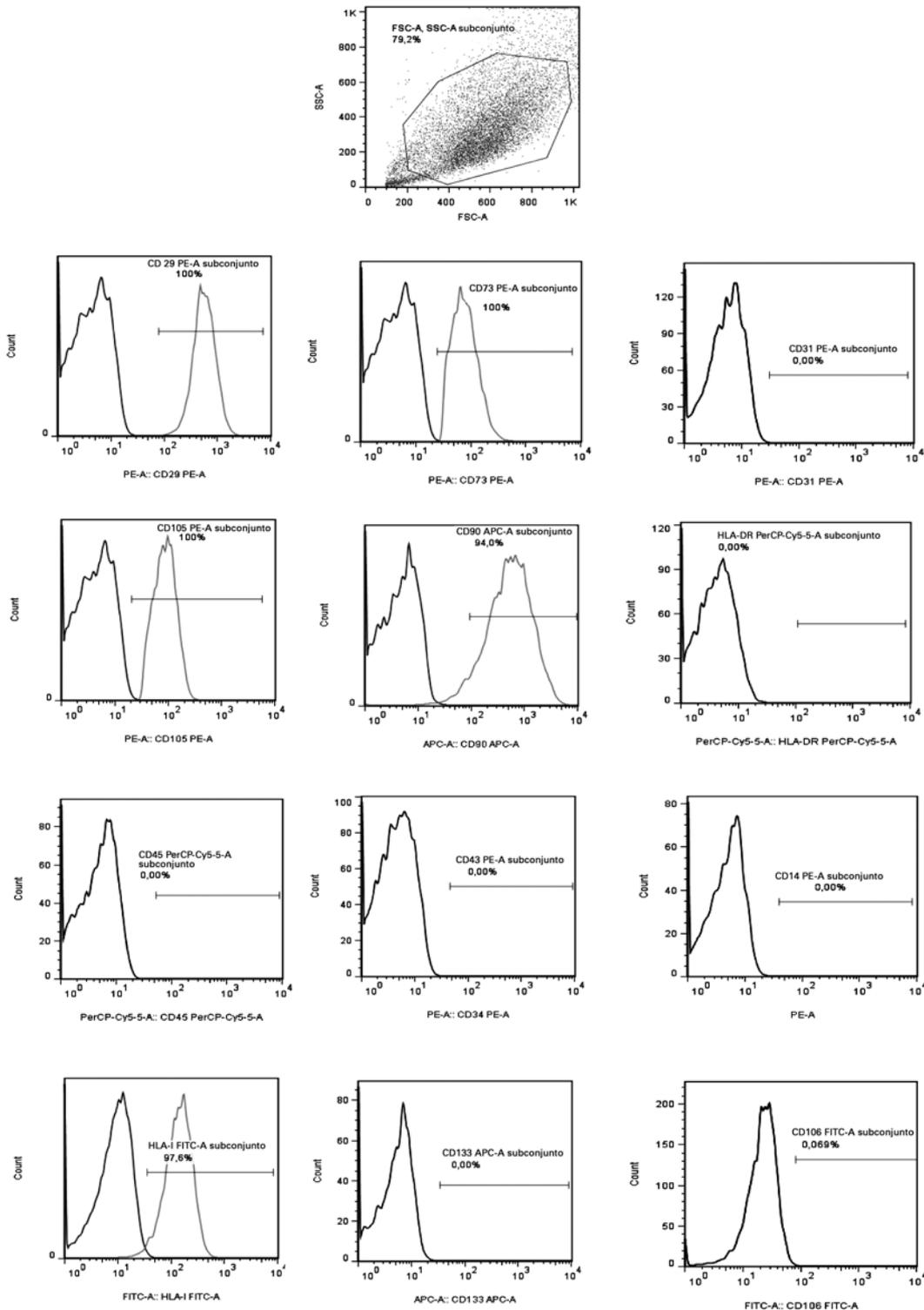


Figura 2. Imunofenotipagem das CTM isoladas de cordão umbilical. O primeiro gráfico representa por pontos todas as células adquiridas, que são visualizadas por dois parâmetros, no eixo x o parâmetro que representa tamanho (FSC) e no eixo y o parâmetro que representa granulocidade (SSC), as células selecionadas neste gráfico foram analisadas em todos os gráficos subsequentes

CTM marcadas com o complexo NOF-DX-PLL

A marcação das CTM com as NOF-DX com e sem PLL foi analisada após realização do ensaio citoquímico de Azul de Prússia. Nestas condições, a internalização das NOF-DX foi observada apenas quando a PLL foi complexada a partícula como um agente transfeutor não viral (Figura 3 A, B, C). Assim, marcações em azul de localização intracelular foram detectadas quando as NOF-DX foram complexadas a PLL, em relação ao controle negativo – CTM não marcadas (Figura 3F). As CTM marcadas somente com as NOF-DX, foram observadas apenas alguns pequenos precipitados azuis intracelulares, demonstrando assim menos eficiência na marcação (Figura 3 D, E).

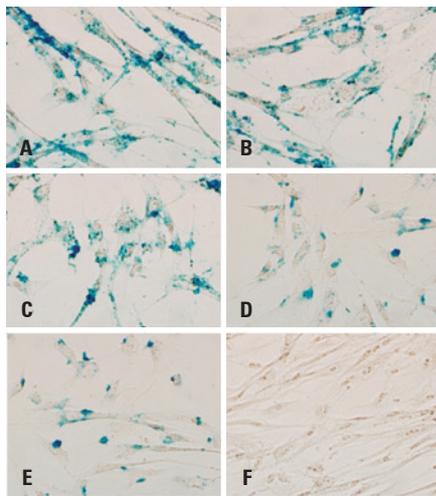


Figura 3. CTM marcadas com o complexo NOF-DX-PLL. (A, B, C) CTM marcadas com o complexo NOF-DX-PLL, 600x; (D, E) CTM marcadas com as NOF-DX sem a PLL, 400x; (F) CTM não marcadas – controle negativo

Proliferação das CTM marcadas com NOF-DX-PLL

O CFSE é um corante vital com propriedades fluorescentes utilizado para estimar indiretamente a proliferação celular: uma célula marcada com CFSE ao se dividir gera duas células filhas que contém metade da quantidade de CFSE da célula original, desta maneira a fluorescência das células filhas será a metade da fluorescência da célula mãe.

Os resultados deste teste mostraram a atividade proliferativa das CTM marcadas com as NOF-DX-PLL ao longo de sete dias. Neste período foi possível detectar sucessivas divisões celulares, e conseqüentemente diluição do CFSE no interior das células, a proliferação detectada pela diluição do CFSE nas células marcadas com NOF-DX-PLL foi próximo aos valores detectados nas células não marcadas (controle negativo), indicando que as NOF-DX-PLL não interferem na atividade proliferativa das CTM (Figura 4).

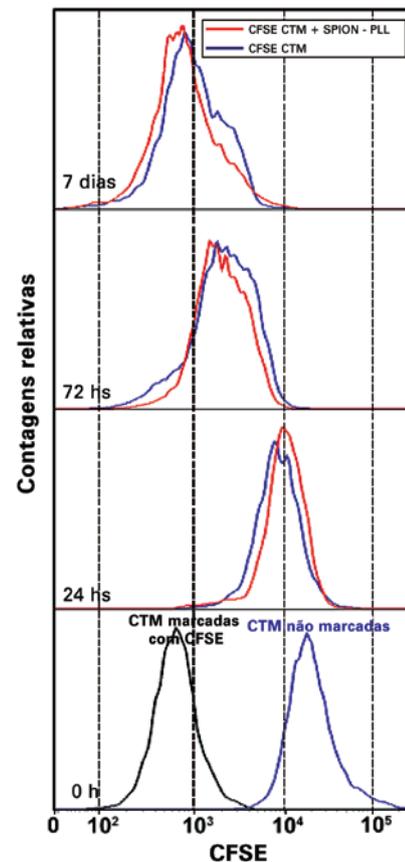


Figura 4. Ensaio de proliferação celular pelo método de CFSE. À medida que a curva desloca para a esquerda significa que as CTM estão proliferando. Observamos que ao longo de 7 dias as CTM marcadas com as NOF-DX-PLL (curva vermelha) se deslocaram juntamente com as CTM controle (não marcadas – curva azul)

Viabilidade das CTM marcadas com NOF-DX-PLL

As CTM marcadas com NOF-DX-PLL foram avaliadas quanto à morte celular programada ou apoptose, a apoptose inicial tem como marco a exposição da fosfatidil serina (FS) na membrana plasmática, a qual se liga por afinidade com anexina V.

As CTM também foram avaliadas quanto à morte celular programada tardia ou apoptose tardia que além da exposição da FS na membrana celular ocorre o aparecimento de poros na membrana se tornando permeável ao iodeto de propídeo o que faz com que a célula possua dupla marcação (anexina-IP). Em caso de necrose celular ocorre a permeabilização da membrana plasmática com a conseqüente marcação pelo iodeto de propídeo, não havendo externalização da FS, porém devido à formação de poros na membrana pode ocorrer também a internalização da anexina V, neste caso não conseguimos diferenciar o processo de apoptose tardia do processo de necrose. Os resultados mostraram a viabilidade das CTM marcadas com as NOF-DX-PLL ao longo de três dias, que detectada devido à relação do número de células vivas pelo número de células mortas,

seja por apoptose inicial/tardia ou necrose – Q3, Q2, Q1 respectivamente (Figura 5. C, F, I), em relação as células não marcadas - controle negativo (Figura 5. B, E, H). Ao longo de 72 horas de ensaio, notamos baixo ín-

dice de morte celular nas CTM marcadas com as NOF-DX-PLL, principalmente por apoptose tardia/necrose em relação às CTM não marcadas (controle negativo) (Figura 5. C, F, I e B, E, H respectivamente).

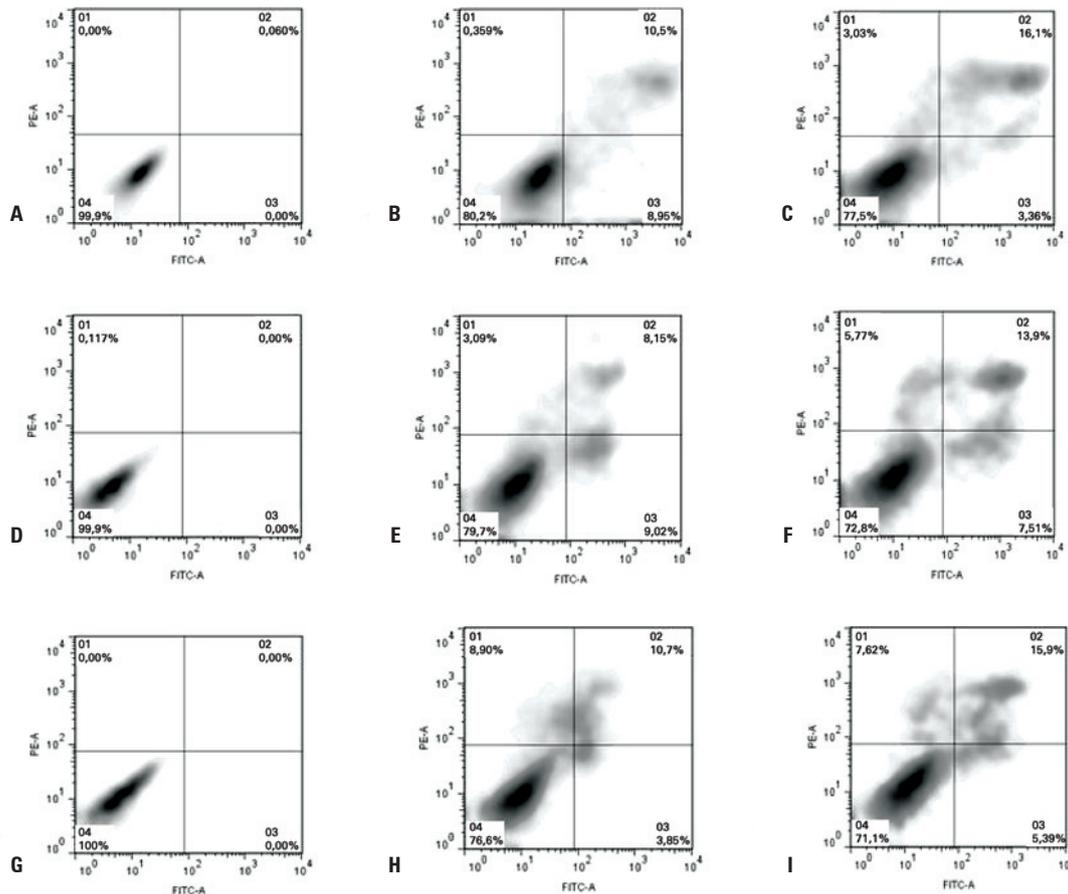


Figura 5. Ensaio de viabilidade celular pelo método de anexina-iodeto de propídeo. (A, D, G) Representam as CTM não marcadas com as NOF-DX-PLL (controle negativo) e sem marcação para anexina-iodeto de propídeo (controle negativo interno do ensaio de viabilidade) relativo a 24, 48 e 72 horas respectivamente. (B, E, H) Representam as CTM não marcadas com as NOF-DX-PLL (controle negativo) e marcadas com anexina-iodeto de propídeo (controle positivo interno do ensaio de viabilidade) relativo a 24, 48 e 72 horas respectivamente. (C, F, I) Representam as CTM marcadas com as NOF-DX-PLL e marcadas com anexina-iodeto de propídeo relativo a 24, 48 e 72 horas respectivamente

DISCUSSÃO

A grande vantagem da técnica de marcação das CTM com as NOF-DX-PLL é a incorporação deste complexo pelas células sem grandes alterações na viabilidade e na capacidade de proliferação celular, além da marcação ocorrer de forma eficiente.

A PLL é um polímero catiônico (presença de grupos NH₂) o qual apresenta alta densidade de cargas positivas em sua cadeia, o que conduz a uma atração e consequente ligação a moléculas com cargas negativas^(13, 14). Assim, é utilizado como um agente transfectivo não viral promovendo adesão celular através de interação eletrostática devido a sua carga positiva enquanto a superfície celular apresenta cargas negativas. A PLL é

conhecida por adsorver proteínas não somente de soluções como nutrientes de meios de cultura, mas também proteínas presentes na membrana celular⁽¹⁵⁾.

Desta forma, o princípio da marcação é a combinação de macromoléculas altamente carregadas com a superfície composta de cargas opostas, resultando na formação de um complexo NOF-DX-PLL que facilita a interação e consequente endocitose e/ou incorporação das partículas em endossomos celulares⁽¹³⁾. Os ensaios realizados com as NOF-DX não complexadas a PLL mostram uma marcação menos eficiente, com uma incorporação menor de partículas pelas células (Figura 3). Desta forma, a utilização da PLL como agente transfectivo não viral para marcação celular com nanopartículas é bastante favorável pela sua eficiência, seguido

de alta reprodutibilidade dos ensaios e baixo custo. No entanto, o uso da PLL em altas concentrações pode acarretar a desvantajosa agregação de partículas fora das células^(14, 15). Assim, com a PLL na concentração de 1,5µg/mL utilizada em nossos ensaios, conseguimos padronizar condições adequadas para obtenção na eficiência da internalização das nanopartículas pelas CTM, sem efeitos citotóxicos e sem a agregação das mesmas.

Quanto à viabilidade celular das CTM marcadas, foi mostrada uma estimativa deste tipo de marcação através do ensaio de anexina-iodeto de propídeo. Optamos por este tipo de ensaio, pois conseguimos distinguir entre células vivas, em apoptose inicial e tardia/necrose. Observamos um discreto, aumento, mas sem significância no número de células em apoptose tardia/necrose 72 horas após a marcação das CTM em relação 24 e 48 horas de marcação (Figura 5). Dados na literatura mostram que células marcadas com altas concentrações de nanopartículas e PLL resultam no aumento da porcentagem de morte celular comparados a células controles^(16, 17).

Apesar da concentração das nanopartículas utilizadas nos ensaios ser de 500µg/mL, sendo esta concentração maior em relação a outros dados da literatura, demonstrou que não houve efeito citotóxico para as CTM marcadas com as NOF-DX-PLL. Portanto, nosso protocolo padronizado de marcação das CTM com as NOF-DX-PLL parece viável para o tipo de análise proposta.

Da mesma forma, avaliamos os efeitos da marcação na atividade proliferativa das CTM marcadas através do ensaio de CFSE. Demonstramos que as CTM marcadas com as nanopartículas incubadas ao longo de sete dias mantiveram sua atividade proliferativa. No entanto, devido às sucessivas divisões celulares, e consequente diluição do CFSE no interior das células, a fluorescência das células marcadas atingiu os valores de células não marcadas (controle negativo). Assim, notamos que os valores de fluorescência das CTM marcadas com as NOF-DX-PLL não diferem dos valores encontrados na CTM controle, indicando que as NOF-DX-PLL não interferem na atividade proliferativa das CTM (Figura 4).

Deste modo, este estudo gerou resultados preliminares de fundamental importância, uma vez que conseguimos padronizar uma marcação eficiente das CTM com NOF-DX-PLL e demonstrar a ausência citotoxicidade de acordo com as observações de que as células marcadas mantêm-se viáveis e proliferando.

Este tipo de estudo é promissor para o futuro desenvolvimento de técnicas de monitoramento *in vivo* de migração temporal e espacial das células marcadas para os tecidos de interesse, reforçando assim o desenvolvi-

mento de estratégias para a reparação ou substituição de tecidos e novas terapias.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que é possível padronizar uma marcação eficiente com NOF-DX-PLL e com ausência de citotoxicidade para as CTM, viabilizando desta forma a realização de estudos de migração e *homing in vivo*, melhorando a percepção da migração, localização e ação destas células frente a danos teciduais.

REFERÊNCIAS

1. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*. 2003;36:R167-R181.
2. Babic M, Horák D, Trchová M, Jendelová P, Glogarová K, Lesný P, et al. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconj Chem*. 2008;19(3):740-50.
3. Stella B, Arpicco S, Peracchia MT, Desmaële D, Hoebeke J, Renoir M, et al. Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *J Pharm Sci*. 2000;89(11):1452-64.
4. Zhang Y, Zhang J. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticle for improved intracellular uptake to breast cancer cells. *J Colloid Interface Sci*. 2005;283(2):352-7.
5. Allen MJ, MacRenaris KW, Venktasubramanian PN, Meade TJ. Cellular delivery of MRI contrast agents. *Chem Biol*. 2004;11(3):301-7.
6. Stark DD, Weissleder R, Elizondo G, Hahn PF, Saini S, Todd LE, et al. Superparamagnetic iron oxide: clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology*. 1988;168(2):297-301.
7. Molday RS, MacKenzie D. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *J Immunol Methods*. 1982; 52(3):353-67.
8. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, et al. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*. 2003;229(3):838-46.
9. Arbab AS, Yocum GT, Wilson LB, Parwana A, Jordan EK, Kalish H, et al. Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labeling efficiency, and cellular viability. *Mol Imaging*. 2004;3(1):24-32.
10. Kalish H, Arbab AS, Miller BR, Lewis BK, Zywicke HA, Bulte JW, et al. Combination of transfection agents and magnetic resonance contrast agents for cellular imaging: relationship between relaxivities, electrostatic forces, and chemical composition. *Magn Reson Med*. 2003;50(2):275-82.
11. Can A, Balci D. Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;698:51-62.
12. Kiessling AA, Anderson S. Human embryonic stem cells: an introduction to the science and therapeutic potential. Sudbury (MA): Jones & Bartlett Publishers; 2003.
13. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Bulte JW, Frank JA. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation*. 2003;76(7):1123-30.
14. Mailänder V, Landfester K. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*. 2009;10(9):2379-400.
15. Montet-Abou K, Montet X, Weissleder R, Josephson L. Transfection agent induced nanoparticle cell loading. *Mol Imaging*. 2005;4(3):165-71.
16. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, et al. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled

with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*. 2003;229(3):838-46. Comments in: *Radiology*. 2003;229(3):615-6.

17. Omidkhoda A, Mozdarani H, Movasaghpour A, Fatholah AA. Study of apoptosis in labeled mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide using neutral comet assay. *Toxicology in Vitro*. 2007;21(6):1191-6.