

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ERIKA REGINA LEAL DE FREITAS

**CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO INDIFERENCIADO DE CÉLULAS TRONCO
EMBRIONÁRIAS MURINAS EXPANDIDAS NA PRESENÇA DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E ISOLAMENTO DE CÉLULAS TRONCO
EMBRIONÁRIAS A PARTIR DE BLASTOCISTOS BOVINOS**

Goiânia-Goiás

2009

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Erika Regina Leal de Freitas		
E-mail:	erikaregina2@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	☒ Sim	☐ Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	-
		CNPJ:	-
Título:	Caracterização do estado indiferenciado de células tronco embrionárias murinas expandidas na presença de nanopartículas magnéticas e isolamento de células tronco embrionárias a partir de blastocistos bovinos		
Palavras-chave:	Células tronco embrionárias; Nanopartículas magnéticas; Pluripotência		
Título em outra língua:	Characterization of undifferentiated state of murine embryonic stem cells expanded in the presence of magnetic nanoparticles and isolation of embryonic stem cells from bovine blastocysts		
Palavras-chave em outra língua:	Embryonic stem cells; Magnetic nanoparticles; Pluripotency		
Área de concentração:	Biologia Celular e molecular		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	14/08/2009		
Programa de Pós-Graduação:	Biologia		
Orientador (a):	Lídia Andreu Guillo		
E-mail:	guillo@icb.ufg.br		
Co-orientador (a):			
E-mail:			

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 14 /09 /2009

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

ERIKA REGINA LEAL DE FREITAS

**CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO INDIFERENCIADO DE CÉLULAS TRONCO
EMBRIONÁRIAS MURINAS EXPANDIDAS NA PRESENÇA DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E ISOLAMENTO DE CÉLULAS TRONCO
EMBRIONÁRIAS A PARTIR DE BLASTOCISTOS BOVINOS**

Orientadora: Prof^a Dr^a Lídia Andreu Guillo

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia-ICB/UFG, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Biologia,
na área de concentração: Biologia Celular e
Molecular

Goiânia-Goiás

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Freitas, Erika Regina Leal de.

F866c Caracterização do estado indiferenciado de células tronco embrionárias murinas expandidas na presença de nanopartículas magnéticas e isolamento de células tronco embrionárias a partir de blastócitos bovinos [manuscrito] / Erika Regina Leal de Freitas. – 2009.

125 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lídia Andreu Guillo.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas e de abreviaturas e siglas.

1. Células tronco embrionárias 2. Nanopartículas magnéticas
3. Pluripotência I. Guillo, Lídia Andreu. II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de Ciências Biológicas** III. Título.

CDU: 602.9

À minha filha Maria Paula, pela paciência e carinho;
ao meu esposo Roserlan, pelo incentivo e
companherismo; e em especial à minha avó Maria
pelo amor e dedicação em todos os momentos da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar vida e força para continuar superando os obstáculos e continuar buscando pelos meus objetivos.

Aos meus pais, pelo carinho e compreensão em todos os momentos da minha vida.

A Prof^a Dr^a Lúcia Andreu Guillo, pela orientação deste trabalho, e também pela amizade e apoio constante.

As colegas e amigas do Laboratório de Bioquímica Celular, Paula, Rachel, Zenilda, Débora, Larissa e Kárita, pela amizade, paciência, convívio e colaboração neste trabalho.

A Dr^a Emília Celma O. Lima, Regiane L. Santos e Joel R. Silva do Instituto de Química/UFG, pela síntese das nanopartículas magnéticas.

A Dr^a Lygia da Veiga Pereira do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva/USP, pela doação da linhagem de células tronco embrionárias murinas (USP1).

A Dr^a Sônia N. Bão e Elaine P. Porfírio do Laboratório de Microscopia Eletrônica/UnB, pela realização da microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Dr. Benedito Dias O. Filho e Bruno V. Sanches da Escola de Veterinária/UFG, pela colaboração no isolamento das células tronco embrionárias bovinas.

A empresa In Vitro Brasil Ltda, pela doação dos embriões bovinos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia-ICB/UFG, em especial a Gleizilene, pela constante colaboração.

Aos professores, Dr. Cirano José Ulhoa, Dr. Carlos Estrela e Dr^a Emília Celma O. Lima, pela contribuição no exame de qualificação.

Ao CNPq, CAPES, FUNAPE/UFG e Ministério da Saúde, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	iv
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Células tronco	1
1.2 Células tronco embrionárias	3
1.2.1 Isolamento, expansão e sistemas de cultura para células tronco embrionárias	7
1.2.2 Propriedades das células tronco embrionárias e caracterização da pluripotência	13
1.3 Células tronco e nanobiotecnologia	16
1.4 Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	17
1.5 Justificativa	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivos Gerais	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3. ARTIGO I	33
4. ARTIGO II	41
5. ARTIGO III	69
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	88
7. CONCLUSÕES	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
9. ANEXOS	111

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALP- *Alkaline phosphatase*

AR- *Ácido Retinóico*

bES- *Bovine Embryonic Stem*

bFGF- *Basic Fibroblast Growth Factor*

BMP4- *Bone Morphogenetic Protein 4*

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSA- *Dimercaptosuccinic Acid*

DMSO- *Dimetilsulfóxido*

DNA- *Deoxyribonucleic Acid*

EB- *Embryoide Body*

ES- *Embryonic Stem*

ESCs-*Embryonic Stem Cells*

FBS- *Fetal Bovine Serum*

HeLa- *Células de carcinoma cervical*

hES- *Human Embryonic Stem*

hNSC- *Human Neural StemCell*

hMSC- *Human Mesenchymal Stem Cell*

HGF- *Hepatocyte Growth Factor*

HSC- *Hematopoietic Stem Cell*

HUVEC- *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

IC₅₀- *Concentração Inibitória para 50% das células*

ICM- *Inner Cell Mass*

IL-6- *Interleucina 6*

IRM – *Imagem por Ressonância Magnética*

LIF- *Leukemia Inhibitory factor*

Luc- *Luciferase*

Mab- *Monoclonal antibody*

MEF- *Murine Embryonic Fibroblasts*

mES- *Murine Embryonic Stem*

MRI- *Magnetic Resonance Imaging*

MSC- *Mesenchymal Stem Cells*

MTT- *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*

NPM- Nanopartícula Magnética

NP- Nanopartícula

NGF- *Nerve Growth Factor*

MF-MNP- *Magnetic Field-Magnetic Nanoparticles*

Oct-4- *Octamer-binding transcription factor 4*

PBS- *Phosphate Buffered Saline*

pb- pares de base

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

PEG- *Poly (ethylene glycol)*

PEI- Polietilenoimina

pH- Potencial de hidrogênio

RMI - *Ressonance Magnetic Image*

RNA- *Ribonucleic Acid*

RT- *Reverse Transcription*

SRE - Sistema Retículo Endotelial

SHH- proteína *Sonic Hedgehog*

SK-MEL-37- Células de melanoma humano

SPION- *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*

SSEA- *Specific Surface Embryonic Antigen*

STAT-3- *Signal Transducer and Activator of Transcription-3*

TEM- *Transmission Electron Microscopy*

USPION- *Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Os diferentes tipos de células troncos podem ser descritos considerando os estágios iniciais da embriogênese.	2
Figura 2. Diferenciação <i>in vitro</i> de células hES.	5
Figura 3. Transferência nuclear.	8
Figura 4. Cultivo in vitro de células ES em MEF irradiado.	9
Figura 5. Vias de sinalização envolvidas na manutenção da pluripotência de células mES.	11
Figura 6. Os fatores de transcrição Oct-4 e Nanog são essenciais para manter a pluripotência e auto-renovação das células ES.	14
Figura 7. Ilustração esquemática de estratégias terapêuticas utilizando NPM.	19
Figura 8. Agente de contraste MAb-magnetita utilizado em IRM.	20
Figura 9. SentiMag™ para rastrear NPM pelo sistema linfático a partir do ponto onde foram injetadas (tumor).	21
Figura 10. Representação esquemática da separação magnética.	22
Figura 11. Magnetohipertermia utilizada no tratamento contra o câncer.	24
Figura 12. Princípio do carreamento de drogas associadas a carreadores magnéticos.	26
Figura 13. Estruturas tubulares construídas utilizando Mag-TE.	28

ARTIGO I

Figure 1. Structures of the three molecular coatings employed. (A) Lauric acid; (B) Citric acid; (C) DMSA. 35

Table 1. Physicochemical characteristics of the investigated anionic maghemite nanoparticles. 36

Figure 2. Concentration-dependent inhibition of growth in human melanoma cells by anionic maghemite nanoparticles. 37

Figure 3. Transmission electron micrographs of human SK-MEL-37 melanoma cells after 72 h incubation with anionic maghemite nanoparticles at 37°C. 38

Figure 4. Electrophoretic separation of DNA extracted from SK-MEL-37 cells treated with surface-coated anionic maghemite nanoparticles. 39

ARTIGO II

Table 1. Sequence of primers used in RT-PCR analysis. 61

Table 2. Proliferation parameters of murine embryonic stem cells cultivated in MEF feeder layer. 62

Table 3. Proliferation parameters of murine embryonic stem cells cultivated in MF-MNP system. 62

Figure 1. Magnetic field-magnetic nanoparticles system used to grow the mESCs. 63

Figure 2. Murine embryonic stem cells growing in MF-MNP system and monitored at 24 (1), 48 (2) and 72 hours (3). 64

Figure 3. Prussian blue staining of murine embryonic stem cells grown in the presence of MF-MNP system. 65

Figure 4. Transmission electron micrographs of murine embryonic stem cells grown in the presence of MF-MNP system for 72 h at 37°C and 5% CO₂. 66

Figure 5. Alkaline phosphatase staining of mESCs grown in the presence of: (A) a mytotically inactivated murine embryonic fibroblasts (positive control); (B) MF-MNP system. 67

Figure 6. RT-PCR analysis of genes associated with pluripotency. 68

ARTIGO III

Table 1. Sequence of primers used in RT-PCR analysis. 84

Figure 1. Bovine ICM isolated mechanically. 85

Figure 2. Phase contrast micrographs of bovine ES-like cells and their differentiated derivatives. 86

Figure 3. RT-PCR analysis of genes associated with pluripotency during isolation of bovine ES-like cells. 87

RESUMO

As nanopartículas magnéticas (NPM) têm sido utilizadas em inúmeras aplicações biomédicas, destacando-se no tratamento do câncer, carreamento de drogas e diagnóstico por imagem de ressonância. As células tronco embrionárias (ES), devido à sua capacidade de auto-renovação e de diferenciação em vários tipos de células, oferecem um grande potencial para sua utilização na regeneração de tecidos e em tratamentos alternativos para muitas doenças degenerativas. Os objetivos do estudo foram: i) avaliar a citotoxicidade *in vitro* de NPM de maghemita funcionalizadas com ácido láurico, DMSA e citrato em células de melanoma humano (SK-MEL-37) através de ensaio de MTT, microscopia eletrônica e eletroforese de DNA em gel de agarose; ii) desenvolver um sistema de cultura utilizando as NPM previamente selecionadas e um magneto para expandir *in vitro* células tronco embrionárias murinas (mES) na ausência de co-cultura de fibroblastos embrionários murinos (MEF) (o estado indiferenciado das células mES foi analisado por citoquímica para fosfatase alcalina, por microscopia eletrônica e análise da expressão de genes Oct-4 e Nanog por RT-PCR); iii) isolar e expandir células ES a partir de blastocistos bovinos, e caracterizar a sua pluripotência por meio da análise da expressão dos genes Oct-4 e STAT-3 por RT-PCR. As NPM revestidas com ácido láurico, citrato e DMSA não apresentaram citotoxicidade, a julgar pelos altos valores de IC₅₀ encontrados (254, 433 e 2260 µg de ferro/mL, respectivamente), sendo que as nanopartículas revestidas com citrato foram as escolhidas para serem utilizadas como suporte para expandir as células mES. O tempo de duplicação para as células cultivadas na presença da NPM foi ligeiramente maior do que na presença com co-cultura de MEF ($20,67 \pm 0,19$ vs. $15,95 \pm 0,21$) ($p = 0,001$). A morfologia das células mES cultivadas na presença da NPM foi semelhante à de células ES, sendo que, a sua pluripotência foi confirmada pela expressão dos marcadores de indiferenciação Oct-4 e Nanog por RT-PCR e da alta atividade de fosfatase alcalina. Uma linhagem de células tronco embrionárias bovinas (bES) foi obtida e mantida por seis subcultivos por período de 60 dias. A pluripotência das células bES foi confirmada morfológicamente, bem como pela expressão dos genes do estado indiferenciado Oct-4 e STAT-3.

Palavras-chave: Células tronco embrionárias; Nanopartículas magnéticas; Pluripotência

ABSTRACT

Magnetic nanoparticles (MNPs) have been used in a great variety of biomedical applications, especially in cancer treatment, drug delivery, and diagnosis by magnetic resonance imaging. Embryonic stem cells (ESCs), due to its capacity of auto-renewal and differentiation in some types of cells, offer a great potential for its use in tissue regeneration and in alternative treatments for many degenerative diseases. The study had as aims: i) to evaluate in vitro cytotoxicity of maghemite nanoparticles functionalized with lauric acid, DMSA, and citrate in human melanoma cells (SK-MEL-37) by the MTT assay, electronic microscopy, and DNA electroforesis by agarose gel; ii) to develop a culture system using the previously selected MNPs and a magnet to expand in vitro murine embryonic stem cells (mESCs) in the absence of a co-culture of murine embryonic fibroblasts (MEF) (the indifferentiated state of the mES was analyzed by alkaline phosphatase cytochemistry, electronic microscopy, and analysis of Oct-4 and Nanog gene expression by RT-PCR); iii) to isolate and expand ESCs from bovine blastocysts, and to characterize its pluripotency by analysis of Oct-4 and STAT-3 gene expression by RT-PCR. The MNPs coated with lauric acid, citrate, and DMSA showed no cytotoxicity, judging by the high values of IC_{50} found (254, 433 and 2260 $\mu\text{g-iron/ml}$, respectively), and that the nanoparticles coated with citrate was chosen to expand the mESCs. The doubling time for the cells cultivated in the presence of MNPs was slightly higher than in the presence of MEF (20.67 ± 0.19 vs. 15.95 ± 0.21) ($p= 0.001$). The mESCs cultivated in the presence of MNPs showed morphology similar to ESCs, and its pluripotency was confirmed by expression of indifferentiation markers Oct-4 and Nanog by RT-PCR and high alkaline phosphatase activity. One bovine embryonic stem cell (bESCs) line was obtained and maintained by six subcultures for 60 days period. The pluripotency of the bESCs was confirmed morphologically as well as by Oct-4 e STAT-3 gene expression.

Keywords: Embryonic stem cells; Magnetic nanoparticles; Pluripotency

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células tronco

As células tronco são células que podem se dividir indefinidamente, produzindo populações idênticas à anterior, podem também sofrer divisão assimétrica e dar origem a duas linhagens celulares, uma idêntica à parental e outra que contém diferentes instruções genéticas, que se caracterizam por uma capacidade proliferativa e potencial de desenvolvimento menores que o da célula original (FISCHBACH & FISCHBACH, 2004).

Os diferentes tipos de células tronco podem ser descritos considerando os estágios iniciais da embriogênese. Logo após a fertilização, o zigoto sofre várias divisões alcançando o estágio de mórula. As células da mórula são totipotentes, podendo dar origem a todos os tipos de tecidos do embrião, inclusive tecidos extraembrionários. Conforme a mórula percorre a trompa uterina para alcançar o útero, ela sofre uma nova divisão, alcançando o estágio de blastocisto, o qual é composto de células na parte externa (trofoblasto) e células na parte interna (*inner cell mass* – ICM). As células da ICM são pluripotentes, ou seja, podem originar todos os tipos de tecidos, com exceção dos anexos embrionários. Após a implantação do blastocisto no útero, ele sofre invaginações (gastrulação) resultando na formação das três camadas germinativas do embrião desenvolvido: ectoderme (neurônios, pele, etc), endoderme (hepatócitos, células sanguíneas, células beta pancreáticas, etc) e mesoderme (músculos, ossos, sistema circulatório, etc). As células tronco presentes em cada uma das três camadas germinativas possuem capacidade de diferenciação menor que o das células tronco derivadas da ICM, portanto são denominadas de multipotentes, ou seja, podem se diferenciar somente em células de um determinado tecido ou linhagem germinativa (Fig. 1) (FISCHBACH & FISCHBACH, 2004; BISWAS & HUTCHINS, 2007).

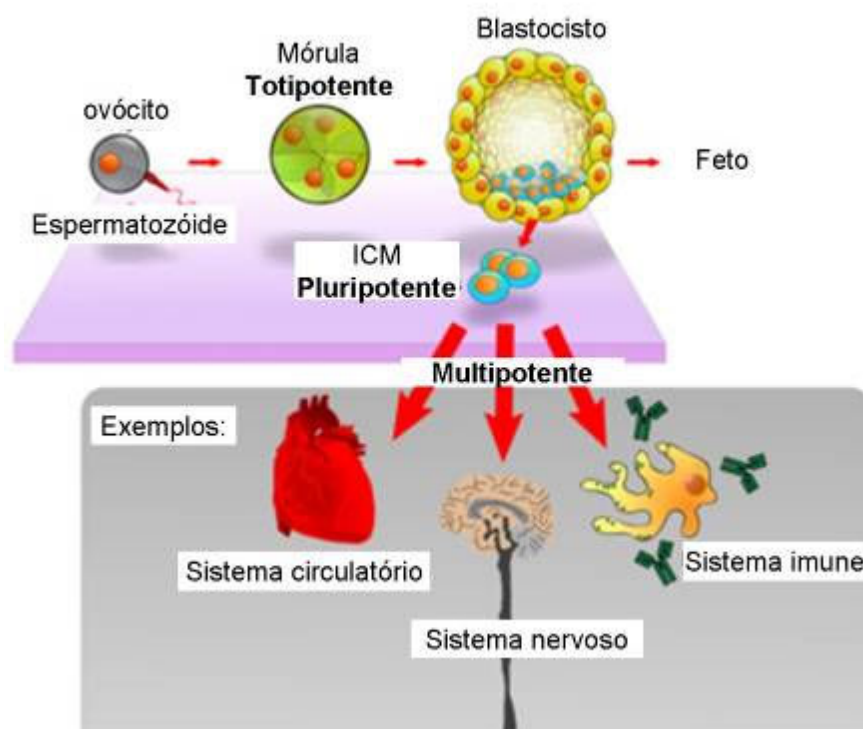


Figura 1. Os diferentes tipos de células troncos podem ser descritos considerando os estágios iniciais da embriogênese. No estágio de mórula as células são totipotentes, uma vez que podem gerar um organismo complexo. Quando o embrião alcança o estágio de blastocisto, ele contém a massa interna de células que são pluripotentes podendo formar todos os tecidos do feto excluindo a placenta. Quando o blastocisto chega ao útero ele sofre invaginações originando as três camadas germinativas: ectoderme, endoderme e mesoderme, as células das três camadas germinativas são multipotentes, ou seja, podem diferenciar somente em células de um determinado tecido ou linhagem germinativa. (Modificado de - http://www.prolifelouisiana.org/uploads/images/Stem_cells_diagram.png – em 20 de abril de 2009).

As células tronco podem ainda ser classificadas de acordo com a sua natureza em células tronco embrionárias (*embryonic stem* – ES) e células tronco adultas ou somáticas. As células tronco adultas são células indiferenciadas que ocorrem em tecidos diferenciados. Essas células se auto-renovam e tornam-se especializadas para originar o tecido no qual ela reside (HOLTZER, 1978). Células tronco adultas tem sido isoladas a partir de vários tecidos, tais como, tecido nervoso (REYNOLDS & WEISS, 1992), tecido hematopoiético (JIANG et al., 2002) e epitelial (TOMA et al., 2001). As células tronco adultas mais extensivamente estudadas são as células tronco hematopoiéticas (HSC - *hematopoietic stem cell*), devido ao conhecimento de uma variedade de marcadores genéticos e de superfície para essas células, que permitem delinear os vários estágios de sua diferenciação durante a hematopoiese. Essas

células podem se auto-renovar e diferenciar em diferentes tipos de células sanguíneas, que ao serem transplantadas repopulam o sistema hematopoiético (BHATIA et al., 1997).

Embora as células tronco adultas tenham um grande potencial de aplicação, elas possuem algumas limitações como: i) não possuem a mesma capacidade de proliferação e desenvolvimento que as células tronco embrionárias, ii) número limitado de gerações em cultura e iii) podem acumular mutações genéticas inviabilizando o seu uso terapêutico (WOBUS, 2001).

1.2 Células tronco embrionárias

As células tronco embrionárias são células indiferenciadas, derivadas da ICM de blastocistos, que tem como característica principal a pluripotência (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). As células ES, quando reintroduzidas em um blastocisto, possuem a capacidade de retomar o desenvolvimento normal, diferenciando-se nos diferentes tecidos do embrião, inclusive em linhagem germinativa (BRADLEY et al., 1984; SMITH, 2001).

Essas células quando cultivadas em condições específicas, podem ser mantidas em seu estado indiferenciado ou podem ser induzidas a iniciar um programa de diferenciação *in vivo* ou *in vitro*. Para a diferenciação *in vivo* as células ES podem ser introduzidas em camundongos imunodeficientes para formar teratomas benignos, constituídos por células das três camadas germinativas (AMIT et al., 2000). Na diferenciação *in vitro*, as células ES são removidas da monocamada celular e cultivadas em suspensão para formar agregados de células em 3D denominados de corpos embrióides (EB), os quais contêm células da mesoderme, ectoderme e endoderme (ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000)

Evans & Kaufman (1981) foram os primeiros a estabelecer e manter indefinidamente em laboratório células tronco derivadas de embriões de camundongo, e subsequentemente foram estabelecidas células tronco embrionárias de vários outros animais como: ovelha

(NOTARIANNI et al., 1991), coelho (SCHOONJANS et al., 1996), suíno (NOTARIANNI et al., 1990), macaco (THOMSON et al., 1995) e bovino (EVANS et al., 1990).

As células tronco embrionárias humanas (hES) foram isoladas pela primeira vez somente em 1998 por Thomson et al. (1998). Essas células, ao serem injetadas em camundongos imunodeficientes formaram teratomas, que continham tecido ósseo, cartilaginoso e muscular (mesoderme), tecido do epitélio intestinal (endoderme), neural e epitelial (ectoderme) (THOMSON et al., 1998). Esses resultados despertaram um grande interesse na comunidade médica e científica mundial, devido ao enorme potencial de aplicação das células hES no campo da medicina regenerativa e no tratamento alternativo para várias doenças neurodegenerativas (GERECHT-NIR & ITSKOVITZ-ELDOR, 2004; HOU & HONG, 2008).

Para a aplicação terapêutica, células específicas funcionais podem ser obtidas tanto *in vitro* como *in vivo* a partir de células ES. Porém, a maioria dos estudos tem utilizado métodos de diferenciação *in vitro* através da formação de EB. Esse método permite estudos mais detalhados dos mecanismos de diferenciação para gerar tipos específicos de células para uma determinada aplicação (CZYZ et al., 2003; HOFFMAN & CARPENTER, 2005).

Para formar EB, as células ES são cultivadas em suspensão na ausência de monocamada celular e de fatores responsáveis pela auto-renovação. Após formação dos EBs, estes são induzidos a diferenciar em uma célula especializada pela adição de fatores de crescimento apropriados, tais como: activina-A (capaz de induzir a diferenciação apenas em mesoderme), ácido retinóico (AR), proteína morfogenética óssea (BMP-4) e o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (capazes de induzir a diferenciação em ectoderme e mesoderme), enquanto que o fator de crescimento neuronal (NGF) e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) promovem a diferenciação em células das três camadas germinativas (Fig 2 A-B) (SCHULDINER et al., 2000).

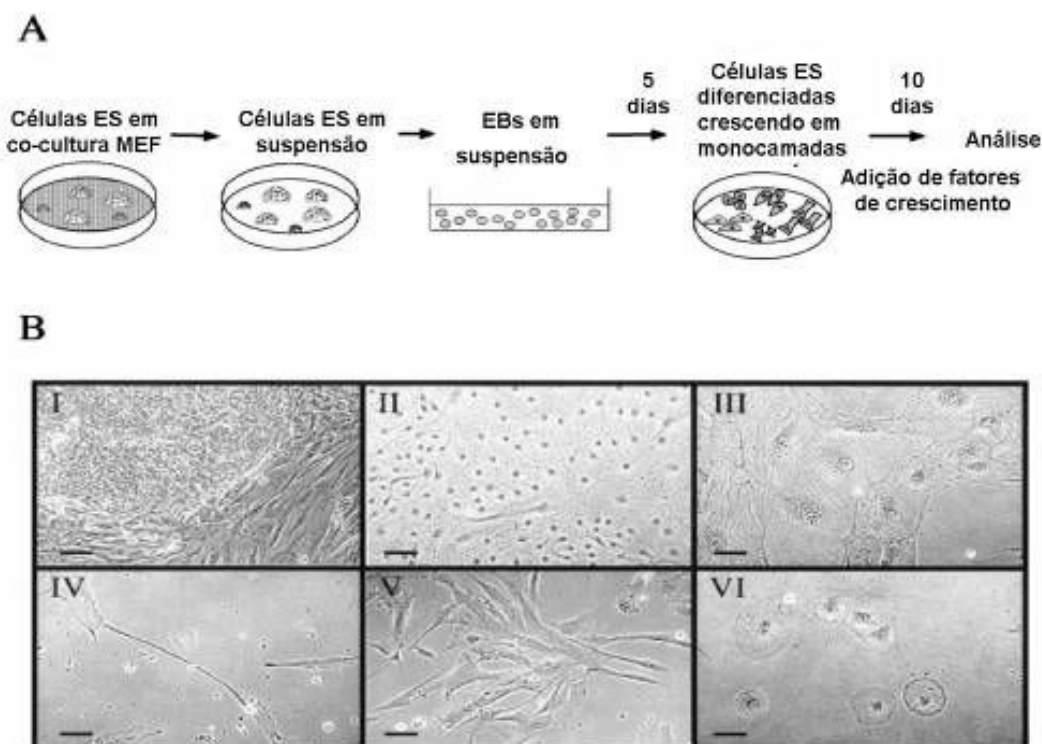


Figura 2. Diferenciação *in vitro* de células hES. (A) Representação esquemática do protocolo de diferenciação. (B) Morfologia de células hES antes e após a indução de diferenciação: (I) colônia de células hES em co-cultura de fibroblastos embrionários (MEF); (II-VI) células diferenciadas *in vitro* na presença de HGF, activina-A, AR, bFGF e BMP-4, respectivamente. (Modificado de Schuldiner et al., 2000).

Os estudos de diferenciação *in vitro* de células ES têm como foco a obtenção de células com potencial terapêutico tais como: cardiomiócitos, para o tratamento de doenças cardíacas (BOHELER et al., 2002), células neuronais e da glia, para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos como a doença de Parkinson (KIM et al., 2002) e células pancreáticas produtoras de insulina para o Diabetes Mellito (SORIA et al., 2001).

Assim, vários grupos de pesquisadores têm reportado com sucesso a diferenciação *in vitro* de células tronco embrionárias murinas (mES) e células tronco embrionárias humanas (hES) em subtipos específicos de neurônios (CARPENTER et al., 2001; REUBINOFF et al., 2001; WICHTERLE et al., 2002; KIM et al., 2002). Dentre os vários métodos utilizados para diferenciar células ES em neurônios, destacam-se os estudos realizados por Kim et al., 2002 e Wichterle et al., 2002. Em ambos os estudos foram utilizados fatores de crescimento que regulam o desenvolvimento neuronal durante a embriogênese. Kim et al. (2002) utilizaram a

proteína *sonic hedgehog* (SHH) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF8) para dirigir a diferenciação das células mES em neurônios dopaminérgicos positivos para tirosina hidroxilase. O transplante desses neurônios dopaminérgicos foi funcional em camundongos com a doença de Parkinson. No estudo realizado por Wichterle et al. (2002), células mES foram expostas ao ácido retinóico para a diferenciação em ectoderma seguido pela exposição à proteína *sonic hedgehog*, para induzir a formação de neurônios motores. Estas células, quando injetadas na coluna espinhal de embriões de galinhas, formaram sinapses em músculos alvos. Em adição, neurônios motores também foram obtidos a partir de células hES. Li et al. (2005) obtiveram neurônios motores pela exposição de células hES ao ácido retinóico e proteína *sonic hedgehog*.

De acordo com a literatura, neurônios motores funcionais obtidos a partir da diferenciação de células hES poderão ser utilizados na substituição de neurônios motores em pacientes com doenças neuromotoras ou que sofreram injúrias na coluna espinhal, como também para o *screening* farmacêutico, tendo como alvo doenças como a esclerose amiotrófica lateral (LI et al., 2005).

Outros grupos de pesquisadores têm investigado o potencial das células ES na diferenciação *in vitro* em cardiomiócitos (WOBUS et al., 1997; XU et al., 2002; MUMMERY et al., 2003; KAWAI et al., 2004). Para induzir a diferenciação de células ES em cardiomiócitos têm sido utilizados o ácido retinóico (WOBUS et al., 1997), o ácido ascórbico (TAKAHASHI et al., 2003) e a oxitocina (PASSIER et al., 2005). Durante a diferenciação *in vitro*, os cardiomiócitos formados a partir de corpos embrióides expressam proteínas, receptores e genes específicos do tecido cardíaco, e apresentam vias de transdução de sinal semelhantes às observadas durante a cardiomiogênese *in vivo* (HESCHELER et al., 1997; BOHELER et al., 2002). Estudos têm sugerido que os cardiomiócitos diferenciados são típicos do miocárdio primário e que subsequentemente se diferenciam em átrio, ventrículo e

fibras de Purkinje (HESCHELER et al., 1997). Os cardiomiócitos obtidos a partir da diferenciação de células hES também demonstraram estrutura molecular e eletrofisiologia, além de propriedades contráteis, esperadas para o miocárdio (MUMMERY et al., 2003).

Estudos também demonstraram a formação de células β pancreáticas secretando insulina através de diferenciação de células mES. Shi et al. (2005) desenvolveram um protocolo de diferenciação baseado na combinação de activina-A e ácido retinóico para induzir a diferenciação *in vitro* de células mES em células com capacidade de produzir insulina. O transplante dessas células em camundongos diabéticos foi suficiente para normalizar os níveis de glicose no sangue.

Contudo, é necessário ainda, elucidar vários aspectos da biologia das células ES, para entender melhor como ocorrem os mecanismos de diferenciação, garantindo uma maior segurança na sua aplicação em terapias celulares.

1.2.1 Isolamento, expansão e sistemas de cultura para células tronco embrionárias

As células tronco embrionárias são isoladas da ICM de blastocistos produzidos por fertilização *in vitro* (THOMSON et al., 1998; KIM et al., 2005) ou de blastocistos obtidos por transferência nuclear (NT). A técnica de NT consiste em transferir o núcleo de uma célula somática para um ovócito anucleado (Fig. 3), e tem sido realizada com sucesso para obtenção de células ES de bovino e ovelha (WILMUT et al., 1997; SAITO et al., 2003).

A ICM pode ser isolada por imunocirurgia ou remoção mecânica. A imunocirurgia consiste em incubar o blastocisto com: i) enzima proteolítica, para a remoção da zona pelúcida; ii) anticorpo específico, que se liga ao trofoblasto e iii) finalmente com complemento. A reação anticorpo-complemento provoca a lise das células do trofoblasto (TE) liberando a ICM (SOLTER & KNOWLES, 1975; KIM et al., 2005). A remoção mecânica consiste em fazer uma incisão no blastocisto para a retirada da ICM empregando-se uma

micropipeta (STROM et al., 2007). O isolamento mecânico é mais vantajoso, uma vez que não há o contato do blastocisto com anticorpos de origem animal. Porém, existe a possibilidade das células do trofoblasto não serem totalmente removidas mecanicamente, comprometendo o crescimento das células da ICM (PICKERING et al., 2003).

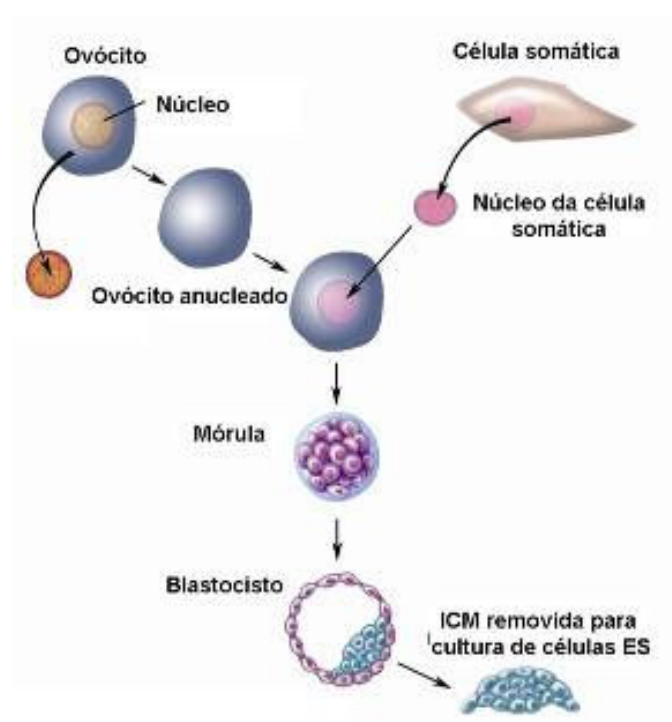


Figura 3. Transferência nuclear. O ovócito de um doador é anucleado, o núcleo de uma célula somática é inserido. Após o embrião alcançar o estágio de blastocisto as células da ICM são removidas para obtenção das células ES. (Modificado de - <http://www.dels.nas.edu/bls/stemcells/images/Nuclear-Transfer-Download.JPG> – em 25 de abril de 2009)

Dependendo da qualidade do blastocisto, pode não ser possível a distinção da ICM, dificultando o isolamento tanto por imunocirurgia como por remoção mecânica. Nesse caso o isolamento das células ES pode ser realizado por explante (KIM et al., 2005). Para o explante, o blastocisto é previamente submetido ao tratamento com uma enzima proteolítica para remoção apenas da zona pelúcida, possibilitando assim a adesão e o desenvolvimento da ICM

em um sistema de cultura, como por exemplo, monocamada de fibroblastos embrionários murinos (MEF).

Uma vez isoladas, as células ES são expandidas para o estabelecimento e caracterização de uma linhagem celular. O mecanismo pelo qual as células ES podem ser cultivadas enquanto mantêm o seu potencial de diferenciação em cultura (pluripotência) não foi totalmente elucidado. O método padrão utilizado para expandir células tronco embrionárias murinas consiste na utilização de co-cultura de fibroblastos embrionários murinos (MEFs) irradiados ou mitoticamente inativados e o uso de meio enriquecido com soro fetal (Fig. 4) (EVANS & KAUFMAN, 1981; BRYJA et al., 2006).

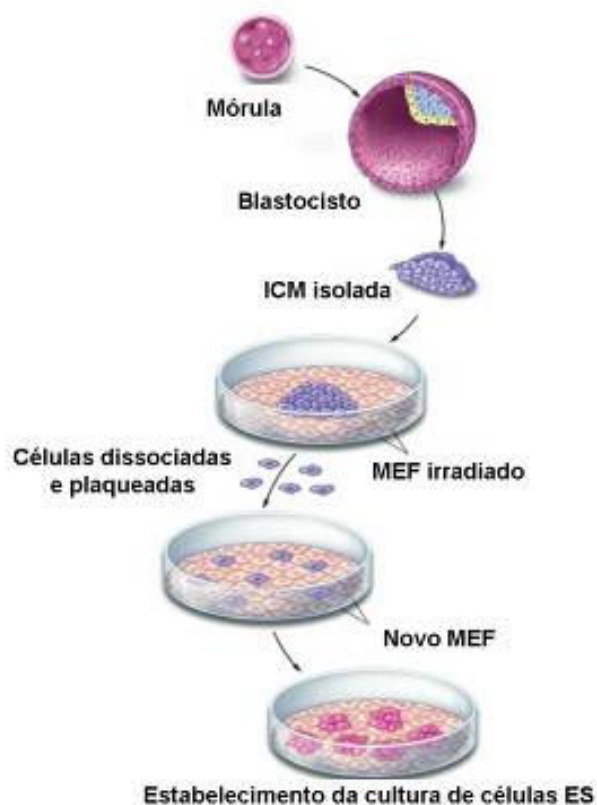


Figura 4. Cultivo *in vitro* de células ES em MEF irradiado. A partir da ICM isolada de embrião no estágio de blastocisto as células ES crescem na presença de MEF irradiado. (Modificado de - <http://stemcells.nih.gov/StaticResources/info/scireport/images/figurec1.jpg> – em 28 de abril de 2009).

As células ES crescem sobre a monocamada de fibroblastos (*feeder layer*) na forma de colônias, que posteriormente são subcultivadas. Para o subcultivo, as colônias são dissociadas enzimaticamente com tripsina para obter células individuais que são plaqueadas sobre a monocamada de MEF. Esse protocolo também tem sido utilizado para outros tipos de células ES, podendo apresentar algumas modificações como, por exemplo, para o cultivo de células tronco embrionárias humanas, tem se utilizado com frequência a dissociação mecânica das colônias em substituição ao uso de tripsina (HWANG et al., 2004; OH et al., 2005), possibilitando a transferência seletiva de células hES não diferenciadas.

Como mencionado previamente, o protocolo padrão para a expansão de células ES consiste na utilização de co-cultura de MEF. O MEF é necessário porque os fibroblastos fornecem o fator de inibição de leucemia (LIF), que é crítico para promover a auto-renovação e impedir a diferenciação das células ES (WILLIAMS et al., 1988; SMITH et al., 1988).

O LIF é uma glicoproteína solúvel da família de citocinas IL-6, que exerce sua função ao se ligar ao receptor LIFR e a proteína gp130, formando um heterodímero e induzindo a ativação de JAK (proteína tirosina cinase da família Janus cinase), a qual ativa a proteína STAT3 (Sinal transdução e ativador transcricional) permitindo assim a manutenção das células ES no estado indiferenciado (BOEUF et al., 1997; NIWA et al., 1998). Em adição, o heterodímero LIFR-gp130 também induz a associação de SHP-2 (tirosina fosfatase) e da proteína adaptadora Gab1 com ativação de ERK (proteína regulada por sinais extracelulares), levando a diferenciação das células ES (BURDON et al., 2002; BOIANI & SCHOLER, 2005). Desta forma, o equilíbrio entre a ativação de STAT3 e a inibição de ERK por PI3K (fosfoinosítídeo cinase), permite que as células ES continuem proliferando em cultura sem apresentar diferenciação (Fig. 5) (DARR & BENVENISTY, 2006).

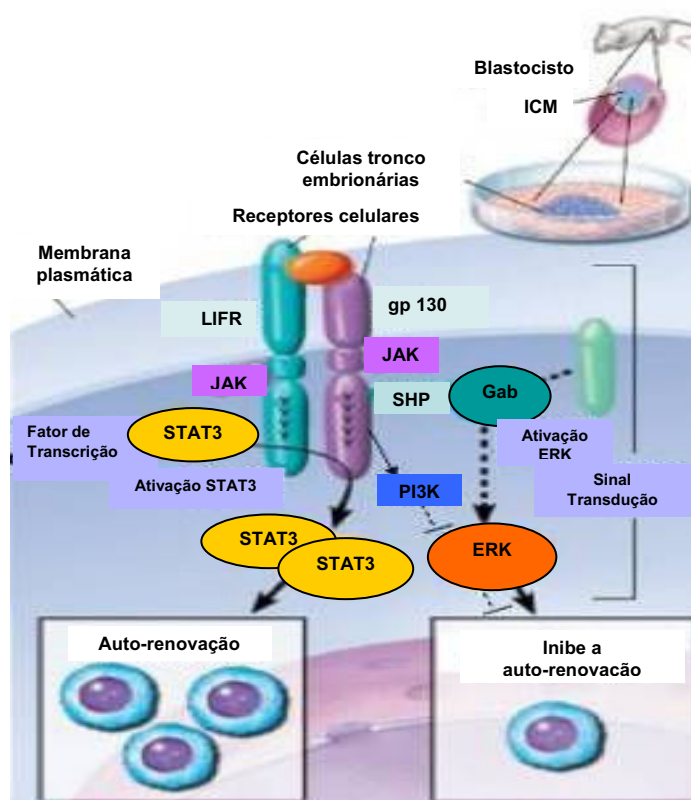


Figura 5. Vias de sinalização envolvidas na manutenção da pluripotência de células mES (Modificado de - <http://stemcells.nih.gov/StaticResources/info/scireport/images/figureb2.jpg> - em 06 de julho de 2009).

De acordo com a literatura a adição de LIF ao meio de cultura pode manter as células mES em um estado não diferenciado, o que permite a não utilização de monocamada de MEF (WILLIAMS et al., 1988; SMITH et al., 1988). Porém, essa citocina não é suficiente para manter a pluripotência de células hES cultivadas na ausência de MEF (THOMSON et al., 1998; AMIT et al., 2000; CARPENTER et al., 2003). A razão para isso não é bem clara, mas alguns pesquisadores atribuem esse fato a uma baixa ativação da via STAT3 em células humanas (SATO et al., 2004). Outros sugerem que possa ser devido a ausência ou ao baixo nível de expressão dos componentes da via de ativação por LIF (RICHARDS et al., 2004; GINIS et al., 2004).

O uso de monocamada de MEF para a manutenção e proliferação das células hES não é desejável, pois compromete a aplicação clínica dessas células, uma vez que pode ocorrer a transmissão de patógenos animais (ULLOA-MONTOYA et al., 2005). Vários estudos têm

como objetivo eliminar o uso de monocamada de MEF substituindo-a por uma monocamada de células humanas obtidas a partir de fibroblastos embrionários (LEE et al., 2004) ou monocamada de células uterinas endometriais adultas (LEE et al., 2005), entre outras. A utilização de células humanas como suporte elimina a possibilidade de transferência de patógenos murinos para o homem, mas não a possibilidade de transferir patógenos humanos para humanos.

É cada vez mais crescente a necessidade de expandir as células ES na ausência de uma monocamada celular. Vários estudos têm utilizado Matrigel™ ou laminina na presença de meio condicionado em MEF contendo o fator de crescimento bFGF como sistema de cultura (XU et al., 2001). Embora esse sistema elimine o contato direto de células hES com os fibroblastos, ele não elimina a possibilidade de contaminação por patógenos animais que podem ser introduzidos na cultura através do meio condicionado em fibroblastos.

Pesquisadores também têm utilizado biorreatores para expandir e/ou diferenciar células tronco embrionárias em grande escala (FOK & ZANDSTRA, 2005; CORMIER et al., 2006; ABRANCHES et al., 2007; ZUR NIEDEN et al., 2007; FERNANDES et al., 2009). A expansão de células mES indiferenciadas pode ser realizada em um biorreator, uma vez que, a monocamada celular e o meio condicionado não são necessários na presença de LIF. Em estudos recentes utilizando biorreator com agitação, as células mES foram cultivadas em suspensão formando agregados ou em microcarreadores, sendo que, após expansão, as células mES expressavam marcadores de indiferenciação e a habilidade para formar corpos embrióides (CORMIER et al., 2006; ABRANCHES et al., 2007). Mas, a expansão de células hES no estado indiferenciado através de um biorreator se torna mais difícil, porque as células hES necessitam de monocamada celular ou meio condicionado, mesmo na presença de LIF. Recentemente, Fernandes et al. (2009) utilizaram um biorreator com agitação para expandir células hES na presença de meio condicionado em MEF e microcarreadores baseados em

dextrana cobertos com colágeno, obtendo uma grande concentração de células no estado indiferenciado. Porém, como já mencionado a presença de meio condicionado em MEF inviabiliza a utilização das células hES em aplicações terapêuticas.

Recentemente, um método novo foi utilizado para expandir células tronco mesenquimais na ausência de MEF e meio condicionado em MEF. O método consiste em adicionar nanopartículas magnéticas a um meio de cultura enriquecido com soro fetal e LIF. Nesse meio as células se ligam às nanopartículas e aderem à superfície do frasco ou placa de cultura, devido à aplicação de um campo magnético externo, podendo desta forma expandir-se sem o risco de contaminação por patógenos e manter-se em um estado indiferenciado (ITO et al., 2004a).

1.2.2 Propriedades das células tronco embrionárias e caracterização da pluripotência

As células ES indiferenciadas são caracterizadas por apresentarem as seguintes propriedades: (i) a capacidade de se auto-renovar indefinidamente, (ii) a capacidade para diferenciar em células somáticas, (iii) alta atividade de fosfatase alcalina, (iv) expressão de antígenos embrionários estágio-específicos como o SSEA-1, (v) expressão do fator de transcrição de linhagem germinativa Oct-4, (vi) grande núcleo em relação ao raio citoplasmático, (vii) alta atividade de telomerase e (viii) regulação da auto-renovação por citocinas da família de IL-6 (interleucina 6) (WOBUS, 2001; NIWA et al., 1998; PESCE et al., 1999; BURDON et al., 1999; PRELLE et al., 1999; VASSILIEVA et al., 2000). Assim, as pesquisas são direcionadas para a identificação e caracterização desses fatores que regulam a auto-renovação e diferenciação das células ES.

A pluripotência para células mES pode ser caracterizada pela expressão de certos marcadores, como antígenos de superfície (SSEA-1; SOLTER & KNOWLES, 1978), receptores de membrana (gp 130; NIWA et al., 1998), atividade enzimática como a fosfatase

alcalina (ALP; WOBUS et al., 1984) e telomerase (PRELLE et al., 1999) e fatores de transcrição, como o Oct-4 (SCHOLER et al., 1989).

A recente identificação do fator de transcrição Nanog (CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003) possibilitou uma nova visão nas vias de sinalização Oct-4, LIF/STAT3 para a regulação da pluripotência das células ES. Chambers et al. (2003) e Mitsui et al. (2003) demonstraram que uma alta expressão de Nanog em conjunto com a ativação de LIF/STAT3 mantém a auto-renovação das células ES. Outro fato observado foi que a alta expressão de Nanog não afetou a auto-renovação das células ES pela ativação de STAT3 e vice-versa, indicando que Nanog e STAT3 atuam independentemente. Além disso, Nanog e Oct-4 trabalham juntos para manter a pluripotência e auto-renovação das células ES. Esta conclusão foi baseada em duas observações: i) Nanog foi expresso em embriões Oct-4-deficientes e ii) a alta expressão de Nanog não pode reverter o programa de diferenciação induzido pela baixa regulação de Oct-4 em células ES (Fig. 6).

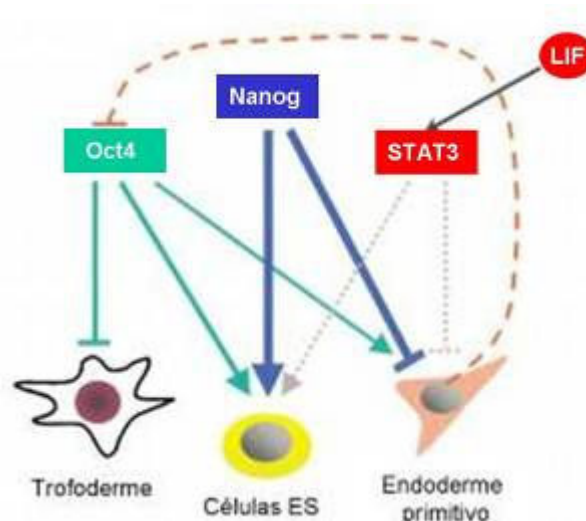


Figura 6. Os fatores de transcrição Oct-4 e Nanog são essenciais para manter a pluripotência e auto-renovação das células ES. Porém, uma alta expressão de Oct-4 resulta na diferenciação das células ES em endoderme primitivo, enquanto que, uma alta expressão de Nanog induz a uma auto-renovação das células ES independentemente de LIF. A sinalização de Oct-4 e Nanog inibem a diferenciação em trofoderme e em endoderme primitivo, respectivamente (Modificado de Chambers et al., 2003).

Os marcadores para células tronco embrionárias humanas também apresentam algumas características fundamentais da linhagem murina, tais como a expressão de Oct-4 e atividade de telomerase (THOMSON et al., 1998). Ao contrário das células mES, as células hES apresentam como marcadores as proteoglicanas TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM-2 e os antígenos embrionários estágio-específicos SSEA-3, SSEA-4, os quais estão ausentes em células mES. A identificação desses marcadores, tanto para mES quanto para hES, tem sido importante para monitorar e quantificar a pluripotência de células ES submetidas a diferentes condições de cultura (ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000; REUBINOFF et al., 2000).

A manutenção *in vitro* das células ES no estado indiferenciado pode ser monitorada através de sua morfologia típica. Essas células apresentam uma alta razão núcleo/citoplasma e proeminente nucléolo, formando colônias compactas com bordas bem delineadas. As colônias formadas pelas células hES são achatadas enquanto que as colônias de células mES são esféricas (THOMSON et al., 1998; AMIT & ITSKOVITZ-ELDOR, 2002).

Uma vez que as células mES diferem das células hES na expressão de alguns marcadores para pluripotência, células tronco embrionárias têm sido isoladas de várias espécies de animais domésticos, na tentativa de se obter um modelo mais aproximado ao humano. As células tronco embrionárias bovinas (bES) podem oferecer algumas vantagens em relação as células mES, uma vez que o modelo bovino é imunologicamente e fisiologicamente mais semelhante ao humano (GJORRET & MADDOX-HYTTEL, 2005) e a obtenção de seus embriões é de fácil acesso, uma vez que os métodos de obtenção estão bem estabelecidos e fazem parte da rotina de empresas que trabalham com fertilização *in vitro* e transferência de embriões.

Células tronco embrionárias bovinas têm sido derivadas de embriões em estágio de blastocisto (STICE et al., 1996; SAITO et al., 2003). Para expansão das células bES *in vitro*, diferentes monocamadas celulares tem sido utilizadas como suporte, como células da

granulosa ou fibroblastos fetais, na presença de meio de cultura suplementado com LIF. As células bES possuem capacidade de proliferação *in vitro* e apresentam características morfológicas semelhantes à das células hES, como uma alta razão núcleo/citoplasma, colônias achatadas, que podem crescer como monocamadas, com delimitação ou não nas suas bordas (MITALIPOVA et al., 2001; GJORRET & MADDOX-HYTTEL, 2005).

Em adição às características morfológicas, as células bES expressam o fator de transcrição Oct-4 que é um regulador chave de sua pluripotência (VAN EIJK et al., 1999; YADAV et al., 2005), também expressam o antígeno embrionário estágio-específico, SSEA-1 (SAITO et al., 2003), embora resultados conflitantes tenham sido obtidos em relação à expressão de SSEA-3 e SSEA-4 (MITALIPOVA et al., 2001; SAITO et al., 2003). A presença de telomerase também tem sido observada em células bES (BETTS et al., 2001). Porém, a atividade da fosfatase alcalina é vista como variável em cultura de células bES (STICE et al., 1996; STRELCHENKO e al., 1995), não sendo portanto, um bom marcador para essas células, como é para as células mES.

De acordo com a literatura, as células bES quando cultivadas de acordo com a metodologia padrão para células ES, não suportam uma proliferação por um período prolongado de tempo, sem que ocorra a diferenciação (PRELLE et al., 1999; YADAV et al., 2005). Portanto, em relação as células tronco embrionárias bovinas, são necessários mais estudos para que se possa determinar quais os fatores críticos para a manutenção da sua pluripotência *in vitro*.

1.3 Células tronco e nanobiotecnologia

As várias possibilidades de aplicação da nanobiotecnologia na área biomédica surgiram como uma grande promessa para o transplante de células tronco, bem como para o

desenvolvimento de novos métodos de expansão e diferenciação *in vitro* dessas células. (SILVA et al., 2004; ITO et al., 2004a; FERREIRA et al., 2008).

O termo nanobiotecnologia se refere ao desenvolvimento de tecnologia na área de materiais nanoestruturados voltados para a aplicação biomédico-médica. As nanopartículas, por exemplo, podem ser utilizadas: i) para o rastreamento não invasivo de células tronco e células progenitoras transplantadas *in vivo*, ii) em sistemas entregadores de células tronco, aumentando a sobrevivência das células transplantadas através da liberação de biomoléculas importantes, iii) em suportes que forneçam condições para a expansão e diferenciação das células tronco e iv) como entregadores intracelulares de DNA, proteínas e de drogas para a diferenciação das células tronco (MOGHIMI et al., 2005; DERDA et al., 2007; FERREIRA et al., 2008).

Dentre a classe das nanopartículas, as nanopartículas magnéticas têm ganhado destaque não só pela sua aplicação em terapias com células tronco, mas devido a sua potencialidade de aplicação na área biomédica como um todo (GUPTA & GUPTA, 2005; ITO et al., 2005a; TARTAJ et al., 2003).

1.4 Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

As nanopartículas magnéticas podem ser à base de compostos de óxidos de ferro, tais como a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), as quais são relativamente seguras e atualmente utilizadas em clínicas como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética (IRM) (DOBSON, 2006).

Tanto a magnetita, como sua forma oxidada, a maghemita, quando dispersas em suspensões coloidais, constituem os fluídos magnéticos ou ferrofluidos, que são sistemas magnéticos coloidais de nanopartículas magnéticas dispersas em um solvente. O tamanho das NPM e seu comportamento magnético no fluído permitem que as mesmas permaneçam em

suspensão quando administradas, podendo desta forma ser guiadas por um campo magnético externo (TARTAJ et al., 2003). A propriedade de superparamagnetismo, apresentada pelas NPM possibilitam inúmeras aplicações *in vivo*, uma vez que elas não retêm nenhum magnetismo após a remoção do campo magnético (TARTAJ et al., 2003).

Para emprego na área biomédica, as NPM devem atravessar a barreira endotelial e se acumular especificamente nas células-alvo, sem dano às células vizinhas. Esta característica podem ser atingida por meio da funcionalização das partículas com um material biologicamente ativo (ZHANG et al., 2002), possibilitando numerosas aplicações biomédicas como: i) agente de contraste em IRM, ii) marcação e separação celular, iii) hipertermia, iv) carreadores de drogas, v) magnetofecção e vi) reparo de tecidos (Fig. 7) (PANKHURST et al., 2003; TARTAJ et al., 2003; BERRY & CURTIS, 2003; ITO et al., 2004a; GUPTA & GUPTA, 2005; ITO et al., 2005a).

i) IRM – a ressonância magnética tem assumido grande importância em relação a outras técnicas de obtenção de imagem. Baseado na absorção de radiofrequência pelos prótons (H^+) presentes na água dos diferentes tecidos sob o efeito de um potente campo magnético, a técnica fornece uma imagem das estruturas anatômicas, as quais podem ser mais bem destacadas pelo uso de agentes de contraste (LOK, 2001; SAFARIK & SAFARIKOVA, 2002). Embora, os agentes de contraste mais utilizados sejam compostos de gadolínio (Gd), eles não são específicos e podem ser tóxicos ao organismo (BERRY & CURTIS, 2003; BUDDE & FRANK, 2009).

As NPM representam uma classe alternativa de agentes de contraste para IRM, com vantagens do ponto de vista físico, pois destacam ainda mais o comportamento dos prótons de diferentes tecidos (HALAVAARA et al., 2002). Essas NPM alteram a forma na qual os prótons passam do seu estado excitado para um estado menos excitado. Assim, regiões

contendo NPM aparecem mais escuras em IRM que regiões sem as NPM (SAFARIK & SAFARIKOVA, 2002). A técnica de IRM utilizando NPM é empregada em órgãos cuja capacidade de retenção de NPM já foi demonstrada, como fígado, baço e linfonodo (BULTE & KRAITCHMAN, 2004; RUSSEL & ANZAI, 2007).

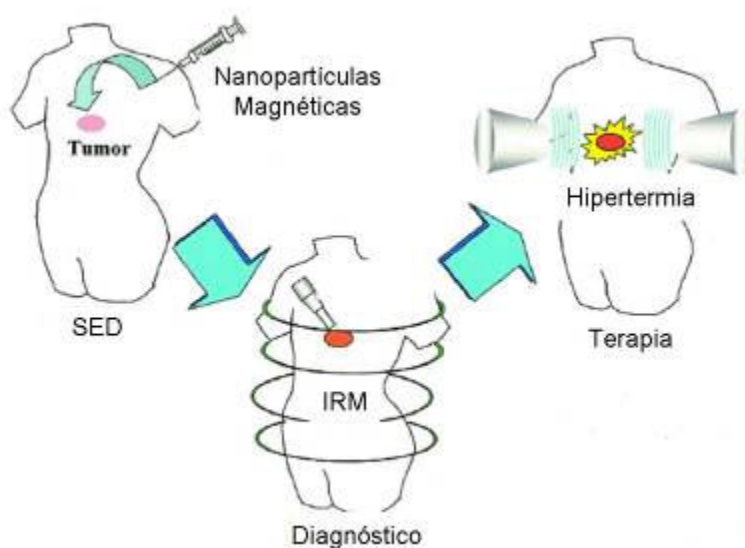


Figura 7. Ilustração esquemática de estratégias terapêuticas utilizando NPM. NPM funcionalizadas acumulam nas células tumorais via sistemas entregadores de drogas (SED). NPMs podem ser utilizadas como ferramenta para o diagnóstico de câncer por IRM. A hipertermia pode também ser induzida por exposição a campo magnético alternado. (Modificado de Ito et al., 2005a)

Agentes de contraste para IRM que utilizam NPM, geralmente magnetitas e maghemitas funcionalizadas com polietilenoglicol (PEG) ou dextrana, já podem ser adquiridas comercialmente, como o Lumirem® utilizado para visualizar o trato gastrointestinal e o Endorem® para visualizar o fígado e o baço (KANEMATSU et al., 2006) e o Sinerem® atualmente utilizado para detectar alguns tipos de tumores (KELLER et al., 2004).

Os agentes de contrastes comerciais não são tão específicos para determinados órgãos. Por isso, NPM têm sido associadas a anticorpos monoclonais (MAbs), os quais podem se ligar

especificamente a células tumorais, permitindo assim a visualização do tumor por ressonância magnética (HUH et al., 2005).

Suzuki et al. (1996) desenvolveram um agente de contraste para IRM utilizando uma MAb-magnetita (Fig. 8), a qual possui um núcleo central de magnetita coberto por PEG que se liga covalentemente ao MAb que é específico para o antígeno de superfície de células de glioblastomas.

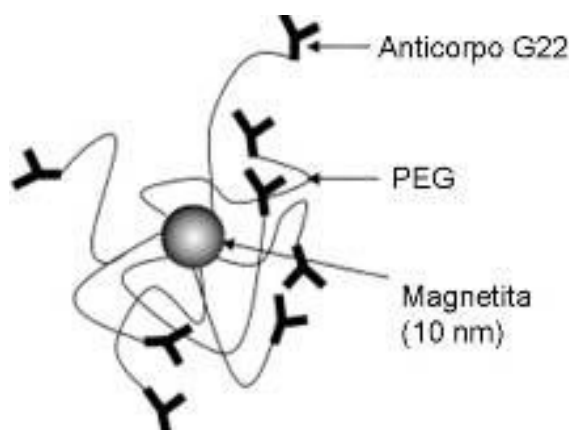


Figura 8. Agente de contraste MAb-magnetita utilizado em IRM. Uma magnetita funcionalizada com PEG que liga covalentemente ao MAb (Modificado de ITO et al., 2005a).

Recentemente um *scanner* portátil para IRM foi desenvolvido para detectar tumores em mamas, denominado de SentiMag™, constituído de uma sonda com alta-sensibilidade para detectar pequenas concentrações de nanopartículas magnéticas. Por meio do SentiMag™ é possível rastrear as NPM pelo sistema linfático a partir do ponto onde foram injetadas (tumor). No sistema linfático as NPM são captadas pelos linfonodos sentinelas possibilitando verificar se houve ou não a disseminação do câncer (Fig. 9) (AEPPLI & PANKHURST, 2006).

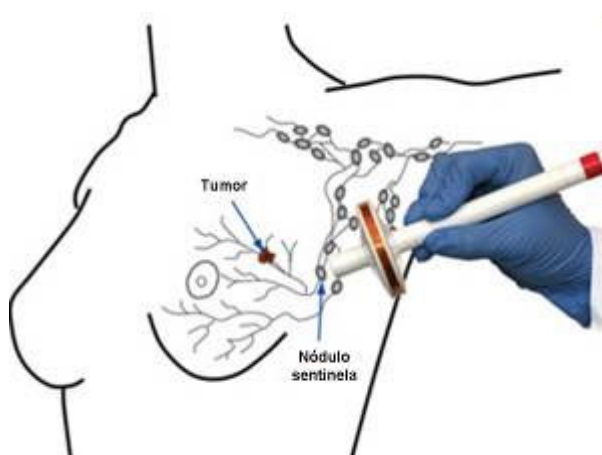


Figura 9. SentiMag™ para rastrear NPM pelo sistema linfático a partir do ponto onde foram injetadas (tumor). (Modificado de Aeppli & Pankhurst, 2006)

ii) Marcação e separação celular – a separação de biomoléculas contidas em grandes volumes de solução pode ser realizada utilizando colunas convencionais para extração fase-sólida, mas esse método pode consumir muito tempo. Por outro lado, o método de separação de biomoléculas utilizando nanopartículas magnéticas é mais rápido quando comparado com o método padrão (SAFARIK & SAFARIKOVA, 2002). Para a separação magnética, a NPM é adicionada em uma solução ou suspensão contendo o alvo, ao qual se liga a NPM, e o complexo é recolhido por meio de um separador magnético apropriado (Fig. 10) (TARTAJ et al., 2003). A separação magnética pode ser utilizada para separar: anticorpos monoclonais, antígenos, diversas enzimas, organelas celulares e células específicas (SAFARIK & SAFARIKOVA, 2002).

Para uso na separação celular, as NPM também podem ser associadas a anticorpos para se ligarem a antígenos específicos. Essa técnica, denominada de separação imunomagnética, permite isolar um grande número de diferentes tipos celulares, sendo empregada, por exemplo, na separação seletiva de células $CD34^{+}$, na detecção e remoção de

células tumorais do sangue periférico e no isolamento de antígenos específicos das células T CD8⁺, etc (SAIYED et al., 2003).

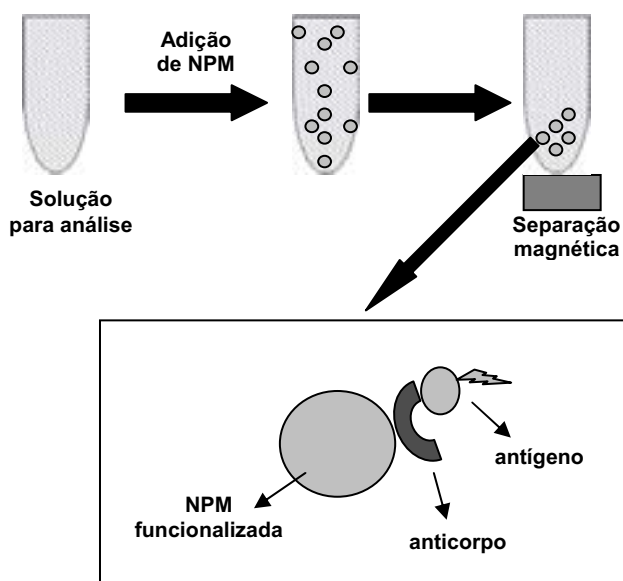


Figura 10. Representação esquemática da separação magnética. Nesse esquema uma NPM foi associada a um anticorpo e adicionada em meio líquido contendo o antígeno (substância para análise). (Modificado de Tartaj et al., 2003).

A marcação de células com substâncias paramagnéticas possibilita ainda o seu rastreamento (*tracking*) *in vivo* por IRM (WEISSLEDER et al., 1997; SCHOEPF et al., 1998, BULTE et al., 2004). Para um rastreamento celular eficiente por IRM, as NPM precisam ser endocitadas pelas células. Porém, após a administração intravenosa, as NPM são rapidamente envolvidas pelos componentes da circulação sanguínea, como as proteínas do plasma. Este processo é conhecido como opsonização (DAVIS, 1997). Normalmente a opsonização faz com que as NPM sejam reconhecidas e eliminadas pelo sistema de defesa (sistema retículo endotelial - SRE). Para que isso não ocorra é necessário revestir a superfície das NPM com

compostos biocompatíveis e estáveis para o SRE, como a dextrana (LACAVA et al., 2004) e o PEG (GUPTA & GUPTA, 2005).

Algumas células, como os linfócitos, não possuem receptores eficientes para a internalização das NPM por endocitose (SCHOEPP et al., 1998). Uma estratégia para aumentar a captação de NPM pelas células consiste em utilizar NPM de maghemita aniônica, uma vez que, as maghemitas aniônicas apresentam carga negativa e grande afinidade pela membrana celular (WILHELM et al., 2002). No estudo realizado por Wilhelm et al. (2002) foi observado em várias linhagens celulares uma eficiência três vezes maior na captação de NPM de maghemita aniônica quando comparado com a captação de NPM cobertas com dextrana.

iii) Hipertermia - é o procedimento terapêutico empregado para proporcionar aumento de temperatura em uma região do corpo que esteja afetada por uma neoplasia, com o objetivo de causar a morte das células cancerosas. Seu funcionamento se baseia no fato de que a temperatura de 41- 42°C tem o efeito de destruir diretamente as células tumorais, uma vez que estas são menos resistentes a aumentos bruscos de temperatura do que as células normais circunvizinhas (TARTAJ et al., 2003).

Entretanto, a técnica da hipertermia convencional não é muito efetiva, pois áreas mais internas do tumor não são aquecidas uniformemente podendo restar células cancerosas vivas após o tratamento. Assim, a magnetohipertermia, uma técnica que associa a utilização de NPM à hipertermia, permite um aquecimento mais restrito e uniforme na área do tumor. O aumento de temperatura na magnetohipertermia pode ser atingido pela presença de NPM de óxido de ferro dentro de células tumorais submetidas à ação de um campo magnético externo de frequência alternada, que induz a vibrações das NPM e consequentemente liberação de calor, que pode levar à eliminação do tumor (Fig.11) (TARTAJ et al., 2003;ITO et al., 2005a).

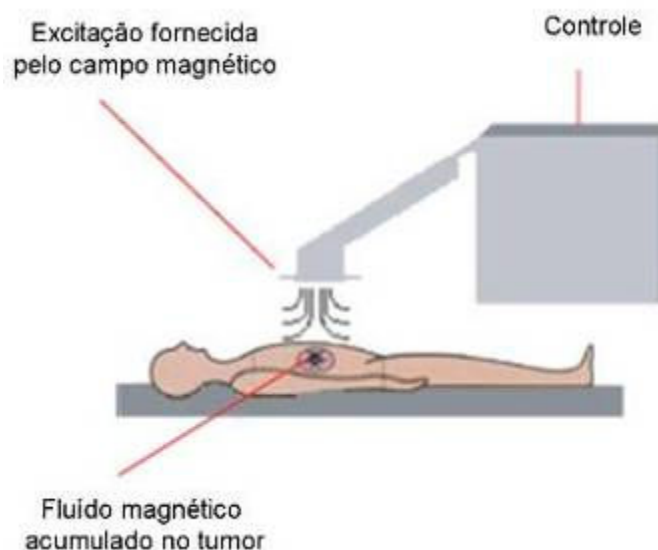


Figura 11. Magnetohipertermia utilizada no tratamento contra o câncer. O fluido magnético acumula no tumor, que na presença de um campo magnético externo de frequência alternada, induz a vibração das NPM e liberação de calor para eliminar o tumor. (Modificado de Gooneratne et al., 2008).

Gordon et al. (1979) foram os primeiros a utilizarem NPM associadas a hipertermia. Nesse estudo, NPM foram administradas intravenosamente em ratos com carcinoma mamário. A presença do campo magnético de frequência alternada liberou calor levando à destruição do tumor.

Vários grupos têm demonstrado a eficácia da magnetohipertermia em vários tipos de tumores presentes em animais, como melanoma em camundongos (SUZUKI et al., 2003), gliomas em ratos (YANASE et al., 1998) e osteosarcomas em hamsters (MATSUOKA et al., 2004).

A primeira aplicação clínica da magnetohipertermia em seres humanos foi realizada por Johannsen et al. (2005) em pacientes com câncer de próstata. Os resultados demonstraram que o método foi bem tolerado, sendo que, as NPM permaneceram na próstata por algumas semanas, permitindo assim tratamentos sequenciais de hipertermia, dispensando repetidas

aplicações do fluido magnético. A partir desses resultados, foi iniciada a fase I do estudo para avaliar a toxicidade e a qualidade de vida do paciente durante o tratamento.

Na magnetohipertermia, as NPM podem ainda ser associadas a anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para proteínas de membrana de células tumorais. O conjugado NPM-MAb, quando administrado, potencializa o contraste de imagem na ressonância magnética, possibilitando que metástases sejam localizadas de forma mais eficiente e precoce, para posteriormente eliminar as células tumorais através do calor (SCHUTT et al., 1995).

iv) Carreadores de drogas – desde que Freeman & Geer (1965) propuseram que partículas finas de ferro poderiam ser transportadas pelo sistema vascular e se concentrar em pontos particulares do corpo utilizando um campo magnético, o uso de NPM para carrear e liberar drogas de forma controlada em órgãos ou tecidos afetados por doenças, tem se tornado um campo promissor para pesquisas (GOODWIN et al., 1999).

O princípio do carregamento de drogas associadas a carreadores magnéticos é relativamente simples. Após injeção intravascular, as NPM podem ser transportadas pela corrente sanguínea e se concentrar no tumor através da utilização de um campo magnético externo, posicionado na área do corpo afetada pelo tumor (Fig. 12) (PULFER & GALLO, 2000).

A eficácia do método foi comprovada por Lubbe et al. (1996a). Os autores realizaram testes pré-clínicos com carreadores magnéticos associados a epirrubicina em modelos animais com carcinoma de colo uterino. Posteriormente, Lubbe et al. (1996b) também comprovaram a eficácia dos carreadores magnéticos para tratar pacientes com tumores sólidos.

O segundo teste clínico foi realizado em 32 pacientes com carcinoma hepatocelular. Neste estudo, a doxorrubicina foi associada às NPM, atingindo o alvo em 30 dos 32 pacientes.

Após análise do tumor em 20 pacientes, 15 apresentaram uma estabilização ou mesmo redução do tamanho e cinco pacientes tiveram um aumento no tamanho do tumor (KODA et al., 2002).

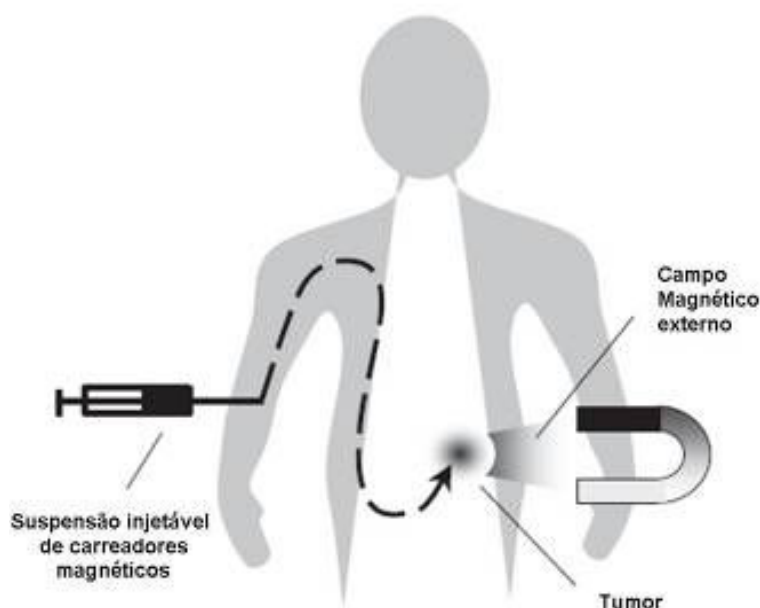


Figura 12. Princípio do carregamento de drogas associadas a carreadores magnéticos. (Modificado de Douziech-Eyrolles et al., 2007).

Entretanto, uma vez que a força gradiente do campo magnético diminui com a distância, esse método possui bons resultados somente em casos de tumores sólidos próximos à superfície do corpo (PULFER & GALLO, 2000). Com o objetivo de aumentar a especificidade, o complexo NPM-droga pode ser associado a outra molécula capaz de reconhecer e se ligar especificamente ao sítio alvo. Tais moléculas podem ser anticorpos, proteínas, hormônios, entre outros (SUDIMACK & LEE, 2000).

O carregamento magnético de drogas anticancerígenas apresenta vantagens sobre a quimioterapia convencional, uma vez que, aumenta a concentração da droga no local do tumor, limitando a sua concentração sistêmica e não afetando dessa forma, as células

adjacentes, reduzindo os efeitos colaterais associados aos quimioterápicos (SAFARIK & SAFARIKOVA, 2002). Kubo et al. (2001) observaram que a utilização do quimioterápico adriamicina associado a carreadores magnéticos (magnetolipossomas) aumenta quatro vezes a concentração de adriamicina no tumor quando comparado a utilização de solução da droga sem magnetolipossomas. Os magnetolipossomas consistem em um núcleo central de fluido magnético envolvido por bicamada de fosfolípidos que pode ser funcionalizada para se ligar a sítios específicos (DE CUYPER & JONIAU, 1988).

v) Magnetofecção – método no qual NPM associadas a DNA-vetores são transfectadas dentro das células pela influência de um campo magnético externo. Para esse propósito, NPM podem ser revestidas com polietilenoimina (PEI) formando um complexo que se associa facilmente com a carga negativa do DNA (SCHERER et al., 2002; KROTZ et al., 2003a).

Krotz et al. (2003b) utilizaram a magnetofecção para aumentar a eficiência da transferência de genes. A magnetofecção de culturas de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) aumentou a eficiência de transfecção do gene da luciferase (*luc*) em 360 vezes, quando comparado com o sistema de transfecção normal. Além disso, houve um aumento de apenas de 1,6 vezes na toxicidade, sugerindo que as vantagens da magnetofecção superam o aumento na toxicidade e indicam que a magnetofecção poderia ser uma ferramenta efetiva para a transfecção de DNA em células endoteliais.

vi) Engenharia tecidual – uma vez que células marcadas com NPM podem ser manipuladas por magnetos, uma nova metodologia para reparo de tecidos foi proposta por Ito et al. (2004b). O sistema Mag-TE (*magnetic force-based tissue engineering*) consiste na utilização de campo magnético e NPM. Através desse método foi possível construir sistemas tridimensionais funcionais de co-cultura de células endoteliais e hepatócitos. Estes apresentaram uma maior

secreção de albumina pelos hepatócitos em relação à co-cultura sem o magneto (ITO et al., 2004b). Ito et al. (2005b) também utilizou o sistema Mag-TE em outro estudo para construir estruturas tubulares como uretra (a partir de células uroteliais) e vasos sanguíneos (a partir de células endoteliais da aorta, células musculares da aorta e fibroblastos) (Fig. 13).

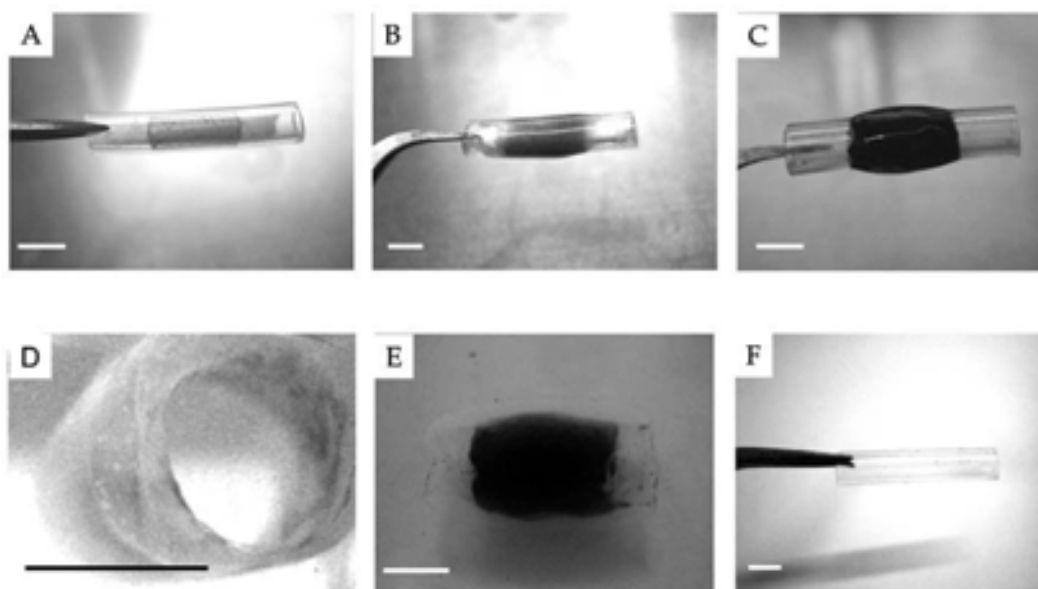


Figura 13. Estruturas tubulares construídas utilizando Mag-TE. O tubo de silicone continha um magneto cilíndrico (A). Células uroteliais cobriram a superfície do tubo de silicone (B). As células endoteliais e musculares da aorta e fibroblastos formaram camadas mais espessas sobre o tubo de silicone que as células uroteliais (C). Após remoção do tubo e magneto (F) foi observado a formação de estruturas tubulares contendo tecido urotelial (D) e tecido vascular (E). (Modificado de Ito et al., 2005b)

Nanopartículas magnéticas também podem ser utilizadas como suporte para expandir células tronco. Ito et al. (2004a) expandiram células tronco mesenquimais *in vitro* utilizando como substrato NPM de magnetita. Esse estudo abre perspectivas para o uso de NPM associadas à aplicação de campo magnético externo para expandir *in vitro* células hES sem o risco de contaminação por patógenos animais, viabilizando sua utilização na terapia celular. Em adição, células hES marcadas com NPM poderiam ser direcionadas através de um campo

magnético externo para um local específico do corpo, permanecendo o tempo necessário para que ocorra a regeneração do tecido. Ainda, para a efetiva diferenciação *in vivo* das células hES, proteínas e fatores de crescimento poderiam ser associados a essas NPM e carregados ao tecido alvo.

1.5 Justificativa

As pesquisas com nanopartículas magnéticas vêm se intensificando nos últimos anos, revelando aplicações e potencialidades enormes na área biomédica. As nanopartículas magnéticas possuem uma característica única, sua reação a um campo magnético, o que as torna úteis no carregamento de drogas ou processos de separação celular (GUPTA & GUPTA, 2005).

Em 2004, as nanopartículas magnéticas foram utilizadas para a expansão *in vitro* de células tronco mesenquimais da medula óssea humana, despertando mais ainda o interesse em utilizá-las para expandir células tronco embrionárias (ITO et al., 2004a).

Em consonância, o Laboratório de Bioquímica Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás iniciou as suas pesquisas sobre nanopartículas magnéticas e células tronco embrionárias no início de 2006, com projeto de pesquisa aprovado pelo CNPq intitulado “Uso de nanopartículas magnéticas na expansão *in vitro* de células tronco embrionárias” em parceria com outras instituições.

Assim, este trabalho se justifica, uma vez que um de seus objetivos é determinar a nanopartícula que apresenta menor efeito citotóxico em células de melanoma humano para uso posterior na expansão de células tronco embrionárias, possibilitando assim, expandi-las sem o uso de monocamada celular de origem animal, eliminando o risco de contaminação por patógenos animais.

Este trabalho ainda tem como objetivo determinar o potencial anti-proliferativo destas nanopartículas em células de melanoma humano, uma vez que esse tipo de câncer possui um índice mundialmente elevado e não possui um tratamento totalmente efetivo.

Outro objetivo importante deste estudo é padronizar uma metodologia de isolamento e expansão de células tronco embrionárias, visando à obtenção de células no estado

indiferenciado, utilizando para isto embriões bovinos, devido à sua fácil obtenção em relação a outros animais.

Verifica-se, portanto, que a pesquisa nessa área é crescente e ainda não existe um método adequado para a expansão *in vitro* de células tronco embrionárias, tanto de humanos como de animais. Assim, a utilização de nanopartículas magnéticas para expandir células tronco poderá vir a contribuir significativamente para posteriores aplicações terapêuticas dessas células.

Ademais, são necessárias pesquisas para elucidar aspectos da biologia básica das células pluripotentes, bem como quanto à questão da segurança associada ao uso destas células em terapias. Neste contexto, métodos para a expansão, caracterização e diferenciação das células tronco embrionárias de animais são muito desejáveis como modelos biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas magnéticas de maghemita funcionalizadas com ácido láurico, DMSA e citrato, para posteriores aplicações biomédicas, principalmente no campo da engenharia tecidual, verificando assim a sua potencialidade para expandir células tronco embrionárias (ES) na ausência de co-cultura de fibroblastos embrionários murinos (MEF).

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas magnéticas em células de melanoma humano (SK-MEL-37) por meio de análise da atividade de desidrogenase mitocondrial por ensaio de MTT e análise de danos celulares por microscopia eletrônica e eletroforese de DNA em gel de agarose;
2. Desenvolver um sistema para expandir células tronco embrionárias sem a presença de monocamada celular, utilizando NPM e campo magnético externo;
3. Avaliar comparativamente o crescimento das células tronco embrionárias murinas na presença da NPM em relação ao crescimento na presença de MEF;
4. Caracterizar o estado indiferenciado de células tronco embrionárias murinas expandidas na presença da NPM, através da expressão dos transcritos de indiferenciação (Oct-4 e Nanog) por RT-PCR, medida da atividade da fosfatase alcalina e análise da morfologia ultra-estrutural por microscopia eletrônica;
5. Isolar e expandir células tronco embrionárias bovinas a partir de blastocistos bovinos e caracterizar o estado indiferenciado através da expressão dos transcritos de indiferenciação (Oct-4 e STAT-3) por RT-PCR.

3. ARTIGO I

Erika Regina Leal de Freitas, Paula Roberta Otaviano Soares, Rachel de Paula Santos, Regiane Lopes dos Santos, Joel Rocha da Silva, Elaine Paulucio Porfírio, Sônia N. Bão, Emilia Celma de Oliveira Lima, Paulo César Moraes, Lidia Andreu Guillo. **In Vitro Biological Activities of Anionic γ -Fe₂O₃ Nanoparticles on Human Melanoma Cells.** Manuscrito publicado na revista *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8:2385–2391, 2008.



***In Vitro* Biological Activities of Anionic γ -Fe₂O₃ Nanoparticles on Human Melanoma Cells**

Erika Regina Leal de Freitas¹, Paula Roberta Otaviano Soares¹, Rachel de Paula Santos¹,
Regiane Lopes dos Santos², Joel Rocha da Silva², Elaine Paulucio Porfírio³,
Sônia N. Bão³, Emília Celma de Oliveira Lima²,
Paulo César Moraes⁴, and Lidia Andreu Guillo^{1,*}

¹*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brazil*

²*Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brazil*

³*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília-DF 70910-900, Brazil*

⁴*Instituto de Física, Universidade de Brasília, Núcleo de Física Aplicada, Brasília-DF 70910-900, Brazil*

Three magnetic fluid (MF) samples containing γ -Fe₂O₃ (maghemite) nanoparticles surface-coated with either meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA), citric acid or lauric acid were prepared, characterized, and assessed for their cytotoxic potential on the human SK-MEL-37 melanoma cell line. Ultra-structural analysis was also performed using transmission electron microscopy (TEM). *In vitro* cytotoxicity was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The inhibitory concentration (IC₅₀) derived from the sigmoidal dose response curve was 254 μ g-iron/mL (95% confidence interval 239–270 μ g-iron/mL) for lauric acid-coated nanoparticles. DMSA-coated nanoparticles did not exhibit a clear trend toward toxicity (IC₅₀ value is more than 2260 $\pm$ 50 μ g-iron/mL) and the IC₅₀ value was about 433 $\pm$ 14 μ g-iron/mL for citric-acid coated nanoparticles. The cytotoxic response correlated with both the hydrodynamic diameter and the zeta potential suggests that the chain length of the carboxylic acid of the coating species may influence metabolic cellular process. Also the assayed nanoparticles can be considered non-cytotoxic to human melanoma cells since IC₅₀ values are higher than plasma concentration usually observed in clinical use of contrast agents. Using TEM we verified that all assayed nanoparticles were internalized by cells through endocytic vesicles. Additionally, cells treated with lauric acid-coated nanoparticles at high concentration (588 or 840 μ g-iron/mL) displayed morphological features of apoptosis (surface blebbing, intense vacuolization and chromatin condensation) or a typical DNA ladder pattern when analyzed by TEM or agarose gel electrophoresis, respectively. Apoptotic events may be operative, suggesting a promising therapeutic application for the lauric acid-coated nanoparticle in the treatment of cancer cells.

Keywords: Anionic Maghemite Nanoparticles, SK-MEL-37 Melanoma Cells, Nanotoxicity.

1. INTRODUCTION

Extensive experimental research has already demonstrated the enormous potential of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) in supporting a wide variety of biological and medical applications.^{1,2} Products based on SPION were marketed to support magnetic cell separation technologies and used as contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI).³ Different SPION-based material systems are presently under development for testing

(*in vitro* and *in vivo*) to support magnetothermocytolysis technology, an approach in which low-amplitude AC applied magnetic fields combined with SPION may be used to destroy tumor cells via cellular magnetohyperthermia (MHT).^{4,5} In addition, the upcoming generation of magnetic drug delivery systems (MDDS) is being engineered to entrap drugs in SPION-based complex material systems, thus allowing external manipulation for site-localization using gradients of magnetic field while being able to promote local MHT as an additional strategy for either cell disruption or thermal-assisted drug delivery.^{6,7}

*Author to whom correspondence should be addressed.

The knowledge of how SPION encapsulated as a MDDS or simply functionalized with different molecules can interact with cells is an important step towards the development of new biological and medical applications as well as improvement toward already existing ones. The efficiency of cultured cancer cells in absorbing functionalized cationic-SPION has been already reported, demonstrating that the electrostatic interaction between the positively-charged SPION and the negatively-charged plasma membrane is a key interface.⁸ Furthermore, no SPION cytotoxic effect to human melanoma cells at concentrations up to 120 μ g-iron/mL was observed, supporting the proposal of using SPION as an excellent platform material to build more complex anticancer MDDS.⁸ In addition, functionalized anionic-SPION has also exhibited high affinity for cationic sites on the cell surface.^{9,10} The literature reports that anionic maghemite nanoparticle coated with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) has been efficiently internalized by RAW macrophages and HeLa cells and may be successfully used to label many other cells to comparable degrees.^{9,10} Recent *in vitro* studies using DMSA-coated maghemite nanoparticle have demonstrated that this particular functionalized SPION produces a slight decrease in cell viability but no genotoxic effects in cultured normal human fibroblasts.¹¹ Finally, magnetite nanoparticles surface-coated with a double layer of lauric acid were recently used to treat adenocarcinoma in cats.¹² The application of an external magnetic field for 20–30 min was enough to retain the magnetic nanoparticle in the tumor area until the cancer cells internalized them via endocytosis.¹²

In the present study three distinct molecular surface-coatings were used to functionalize the surface of the nanoparticles and later be able to suspend them as a stable magnetic fluid (MF) sample. The three MF samples were biologically-tested using cultured human melanoma cells to draw conclusions in regarding to the non cell-specific high level of internalization of anionic maghemite nanoparticles. All three molecular-coatings used in this study (DMSA, citric acid, and lauric acid) present carboxyl groups attached to different carbon-based backbones, thus allowing the investigation of the biological response (cellular metabolic processes for instance) modulated by distinct surface-coatings while keeping the same SPION-based core material. Indeed, the DMSA-coating was included in the present study in order to provide a nanotoxicity reference in addition to comparing our findings with results previously reported in the literature.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Maghemite Nanoparticle Preparation and Functionalization

The precursor of the core SPION, namely magnetite (Fe₃O₄), was synthesized by mixing ferric and ferrous

chloride aqueous solutions (2:1 molar ratio) with concentrated ammonia aqueous solution followed by vigorous stirring, as described in the literature.¹³ The black magnetite precipitate was washed several times with water and collected by a magnet. The nanoparticulate maghemite-based (γ -Fe₂O₃) sample was prepared by refluxing the nanoparticulate magnetite sample in a mixture of 2.0 M nitric acid and 0.35 M Fe(NO₃)₃ for 2 h at 96 °C. The brown precipitate was extensively washed using the 1 M HCl and 5% NaCl and collected with the aid of a magnet. The SPION sample produced was dispersed in water and dialyzed against deionized water before the functionalization step with one of these three different coating molecules, namely meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA), citric acid, and lauric acid (see structures in Fig. 1). The DMSA-coated maghemite nanoparticle was prepared according to the protocol described in the literature.¹⁴ Briefly, the DMSA (Acros Chemicals) stock solution (0.3 M) was added to the freshly-precipitated maghemite sample at 3:1 molar ratio (DMSA:Fe) and shaken for 12 h at room-temperature. Then, the dispersion was dialyzed for 12 h against deionized water to eliminate any free DMSA remaining in the bulk solution. The pH was adjusted to 7.0–7.2 and the MF sample was purified by centrifugation at 3000 rpm for 5 min to remove large aggregates. A similar procedure was carried out to prepare the MF sample based on citrate-coated maghemite nanoparticle.¹⁵

In order to produce maghemite nanoparticles functionalized with a double layer of lauric acid, bare maghemite nanoparticles (6 g) were first dispersed in water at 75–80 °C. Lauric acid (1 g) was then added under continuous stirring for 20 min. Maghemite nanoparticles functionalized with a single monolayer of lauric acid were decanted and washed with deionized water. In this step, nanoparticles became hydrophobic and floated on water evidencing the functionalization with a single-layer of lauric acid. In the next step, nanoparticles were collected by centrifugation and extra addition of lauric acid (1 g) to the

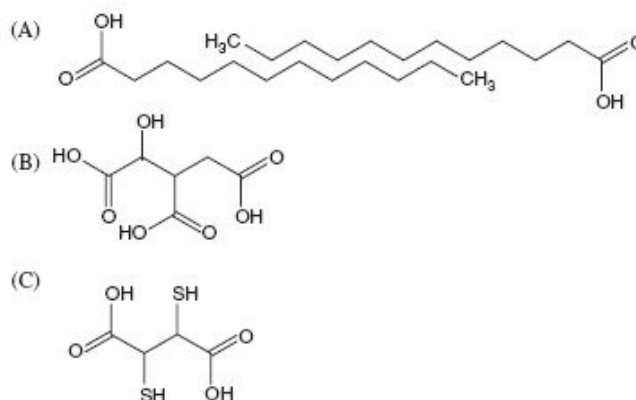


Fig. 1. Structures of the three molecular coatings employed. (A) Lauric acid; (B) Citric acid; (C) DMSA.

single-coated maghemite nanoparticle promoted the onset of the double layer structure (see sketch in Fig. 1) thus allowing the dispersion of the double-layered maghemite nanoparticle as a water-based MF sample. The produced MF sample was then dialyzed against deionized water and the pH was adjusted to 7.0–7.2.¹⁶ The sample's total iron content was determined by atomic absorption spectrometry using a Perkin-Elmer 5000 spectrophotometer. Stock magnetic fluid samples containing 25–68 mg-iron/mL, corresponding to the range of 1.0 – 7.3×10^{16} particle/mL, were produced for *in vitro* tests. Samples were filter-sterilized ($0.22 \mu\text{m}$) or autoclaved.

2.2. Characterization of the Maghemite Nanoparticle

X-ray powder diffraction (XRD) data were recorded in the range of 10 – 80° , in steps of 2° min^{-1} , using the XRD-6000 (Shimadzu) X-ray diffraction system equipped with a Cu-K α radiation source. The average diameter of the nanocrystalline domain (d) indicated on Table I was determined from the corrected full-width at half maximum of the strongest (311) X-ray reflection peak using the Scherrer's formula.¹⁷

The zeta potential and hydrodynamic diameter measurements were performed using the Nanosizer ZS (Malvern Instruments). The zeta potential was obtained by light scattering upon application of an alternating electrical field into the measuring cell and analyzed at a scattering angle of 173° . The hydrodynamic diameter (D_H) of the surface-coated maghemite nanoparticles were obtained by dynamic light scattering measurements. The Nanosizer apparatus was equipped with a He-Ne laser emitting at 633 nm with a 4.0 mV power source. The instrument was used in the backscattering configuration where detection was done at a scattering angle of 173° using an avalanche photodiode. Data indicated on Table I were obtained from measurements taken in double distilled water.

2.3. Cell Culture, Magnetic Labeling, and Cell Viability Assay

The human melanoma cell line used in this study (SK-MEL-37), originally provided by Dr. Lloyd J. Old from Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA, was routinely cultured in Modified Eagle's medium (MEM) (Cultilab, Brazil) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Brazil), 100 U/mL

penicillin and 100 μmL streptomycin (Gibco BRL, USA) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . All *in vitro* experiments were performed at the exponential growth phase. For the experiments, cells were seeded on 24-well culture microplates at a concentration of 6000 cell/mL and incubated for 18 h for adhesion. Then, different aliquots of the MF stock samples were added directly to the medium and the plates were incubated for 24, 48, or 72 h. After treatment, cells were washed with PBS and cell viability was determined with the MTT assay 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma Chemical Co., USA) which evaluate mitochondrial function by spectrophotometry.¹⁸ The absorbance readings were performed on a microplate reader (Biotek, USA). Four replicates were measured and values were expressed as percentage of untreated cells.

2.4. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Cells grown on 10 cm-diameter culture dishes were treated with the MF samples containing different nanoparticle concentration and incubated for 72 h at 37°C . Cells were harvested by incubating with 0.25% trypsin-EDTA solution, resuspended and fixed for 30 min in solution containing 2% (v/v) glutaraldehyde, 2% (wt/v) paraformaldehyde, and 3% (wt/v) sucrose in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2. After fixation cells were rinsed in the same buffer and post fixed in 1% (wt/v) osmium tetroxide, 0.8% (wt/v) potassium ferricyanide, 5 mM CaCl_2 in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2. The material was dehydrated through an acetone series (30 to 100%) (v/v) and embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. The material was observed with a JEOL 1011 transmission electron microscope operating at 80 kV.

2.5. DNA Fragmentation Analysis

After treatment with the MF samples cells and supernatants were mix together, collected by centrifugation, washed with PBS, lysed with 500 μL -aliquot of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) and incubated with RNase A (100 $\mu\text{g/mL}$, final) for 1 h. A further incubation with proteinase K (200 $\mu\text{g/mL}$, final) for 1 h at 37°C was also performed. Total DNA was extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol. The aqueous phase was precipitated with 2 volumes of cold ethanol and DNA was resuspended in 30 μL

Table I. Physicochemical characteristics of the investigated anionic maghemite nanoparticles.

Coating	Hydrodynamic diameter D_H (nm)	Zeta potential mV	Iron stock concentration (mg/mL)	Number of particle/mL ($\times 10^{16}$) ^a	Crystalline diameter d (nm)
DMSA	42	−59.7	68	7.3	7.2
Citric acid	62	−52.1	26	2.3	7.7
Lauric acid	73	−32.4	25	1.0	10.3

^aMaghemite density of 4.8 g/cm^3 was used to estimate the number of particle/mL.

of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) and analyzed by agarose gel electrophoresis.

2.6. Statistical Analysis

The results of cell viability were graphically presented as the percentage of control and were referred to as the mean $\pm$ standard deviation (SD) for the four replicates. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's pairwise comparisons. The inhibitory concentration value (IC₅₀) and 95% confidence interval was derived from a nonlinear regression model based on sigmoidal dose response curve (variable slope) and computed using Prism 4 for Windows (version 4.00, GraphPad Software, San Diego, CA, www.graphpad.com).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Structural characterization of the synthesized maghemite nanoparticles are summarized in Table I. The rough estimation of the nanoparticle crystalline size (d) was obtained from the powder XRD data, as indicated previously. The bigger core diameter value observed for the lauric acid-coated nanoparticle may reflect the difference in the synthesis process in comparison to the DMSA-coated or citric acid-coated nanoparticles.

The zeta potential value for all investigated samples indicates high values of negative charge associated with the surface-coated nanoparticles, which is attributed to the nanoparticle's surface-attached carboxylate groups (COO⁻). The lowest negative zeta potential observed in the lauric acid-coated nanoparticles may be strongly influenced by the longest distance separating the ionized carboxylate group facing the bulk solution and the core nanoparticle surface, thus reducing the probability for the core-shell negative charge sharing. Additionally, the lauric acid-coated nanoparticle presented the biggest D_H value, which is expected due to both the biggest core size nanoparticle and the longest carbon backbone of the molecular coating.

Indeed, as we will discuss latter on in this paper, the investigated physical parameters (which are related to the coating structure), namely zeta potential and hydrodynamic diameter may modulate cell viability and intracellular signaling processes.

In order to evaluate the toxicity of surface-coated maghemite nanoparticle, cells were incubated with the MF samples containing iron concentration in the range of 43 μ g-iron/mL to 2.26 mg-iron/mL. The results of the MTT assay showed statistical differences among control and citrate-coated or lauric acid-coated nanoparticles (Figs. 2(A and B)). Tukey's post test confirmed that 72 h after incubation the MF sample based on citrate-coated maghemite (iron concentration of about 433 μ g-iron/mL, meaning [Fe] = 8.0 mM) caused 50% significant

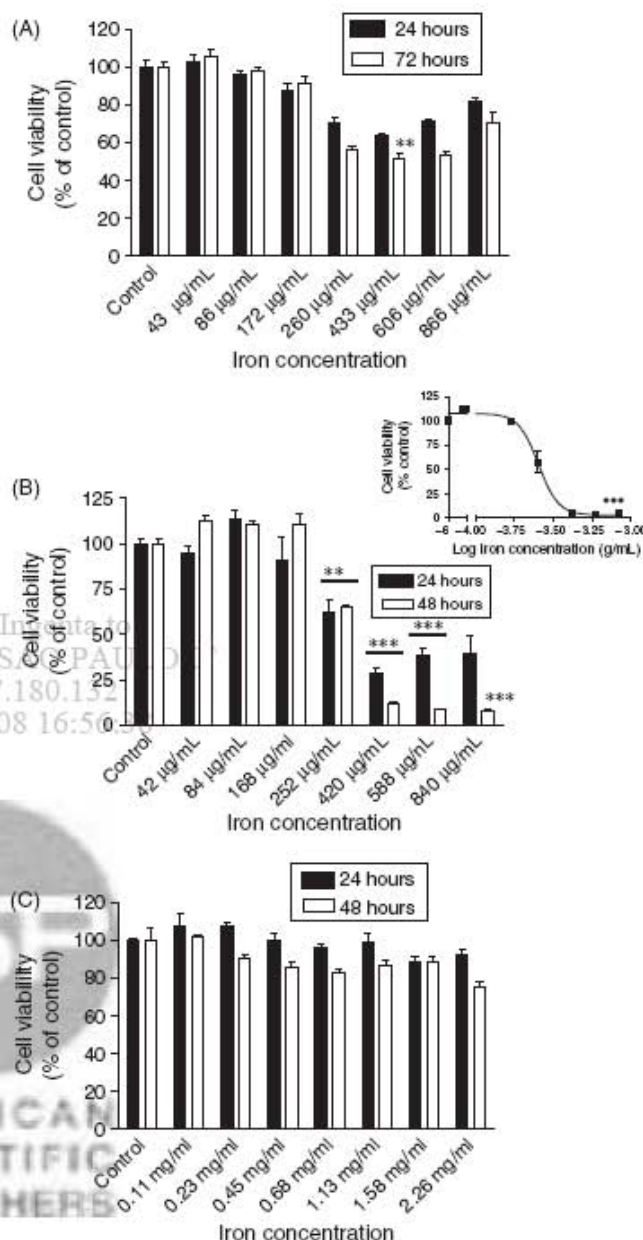


Fig. 2. Concentration-dependent inhibition of growth in human melanoma cells by anionic maghemite nanoparticles. (A) Citric acid; (B) Lauric acid. Inset: Sigmoidal dose response curve for 72 h incubation; (C) DMSA-coated nanoparticles. The cell viability was achieved by the MTT assay and expressed as percentage of untreated cells. Statistically significant compared to control (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

inhibition ($p < 0.01$) of cell proliferation with respect to the control cells (Fig. 2(A)). However, a more accurate value of IC₅₀ for the citrate-coated maghemite nanoparticle could not be assessed due to strong nanoparticle light scattering. This is because maghemite nanoparticles are tightly adsorbed onto the cell surface at an iron concentration above 606 μ g-iron/mL, and could not be completely removed before MTT addition, causing interference on absorbance readings (Fig. 2(A)). In addition, a significant decrease in cell viability was observed

24 h, 48 h and 72 h after incubation with lauric acid-coated maghemite nanoparticle for all tested iron concentration higher than 252 μ g-iron/mL (Fig. 2(B) and inset, $p < 0.01$ or $p < 0.001$). At the highest employed iron concentration of 840 μ g-iron/mL ($[Fe] = 15$ mM), SK-MEL-37 viability was significantly reduced to 10% after incubation for 72 h (Fig. 2(B) inset, $p < 0.001$). The calculated IC₅₀ value for the lauric acid-coated nanoparticle was 254 μ g-iron/mL (95% confidence interval 239–270 μ g-iron/mL) and was obtained from the dose response curve shown in the inset of Figure 2(B). The high IC₅₀ values observed for citric or lauric acid-coated maghemite nanoparticles demonstrated

that these MF samples could be considered non cytotoxic to human melanoma cells.

In regard to the DMSA-coated maghemite nanoparticle we found that extracellular iron concentration as high as 40 mM (corresponding to 2.4×10^{15} particle/mL or 2.26 mg-iron/mL) did not cause any significant effect on cell viability (Fig. 2(C)), suggesting that the DMSA-coated maghemite does not cause any toxicity to human SK-MEL-37 melanoma cells. Rivière et al.¹⁹ have also performed a quantitative analysis of the DMSA-coated nanoparticle in normal smooth muscle cells and found no cytotoxicity as well as no effect on cell growth with an extracellular iron concentration of 5 mM. These MF samples also showed no cytotoxicity to cultured normal human fibroblasts.¹¹

Ultra-structural analysis showed that melanoma cells with no nanoparticle treatment exhibited nucleus with homogeneously distributed chromatin and an evident nucleolus. Additionally, several cytoplasm prolongments were observed in the cell surface, whereas the cytoplasm appears occupied by mitochondria and small vacuoles (Fig. 3(A)). Apparently, the three different nanoparticle coatings investigated did not modulate the endocytosis internalization mechanism, through which the cell engulfs some of the extracellular fluid including the nanoparticle suspended in it. So, we found that cells treated with 1.58 mg-iron/mL of DMSA-coated nanoparticles (Figs. 3(B–C)) or 606 μ g-iron/mL of citrate-coated nanoparticles (Figs. 3(D–E)) demonstrated intact plasma membrane. The nucleus appears with chromatin homogeneously distributed while a huge number of vesicles containing nanoparticles were observed in the cytoplasm. Clusters consisting of DMSA-coated nanoparticles were observed in the cell surface (Fig. 3(B)). Endocytosis of citrate-coated maghemite nanoparticles for instance is quite evident in Figure 3(E). In contrast, cells treated with 588 μ g-iron/mL of lauric acid-coated maghemite nanoparticles clearly presented surface blebs and large vacuoles, suggesting an operative apoptotic event (Fig. 3(F)). Interestingly, all MF-treated melanoma cells exhibited no maghemite nanoparticle in the nucleus (Figs. 3(B–F)).

Figure 4 shows the pattern of DNA content isolated from a time course experiment of human melanoma cells incubated with MF samples and analyzed by agarose gel electrophoresis. We found that DNA isolated from 24 h and 48 h treated cells did not show fragmentation of DNA (Fig. 4, lanes 2, 3, 5, and 6). However, DNA isolated from lauric acid-coated maghemite nanoparticles at 72 h incubation (840 μ g-iron/mL) showed a laddering pattern of the DNA, characteristic of apoptosis (Fig. 4, lane 4). Citric acid-coated nanoparticles (866 μ g-iron/mL) at 72 h incubation (Fig. 4, lane 7) and DMSA-coated nanoparticles (not shown) did not reveal any DNA fragmentation.

This finding supports the proposal of using the lauric acid-coated maghemite nanoparticle itself for cancer

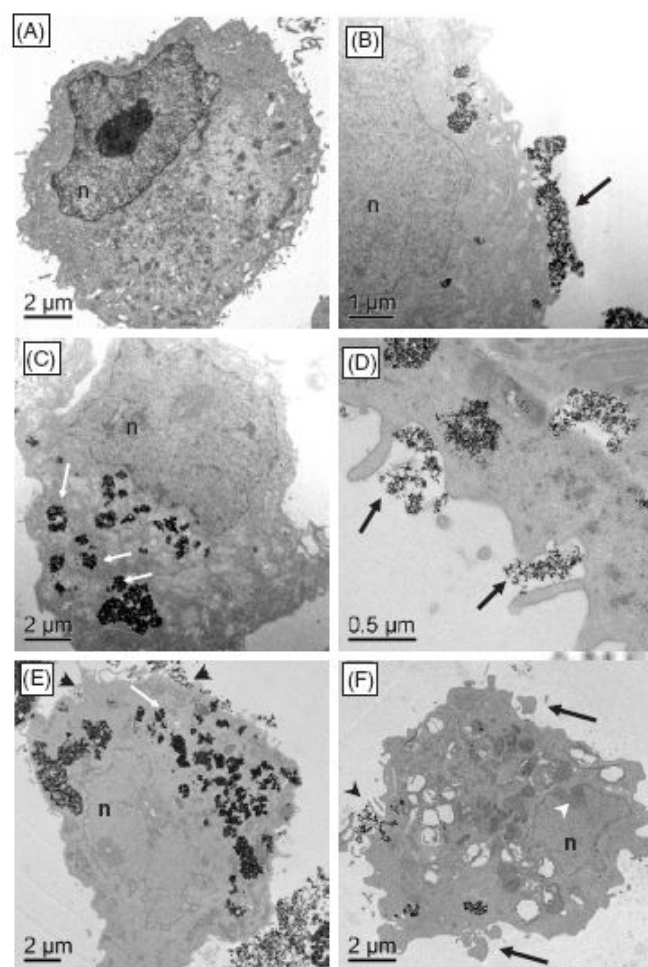


Fig. 3. Transmission electron micrographs of human SK-MEL-37 melanoma cells after 72 h incubation with anionic maghemite nanoparticles at 37 °C. (A) Control cell. (B–C) DMSA-MF-treated cells. Nanoparticles ($[Fe] = 1.58$ mg/mL) are clustered on plasma membrane (B, arrow) and within numerous endosomes (C, arrows); (D–E) Citric acid-MF-treated cells. Nanoparticles ($[Fe] = 606$ μ g/mL) are present outside the cell near projected segments of the plasma membrane (D, arrows) or within smooth short and large vesicles (E, arrow). Note intense internalization processes at the surface membrane (E, arrowhead). (F) Lauric acid-MF-treated cells. Nanoparticles ($[Fe] = 588$ μ g/mL) are also engulfed by cytoplasm prolongments outside the cell (arrowhead). We can observe an initial surface blebbing (arrows), intense vacuolization and chromatin condensation at periphery of the nucleus (white arrowhead), (n), nucleus.

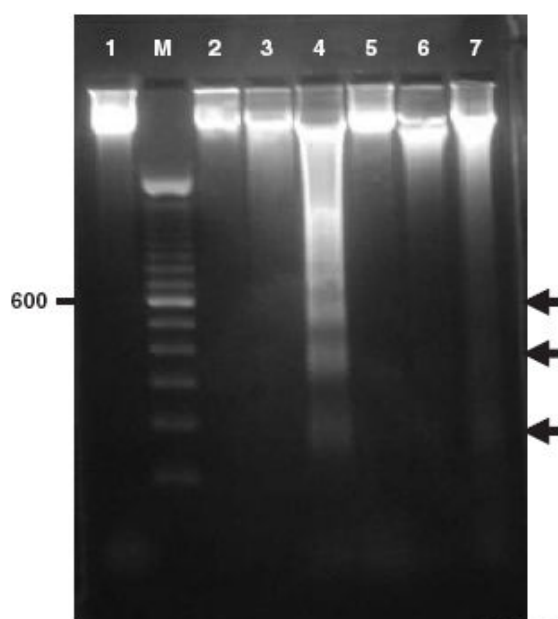


Fig. 4. Electrophoretic separation of DNA extracted from SK-MEL-37 cells treated with surface-coated anionic maghemite nanoparticles. Cells were treated with lauric acid-coated maghemite nanoparticle at 840 μ g-iron/mL (2 to 4) and citric acid-coated maghemite nanoparticles at 866 μ g-iron/mL (5 to 7) for 24 h (2 and 5); 48 h (3 and 6) and 72 h (4 and 7), at 37 °C. Cells treated with DMSA-coated nanoparticle showed similar results as cells treated with citrate-coated nanoparticle. (M) 100 bp DNA ladder. Arrows indicate internucleosomal DNA fragments.

treatment, without the coupling of an anticancer drug. Considering apoptosis as a desirable event induced by anticancer therapies and taking into account that apoptosis was evidenced in the present study at higher iron concentration (above 800 μ g-iron/mL in lauric acid-coated maghemite-based MF samples), non-cytotoxic iron concentration might be therapeutically employed. Additionally, application of magnetic field gradients may be used to modulate the maghemite nanoparticle concentration at the target site in order to effectively induce apoptosis.

4. CONCLUSION

Our study demonstrated that maghemite nanoparticles surface-coated with either DMSA, citric acid or lauric acid are taken up by human melanoma cells in culture. The evaluated surface-coated maghemite nanoparticles are non-cytotoxic to human melanoma cells since IC₅₀ values were all higher than plasma concentrations normally attained by intravenous administration of superparamagnetic iron oxide contrast agents for MRI (0.037 mg-iron/mL).²⁰ However, cell viability studies demonstrated that parameters like the hydrodynamic diameter and the zeta potential could influence cell metabolic processes. Among all tested nanoparticles only the lauric acid-coated ones could induce significant cell death through apoptosis

as shown by TEM and agarose gel electrophoresis. These effects could only be observed at concentrations as high as 588 and 840 μ g-iron/mL. Nonetheless, a significant cell death could be observed at lower concentrations (252 μ g-iron/mL), but probably the level of apoptosis was not high enough to be detected by agarose gel electrophoresis. Evaluation of the influence of nanoparticle aggregates upon biological cellular events, including the upper limits of nanoparticle concentration, is presently in progress. Finally, our findings strongly suggest that lauric acid-coated maghemite nanoparticles (with no anticancer drug attached to them) could be successfully used against human melanoma. Melanoma animal models are intended to be used in the next experiments to validate this hypothesis.

Acknowledgments: This work was financially supported by protocol n° 552593/2005-2 from Health Ministry and from National Research Council (CNPq) of Brazil and FUNAPE. Authors thanks to CNPq for fellows to E. R. L. de Freitas, P. R. O. Soares, R. P. Santos, and R. L. dos Santos. E. C. D. Lima greatly thanks Dr. Norbert Buske for the recipe to prepare the magnetic fluid based on lauric acid double layer.

References and Notes

1. A. K. Gupta, R. R. Naregalkar, V. D. Vaidya, and M. Gupta, *Nanomed.* 2, 223 (2007).
2. C. Alexiou, R. Jurgons, C. Seliger, and H. Iro, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 2762 (2006).
3. Y. X. Wang, S. M. Hussain, and G. P. Krestin, *Eur. Radiol.* 11, 2319 (2001).
4. M. Babincova, V. Altanerova, C. Altaner, P. Cicmanec, and P. Babinec, *Med. Phys.* 31, 2219 (2004).
5. M. H. A. Guedes, M. E. A. Guedes, P. C. Morais, M. F. Da Silva, T. S. Santos, J. P. Alves, Jr., C. E. Bertelli, R. B. Azevedo, and Z. G. M. Lacava, *J. Magn. Magn. Mater.* 272, 2406 (2004).
6. E. Wagner, *Expert Opin. Biol. Ther.* 7, 587 (2007).
7. A. R. Simioni, F. L. Primo, M. M. A. Rodrigues, Z. G. M. Lacava, P. C. Morais, and A. C. Tedesco, *IEEE Trans. Magn.* 43, 2459 (2007).
8. A. Petri-Fink, M. Chastellain, L. Juillerat-Jeanneret, A. Ferrari, and H. Hofmann, *Biomaterials* 26, 2685 (2005).
9. C. Wilhelm, C. Billotey, J. Roger, J. N. Pons, J. C. Bacri, and F. Gazeau, *Biomaterials* 24, 1001 (2003).
10. C. Wilhelm, F. Gazeau, J. Roger, J. N. Pons, and J.-C. Bacri, *Langmuir* 18, 8148 (2002).
11. M. Auffan, L. Decome, J. Rose, T. Orsiere, M. De Meo, V. Briois, C. Chaneac, L. Olivi, J. L. Berge-Lefranc, A. Botta, M. R. Wiesner, and J. Y. Bottero, *Environ. Sci. Technol.* 40, 4367 (2006).
12. M. Sincal, D. Ganga, M. Ganga, D. Argherie, and D. Bica, *J. Magn. Magn. Mater.* 293, 438 (2005).
13. G. A. van Ewijk, G. J. Vroeghe, and A. P. Philipse, *J. Magn. Magn. Mater.* 201, 31 (1999).
14. N. Fauconnier, J. N. Pons, J. Roger, and A. Bee, *J. Colloid Interface Sci.* 194, 427 (1997).

15. P. C. Morais, R. L. Santos, A. C. M. Pimenta, R. B. Azevedo, and E. C. D. Lima, *Thin Solid Films* 515, 266 (2006).
16. L. Shen, P. Laibinis, and T. Hanton, *J. Magn. Magn. Mater.* 194, 37 (1999).
17. B. D. Cullity, *Elements of X-Ray Diffraction*, Addison-Wesley, Canada (1978).
18. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65, 55 (1983).
19. C. Rivière, F. P. Boudghène, F. Gazeau, J. Roger, J.-N. Pons, J. P. Laissy, E. Allaire, J. B. Michel, D. Letourneur, and J. F. Deux, *Radiology* 235, 959 (2005).
20. R. A. Trivedi, J. M. U-King-Im, M. J. Graves, J. J. Cross, J. Horsley, M. J. Goddard, J. N. Skepper, G. Quartey, E. Warburton, I. Joubert, L. Wang, P. J. Kirkpatrick, J. Brown, and J. H. Gillard, *Stroke* 35, 1631 (2004).

Received: 9 October 2007. Accepted: 23 December 2007.

Delivered by Ingenta to:
UNIVERSIDADE SAO PAULO IF
IP : 143.107.180.132
Tue, 08 Jul 2008 16:56:38



4. ARTIGO II

Erika Regina Leal de Freitas, Paula Roberta Otaviano Soares, Rachel de Paula Santos, Regiane Lopes dos Santos, Elaine Paulucio Porfirio, Sônia N. Bão, Emilia Celma de Oliveira Lima, Lidia Andreu Guillo. **Magnetic field-magnetic nanoparticles system used to grow in vitro murine embryonic stem cells.**

Manuscrito submetido na revista *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*

Published by Mary Ann Liebert, Inc. publishers

Latest Impact Factor* is 3.273

* 2008 Journal Citation Reports® published by Thomson Reuters, 2009

Magnetic field-magnetic nanoparticles system used to grow in vitro murine embryonic stem cells

Erika Regina Leal de Freitas¹, Paula Roberta Otaviano Soares¹, Rachel de Paula Santos¹, Regiane Lopes dos Santos², Elaine Paulucio Porfírio³, Sônia N. Bão³, Emilia Celma de Oliveira Lima², Lidia Andreu Guillo¹

Affiliation

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brazil.

²Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brazil.

³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília-DF 70910-900, Brazil.

Corresponding author

Dr^a. Lidia Andreu Guillo, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Campus II Jardim Samambaia CEP 74001-970, Goiás, Brazil. Phone: 55 62 35211495 Fax: 55 62 35211190. e-mail: guillo@icb.ufg.br.

Abstract

The in vitro growth of embryonic stem cells (ESCs) is usually obtained in the presence of murine embryonic fibroblasts (MEF) as a feeder layer. However, due to their potential clinical use in regenerative medicine, new methods of in vitro expansion of ESCs should be developed. This study aims to establish a system to expand and maintain the pluripotency of ESCs in the absence of MEF layer. For this purpose, magnetic nanoparticles (MNPs) were used as a support for growing the murine embryonic stem cells (mESCs) in the presence of an external magnetic field, thus creating the magnetic field-magnetic nanoparticles (MF-MNP) system. The mESCs were cultivated in culture flasks placed over the magnet, and incubated at 37° C and 5% CO₂. The growth characteristics were evaluated by counting cells and showed a doubling time slightly higher for mESCs cultivated in the presence of the system than in the presence of the MEF (20.67 ± 0.19 vs. 15.95 ± 0.21 , respectively) ($p= 0.001$). The undifferentiated state was characterized by RT-PCR, alkaline phosphatase activity and electronic microscopy. The expression of Oct-4 and Nanog genes and analysis of ultrastructural morphology demonstrated that the MF-MNP system did not interfere with the signaling pathways maintaining the undifferentiated state as well as with processes that cause structural changes in the cytoplasm or nucleus (e.g. apoptosis). Moreover, cells grown in the MF-MNP system showed high alkaline phosphatase activity. The MF-MNP system can keep the in vitro proliferation of ESCs in the absence of a MEF layer, providing a valuable tool for expansion of ESCs, contribute to studies that aim to the therapeutic use of these cells.

Introduction

Due to their capacity of self-renew and differentiation into several cell types, embryonic stem cells (ESCs) are considered as an attractive option on the tissue regeneration area and may also offer a wide range of alternative treatments for many degenerative diseases [1]. The success of the clinical application of the ESCs, among other factors, depends specially on the quality control of the in vitro culture system used for the expansion and differentiation of these cells.

The standard system for the expansion of ESCs uses the co-culture of mitotically inactivated embryonic fibroblast (MEF) layer [2]. However, the presence of animal cells in a culture of human embryonic stem cells (hESCs) is not desirable since the contamination with animal pathogens can occur, preventing the clinical application of the hESCs [3].

Although murine embryonic stem cells (mESCs) can be propagated in the absence of MEF feeder since the medium is supplemented with leukemia inhibitory factor (LIF), this cytokine is not sufficient to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells (hESCs) in the absence of MEF [4-6]. So, the development of a culture system in the absence of MEF becomes necessary.

Currently, the magnetic nanoparticles (MNPs) have been used in a variety of biomedical applications, since the MNPs have the property of reacting to an external magnetic field. Among the various applications, we mention its use as contrast agent in magnetic resonance image (MRI), cell separation, hyperthermia and tissue engineering [7]. In the field of tissue engineering the MNPs were used to expand mesenchymal stem cells in the presence of an external magnetic field [8].

Therefore, this study aims to establish a system to expand mESCs in the absence of MEF. For this, magnetic iron oxide nanoparticles functionalized with citrate are used as a

support for growing murine embryonic stem cells, in the presence of an external magnetic field (neodymium), thus creating the magnetic field-magnetic nanoparticles (MF-MNP) system.

Materials and Methods

Isolation and culture of murine embryonic fibroblasts

Murine embryonic fibroblasts (MEF), used as a support to expand the mESCs were derived of mouse's embryos. For their isolation, females were sacrificed between the 13th and 14th day of conception. The embryos were isolated and placed in PBS, and after the heads and limbs were removed. The carcasses were washed with PBS, dissociated in 0.25% trypsin/EDTA (Cultilab, Brazil), and placed in culture flasks containing medium DMEM (Gibco-Invitrogen, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Brazil), penicillin (100 UI/ml)/streptomycin (100 µg/ml) (Gibco-Invitrogen, USA) and kept at 37°C and 5% CO₂. After a few days, fibroblasts became visible and are left to grow near the confluence, when they were ready to be frozen and stored for later use. In our hands, a high viability was obtained by freezing fibroblasts directly in a solution containing DMEM (Gibco-Invitrogen, USA), 20% FBS (Cultilab, Brazil) and 10% DMSO (Invitrogen, USA). For using as a feeder for mESCs propagation, MEF were cultivated in culture flasks previously coated with 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) containing DMEM (Gibco-Invitrogen, USA) supplemented with 10% FBS (Cultilab, Brazil), 2mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen, USA) and penicillin (100 UI/ml)/streptomycin (100 µg/ml) (Gibco-Invitrogen, USA). Subcultures were routinely performed every 2 days using 0.05% trypsin/EDTA (Gibco-Invitrogen, USA). The day before mESCs seeding, MEF were mitotically inactivated

with 10 µg/ml mitomycin C (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) for 3 h at 37°C and 5% CO₂. The isolation and expansion of MEF was according to standard protocols [2].

Murine embryonic stem cells culture

Murine embryonic stem cell line (USP-1) was kindly donated by Dr. Lygia da Veiga Pereira (Department of Genetics and Evolutionary Biology, University of São Paulo -USP). These cells were propagated in DMEM (Gibco-Invitrogen, USA) supplemented with 1000 U/ml murine LIF (Esgro, USA), 2mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen, USA), 0.1mM β-mercaptoethanol (Gibco-Invitrogen, USA), 0.1mM nonessential amino acids (Gibco-Invitrogen, USA), 2mM sodium pyruvate (Gibco-Invitrogen, USA), penicillin (50 UI/ml)/streptomycin (50 µg/ml) (Gibco-Invitrogen, USA), 20% FBS (Hyclone, Logan, USA) and maintained in a incubator at 37°C and 5% CO₂. For subcultures, cells were removed from flasks by 0.05% trypsin/ETDA treatment (Gibco-Invitrogen, USA) and seeded at 1:10 passage ratio every 48 hours (doubling time was approximately 14-15 hours).

Synthesis of magnetic nanoparticles functionalized with citrate

Maghemite nanoparticles (γ -Fe₂O₃) were prepared by co-precipitation of ions Fe (II) and Fe (III) in aqueous solution by alkaline hydrolysis reaction, following protocols provided by Van Euijk et al. [9]. Maghemite nanoparticles were functionalized with citrate according to Morais et al. [10]. Both synthesis and functionalization were carried out by the team of Dr. Emilia Celma de Oliveira Lima (Laboratory of Chemistry/Federal University of Goiás-UFG). Previous studies were conducted by us to determine the non cytotoxic concentration to be used in this study [11].

Expansion of murine embryonic stem cells in the magnetic field-magnetic nanoparticles system

Murine embryonic stem cells were treated with functionalized magnetic nanoparticles (43 µg-iron/ml) and grown in culture flasks (25 cm²) previously coated with 0.1% gelatin. The culture medium was the same for mESCs cultivated with MEF layer. Flasks were put over a neodymium magnet (4000 Gauss) and kept at 37° C with 5% CO₂ (Fig.1). For comparative purposes, the cells were subcultured every 72 hours, and monitored 24, 48, and 72 hours, over six passages. As controls, mESCs were cultured only in: i) MEF layer (positive control) and ii) 0.1% gelatin (negative control). Cells were routinely cryopreserved in a solution containing DMEM (Gibco-Invitrogen, USA), 20% FBS (Cultilab, Brazil) and 10% DMSO (Invitrogen, USA).

Determination of proliferation parameters

For these experiments, murine embryonic stem cells cultivated in the presence of the MF-MNP system as in the presence of MEF were counted before seeding using a hemocytometer (Neubauer chamber). After a determined period (see Table 2 and 3), cells were enzymatically dissociated and counted again. To calculate the doubling time (t_d), we applied the formulae: $N = N_0 \times 2^n$

Where: N= number of cells after the incubation time (T)

N_0 = number of seeded cells

n= number of generations

Once determined the number of generations, the t_d was easily calculated according to the formulae: $t_d = T / n$, where T is the total incubation time.

Although relatively simple to the majority of cells, the calculus of t_d for the embryonic stem cells comprehends some considerations: when mESCs were grown in the presence of MEF it is necessary to deduct the number of these cells in N and N_o . Three independent experiments were performed and results were expressed as a mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analysis was assessed by Student's t-test using Prism 4 for Windows (version 4.00 GraphPad Software, San Diego, CA, www.graphPad.com).

Prussian blue reaction

The presence of nanoparticles into the cells was confirmed by the Prussian blue essay, used to demonstrate ferric iron. Prussian blue reaction consists of a solution containing equal parts of 2% potassium ferrocyanide and 6% hydrochloric acid [12].

For the assay, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, washed with PBS and incubated with the Prussian blue reagent for 30 minutes. The blue color is a characteristic of the reaction between the iron and the reagent.

Transmission electron microscopy (TEM)

The ultrastructural morphology of cells grown in the MF-MNP system was analyzed by transmission electron microscopy (TEM). For analysis, mESCs were treated with magnetic nanoparticles as described above. After 72 hours incubation, cells were fixed for 30 minutes in a solution containing 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, and 3% sucrose in sodium cacodylate buffer (0.1 M pH 7.2). Then, the cells were rinsed in the same buffer and post fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide, 5mM of calcium chloride in sodium cacodylate buffer (0.1 M pH 7.2). The material was dehydrated through acetone series (30 to 100%) and embedded in *Spurr* resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate

and lead citrate. The material was observed in transmission electron microscopy JEOL 1011 operating at 80 kV.

RT-PCR analysis

The characterization of the undifferentiated state of the mESCs grown in the presence of the MF-MNP system was performed by RT-PCR.

Total RNA was extracted from mESCs using Trizol (Invitrogen, USA), and quantified using a fluorimeter (Qubit™, Invitrogen, USA). Two micrograms were DNase-treated (Invitrogen, USA) for 15 minutes at the room temperature. Samples were equally fractionated where one microgram of DNase-treated RNA was reverse-transcribed using Thermo Script RT-PCR™ kit (Invitrogen, USA), according to manufacturer's specifications. RT-negative controls (not reverse-transcribed) were also included.

PCR reaction mixture was composed of 0.25 μ M of each primer (Table 1), 2 mM $MgCl_2$, 0.1 mM of each dNTPs, 2.5 U *Taq* Polymerase in 1X PCR buffer (Invitrogen, USA) and 2 μ L cDNA in a total volume of 25 μ L. The following cycle conditions were applied: an initial 4 min denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 56°C and 30 s at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C, according to Shi et al. [13]. The amplified products: 314 bp (Oct-4) and 192 bp (Nanog) were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel containing ethidium bromide (1 μ g/mL). As negative controls, MEF cDNA and a sample without cDNA were also used in the PCR reaction.

Alkaline phosphatase staining

An assay was also performed in order to determine the alkaline phosphatase activity, in mESCs cultivated in the MF-MNP system.

A solution of 5-bromo-4-chloro-3-indol phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) (ROCHE) was prepared, according to manufacturer's specifications. Analysis was performed on cells previously fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. After rinsing with PBS, the BCIP/NBT solution was added and fixed cells were incubated for 30 min in a dark environment. Cells with alkaline phosphatase activity showed a dark blue coloration.

Results

Murine embryonic stem cells morphology

When cells are growing in the presence of the MF-MNP system, some distinct morphological characteristics are observed according to the localization of the magnetic field (Fig. 1). Cells that grew away from the magnetic field (in the middle of the flasks, Fig. 1E) showed signs of differentiation. As cells approach the magnetic field, its morphology is more similar to undifferentiated cells (Fig. 1C and 1D).

In addition, were performed comparative studies by monitoring the morphology of the cells, each day after subculture (e.g. 24, 48, and 72 hours). The results are shown in figure 2. For 24 and 48 hours, we observed that cells grown on both MEF layer and in the presence of the MF-MNP system (Fig. 2A and 2B), showed approximately identical number of undifferentiated colonies (A1 vs. B1; A2 vs. B2 in Fig. 2). However, after 72 hours cells cultured on a MEF layer had already morphological signs of differentiation, while cells grown in the presence of the MF-MNP system, still showed the undifferentiated morphology (A3 vs. B3 in Fig. 2).

As a negative control, was seeded mESCs in 0.1% gelatin. In Figure 2C, cells showing a lot of differentiation can already be clearly seen after 24 hours of monitoring.

Cells cultivated in MF-MNP system retained growth characteristics after recovery from the freeze-thaw process.

Growth Characteristics

To minimize the source of error, the final count of cells (to obtain N) was performed for two different times (T): 48-49 hours or 69 hours, since the doubling time (t_d) should not change significantly during the exponential growth phase (Table 2 and 3).

As expected, cells counts performed for mESCs in MEF layer at 48 and 69 hours did not show significant differences ($p= 0.09$) (Table 2). The mean value for three independent experiments was 15.95 ± 0.21 hours. The same was observed for cell counts performed for mESCs growing in the MF-MNP system, where the doubling time calculated at 49 and 69 hours did not change significantly ($p= 0.91$) (Table 3). The mean value for three independent experiments was 20.67 ± 0.19 hours.

However, when comparing the doubling time for cells grown in the presence of MEF and in the presence of MF-MNP system, a significant difference ($p= 0.001$) was observed, indicating a slightly slower growth of cells in the presence of MF-MNP system.

Detection and ultrastructural localization of iron oxide nanoparticles in murine embryonic stem cells

To assess localization of iron oxide nanoparticles in mESCs, cells were fixed and staining with Prussian blue reagent (Fig. 3). A dark blue coloration can be seen at the periphery of colonies, as well as into individual cells after enzymatic dissociation (Fig. 3B and 3C).

In addition, the analysis of mESCs ultrastructural morphology by TEM revealed that nanoparticles were endocited by the cells, and were localized inside structures similar to

vesicles (Fig. 4B and 4C), and at the outer face of the plasma membrane (Fig. 4D). But, we not observed nanoparticles inside the nucleus or the presence of apoptotic bodies and fragmented chromatin.

Activity of Alkaline phosphatase in murine embryonic stem cells

The mESCs cultivated in the MF-MNP system showed high activity of alkaline phosphatase, as can be seen in Figure 5B. A dark blue stain has been also obtained for mESCs in the presence of a MEF, as expected (Fig 5A).

Oct-4 and Nanog expression.

Gene expression analysis of pluripotency markers by RT-PCR revealed high levels of Nanog and Oct-4 expression (Fig. 6). We also observed that the level of expression was maintained over the six subcultures (data not shown).

Discussion

Human embryonic stem cells need feeder cells to keep them in culture in undifferentiated state [4,14]. In protocols for conventional cultivation, hESCs are maintained in MEF for long periods without losing the pluripotency. However, the spread of hESCs in MEF allows the possibility of transmission of animal pathogens, which would be an obstacle to clinical applications. To solve this problem, several studies have been focused on developing a support system for the hESCs using human feeder cells [15-17]. But there is also a risk of contamination by human pathogens causing the emergence of new diseases.

In this study, we have developed a culture system for mESCs, in which magnetic nanoparticles are added to culture medium supplemented with LIF using Corning™ flasks placed above a neodymium magnet at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

The magnetic nanoparticles used in this study were maghemite nanoparticles that have been functionalized with citrate in order to form a stable aqueous dispersion. Besides stabilizing the particle, the citrate provides carboxyl groups in the particle surface [18]. In addition, the carboxylate functionality on the surface provides further surface modification with fluorescent dyes, proteins or hormone for possible cell-binding, bioimaging, tracking, and targeting [19-20].

Previous studies to assess the cytotoxic activity of these nanoparticles have been performed by our group [11]. Results demonstrate that maghemite nanoparticles functionalized with citrate were not cytotoxic to cultured cells.

Magnetic nanoparticles had already been used for expanding in vitro mesenchymal stem cells by using a magnetic field [8]. In this system, the cells grew at the periphery of culture dishes. This was also observed in our study, probably due to the greater magnetic force in this region.

Ito et al. [21] also used this system to build tubular structures such as urethra (from urothelial cells) and blood vessels (from aortic endothelial cells, aortic smooth muscle cells and fibroblasts).

It has been reported that biomaterials can be used as support for growing mESCs in vitro [22-23]. As reported by Nur-E-Kamal et al. [23], a nanofibrillar matrix was used (Ultra-Web™) to expand mESCs in medium supplemented with LIF. The results showed an increase in proliferation of these cells when compared to the control cultivated on feeder cells.

We have chosen to work with mESCs since several studies have already been conducted to understand the biology of these cells. Factors responsible for maintaining the undifferentiated state as well as for inducing their differentiation are well established.

The results presented here showed that the morphology of mESCs grown in the MF-MNP system was similar to the cells grown in MEF feeder layer. In addition, although the doubling time was slightly higher in the presence of the system than in the presence of the MEF, the cells remained undifferentiated for several passages. Cells growing in MF-MNP system also exhibited a high alkaline phosphatase activity. The results demonstrate that MF-MNP system did not interfere with 'stemness' characteristics.

According to the literature, the differentiation of mESCs depends on transcription factors that act as a molecular switch that activates or represses the expression of specific genes [24]. One of these factors is the Oct-4, which is a transcription factor containing a POU domain encoded by Pou5f1 gene [25]. The Oct-4 activity is an essential characteristic of pluripotency found in the mammals' embryos cells [26]. This factor has been detected *in vitro* only in embryonic carcinoma cells, embryonic stem cells and embryonic germ cells [27].

Another important factor expressed in ESCs is NANOG, a homeoprotein that can sustain the undifferentiated state of the mESCs in the absence of LIF [28].

In our study, expression of Oct-4 and Nanog genes in mESCs grown in the MF-MNP system was confirmed by RT-PCR. Moreover, the level of expression remained high over the six subcultures.

Cells cultivated in the presence of the MF-MNP system were also analyzed by TEM in order to detect structural alterations caused by the nanoparticles. The results showed that clusters of MNPs are formed on the plasma membrane. Nanoparticles can be also seen inside vesicles, probably formed by endocytosis. In addition, ultrastructural studies demonstrate that citrate functionalized magnetic nanoparticles did not cause any damage to cells, since was not

observed any alterations in the plasma membrane, nucleus nor mitochondria. Probably, the iron in MNPs is re-used/recycled by biochemical pathways of iron metabolism.

Cytotoxic studies have been demonstrated that internalization of MNPs did not affect the cell viability of murine embryonic stem cells [29], human mesenchymal stem cells (hMSC) [30] and human neural stem cells (hNSC) [31]. In addition in vivo studies showed that the MNPs did not cause necrosis nor apoptosis in a guinea pig model [32].

To date, it has not yet been reported a similar use of this system to expand embryonic stem cells. The results showed here open the the possibility for expanding human embryonic stem cells in the absence of MEF feeder layer contributing to future clinical uses.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Dr. Lygia da Veiga Pereira for generous donation of a murine embryonic stem cell line (USP-1) and Adriana Abalen Martins Dias and Luiz Fernando Lima Reis from Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer/SP, for kindly donating mouse embryonic fibroblasts. This work was sponsored by a grant of the Ministry of Health and National Research Council (CNPq, nº 552593/2005-2). Authors thank to CNPq for fellows to E. R. L. de Freitas, P. R. O. Soares, R. P. Santos and R. L. dos Santos. We thank the Fundação de Apoio a Pesquisa (FUNAPE/UFG) for partial financial support.

References

1. Hou L and T Hong. (2008). Stem cells and neurodegenerative diseases. *Sci China C Life Sci* 51:287-294.
2. Bryja V, S Bonilla, E Arenas. (2006). Derivation of mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 1:2082-2087.
3. Ulloa-Montoya F, CM Verfaillie, WS Hu. (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 100:12-27.
4. Thomson JA, J Itskovitz-Eldor, SS Shapiro, MA Waknitz, JJ Swiergiel, VS Marshall, JM Jones. (1998). Embryonic stem cell line derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
5. Amit M, MK Carpenter, MS Inokuma, CP Chiu, CP Harris, MA Waknitz, J Itskovitz-Eldor, JA Thomson. (2000). Clonally derived human embryonic stem cells lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227:271-278.
6. Carpenter MK, E Rosler, MS Rao. (2003). Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 5:79-88.
7. Gupta AK and M Gupta. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26:3995-4021.
8. Ito A, E Hibino, H Honda, K Hata, H Kagami, M Ueda, T Kobayashi. (2004). A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal* 20:119–125.

9. Van Ewijk GA, GJ Vroege, AP Philipse AP. (1999). Convenient preparation methods for magnetic colloids. *J Magn Magn Mater* 201:31–33.
10. Morais PC, RL Santos, ACM Pimenta, RB Azevedo, ECO Lima. (2006). Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles. *Thin Solid Films* 515: 266-270.
11. Freitas ER, PR Soares, RP Santos, RL Santos, JR Silva, EP Porfírio, SN Bao, EC Lima, PC Morais, LA Guillo. (2008). In vitro biological activities of anionic $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles on human melanoma cells. *J Nanosci Nanotechnol* 8:2385-2391.
12. Parmley RT, SS Spicer, CJ Alvarez. (1978). Ultrastructural localization of nonheme cellular iron with ferrocyanide. *J Histochem Cytochem* 26:729-741.
13. Shi YT, YZ Huang, F Tang, JX Chu. (2006). Mouse embryonic stem cell-derived feeder cells support the growth of their own mouse embryonic stem cells. *Cell Biol Int* 30:1041-1047.
14. Mitalipova M, J Calhoun, S Shin, D Wininger, T Schulz, S Noggle, A Venable, I Lyons, A Robins, S Stice. (2003). Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* 21:521-526.
15. Richards M, S Tan, CY Fong, A Biswas, WK Chan, A Bongso. (2003). Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 21:546-556.

16. Lee JB, JM Song, JE Lee, JH Park, SJ Kim, SM Kang, JN Kwon, MK Kim, SI Roh, HS Yoon. (2004). Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction* 128:727-735.
17. Inzunza J, K Gertow, MA Strömberg, E Matilainen, E Blennow, H Skottman, S Wolbank, L Ahrlund-Richter, O Hovatta. (2005). Derivation of human embryonic stem cells in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* 23:544-549.
18. Goodarzi A, Y Sahoo, MT Swihart, PN Prasad. (2004). Aqueous Ferrofluid of Citric Acid Coated Magnetite Particles. *Mat Res Soc Symp Proc* 789:661-666.
19. McCarthy JR, R Weissleder. (2008). Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1241-1251.
20. McBain S, HH Yiu, J Dobson. (2008). Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int J Nanomedicine* 3:169-180.
21. Ito A, K Ino, M Hayashida, T Kobayashi, H Matsunuma, H Kagami, M Ueda, H Honda. (2005). Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng* 11:1553-1561.
22. Harrison J, AJ Melville, JS Forsythe, BC Muddle, AO Trounson, KA Gross, R Mollard. (2004). Sintered hydroxyfluorapatites-IV: The effect of fluoride substitutions upon colonization of hydroxyapatites by mouse embryonic stem cells. *Biomaterials* 25:4977-4986.

23. Nur-E-Kamal A, I Ahmed, J Kamal, M Schindler, S Meiners. (2006). Three-dimensional nanofibrillar surfaces promote self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 24:426-433.
24. Niwa H, Y Toyooka, D Shimosato, D Strumpf, K Takahashi, R Yagi, J Rossant. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation. *Cell* 123: 917-929.
25. Loh YH, Q Wu, JL Chew, VB Vega, W Zhang, X Chen, G Bourque, J George, B Leong, J Liu, KY Wong, KW Sung, CW Lee, XD Zhao, KP Chiu, L Lipovich, VA Kuznetsov, P Robson, LW Stanton, CL Wei, Y Ruan, B Lim, HH Ng. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38:431-440.
26. Nichols J, B Zevnik, K Anastassiadis, H Niwa, D Klewe-Nebenius, I Chambers, H Schöler, A Smith. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391.
27. Yeom YI, G Fuhrmann, CE Ovitt, A Brehm, K Ohbo, M Gross, K Hübner, HR Schöler. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122:881-894.
28. Mitsui K, Y Tokuzawa, H Itoh, K Segawa, M Murakami, K Takahashi, M Maruyama, M Maeda, S Yamanaka. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113:631-642.
29. Krejčí J, J Pacherník, A Hampl, P Dvůrák. (2008). In vitro labelling of mouse embryonic stem cells with SPIO nanoparticles. *Gen Physiol Biophys* 27:164-173.

30. Hsiao J, M Tai, H Chu, S Chen, H Li, D Lai, S Hsieh, J Wang, H Liu H. (2007). 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. *Magnetic Resonance in Medicine* 58:717-724.
31. Guzman R, N Uchida, TM Bliss, D He, KK Christopherson, D Stellwagen, A Capela, J Greve, RC Malenka, ME Moseley, TD Palmer, GK Steinberg. (2007). Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *PNAS* 104:10211-10216.
32. Dormer K, C Seeney, K Lewelling, G Lian, D Gibson, M Johnson. (2005). Epithelial internalization of superparamagnetic nanoparticles and response to external magnetic field. *Biomaterials* 26:2061-2072.

Tables

TABLE 1. Sequence of primers used in RT-PCR analysis.

Gene	Primer sequence	Product (bp)	References
Oct-4	F: GCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTTC R: CTCGAACCACATCCTTCTCT	314	[13]
Nanog	F: AGCCAGGTCCTTCCTTCTT R: GCACCCGACTGCTCTTCCGA	192	[13]

TABLE 2. Proliferation parameters of murine embryonic stem cells cultivated in MEF feeder layer.

Total cells number ($\times 10^6$) $\pm$ SD	Seeded cells number ^(a) ($\times 10^5$) $\pm$ SD	Recuperated cells number (N) ($\times 10^6$) $\pm$ SD	Time of incubation (hours) (T)	Generation number (n)	Duplication Time ^(b) (t_d), hours
2.23 $\pm$ 0.10	2.23 $\pm$ 0.10	3.76 $\pm$ 0.45	69	4.1	16.3 $\pm$ 0.5 ^(c)
1.61 $\pm$ 0.10	1.61 $\pm$ 0.10	1.37 $\pm$ 0.12	48	3.1	15.6 $\pm$ 0.3

^(a) Cells were passaged at two cell densities performed in duplicates. These data are representative of one of three set of independent experiments. ^(b) Doubling time was determined from three independent experiments. ^(c) No significant difference was found by t-test ($p=0.09$).

TABLE 3. Proliferation parameters of murine embryonic stem cells cultivated in MF-MNP system.

Total cells number ($\times 10^6$) $\pm$ SD	Seeded cells number ^(a) ($\times 10^5$) $\pm$ SD	Recuperated cells number (N) ($\times 10^6$) $\pm$ SD	Time of incubation (hours) (T)	Generation number (n)	Duplication Time ^(b) (t_d), hours
3.73 $\pm$ 0.33	1.49 $\pm$ 0.21	1.43 $\pm$ 0.12	69	3.26	20.7 $\pm$ 0.7 ^(c)
3.22 $\pm$ 0.12	6.44 $\pm$ 0.16	3.45 $\pm$ 0.10	49	2.42	20.6 $\pm$ 0.4

^(a) Cells were passaged at two cell densities performed in duplicates. These data are representative of one of three set of independent experiments. ^(b) Doubling time was determined from three independent experiments. ^(c) No significant difference was found by t-test ($p=0.91$).

Figures

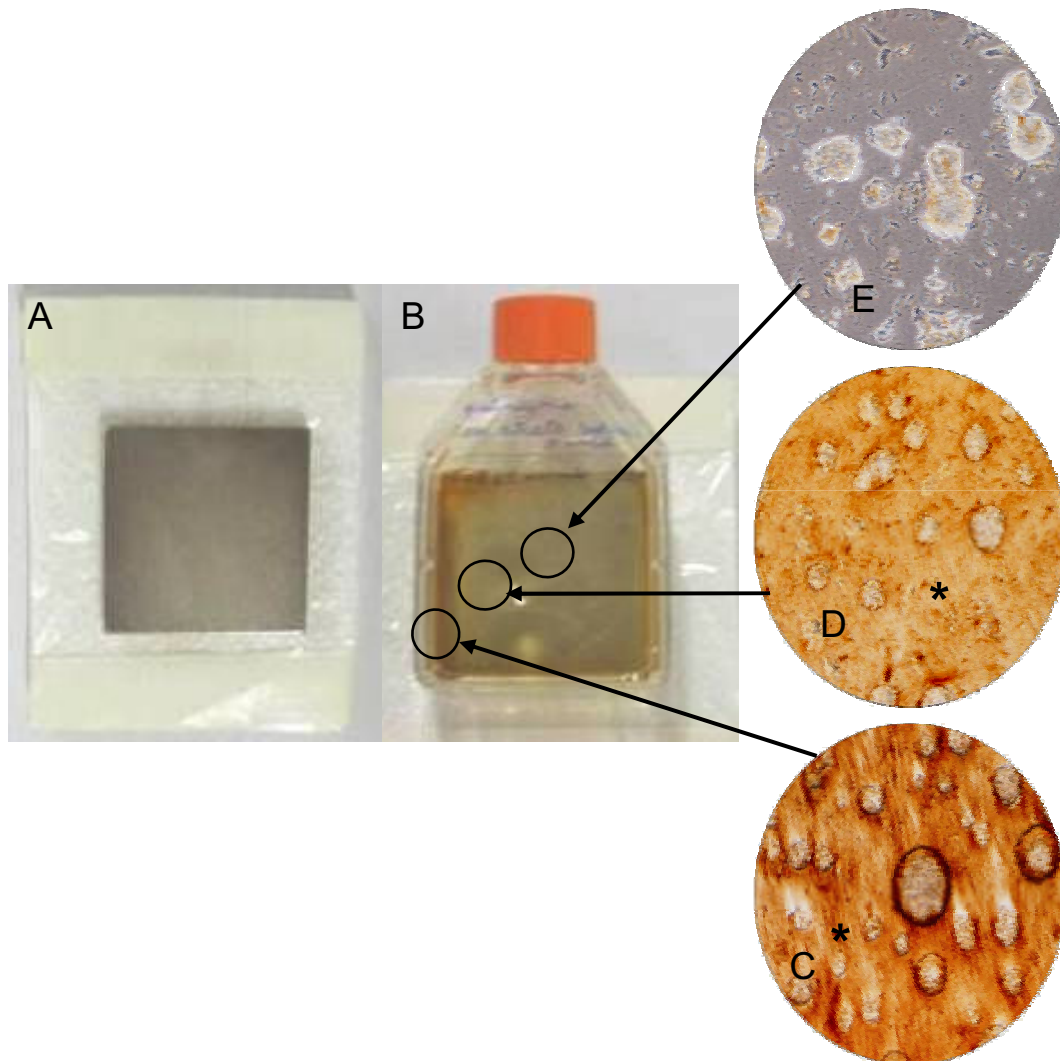


FIG. 1. Magnetic field-magnetic nanoparticle system (MF-MNP) used to grow the mESCs. (A) Neodymium magnet matches exactly to the area from the bottom of Corning™ 25 cm²-culture flasks. (B) Flask placed over the magnet where mESCs are growing in the presence of magnetic nanoparticles. A closer look at cells growing: (C) on the extremities, (D) near the edge and (E) in a middle area of the flask. Due to differences in strength of the magnetic field, nanoparticles are located at the extremities of the flask, where the field lines of the magnet are concentrated. The nanoparticles can be viewed as a brown background (*). (Magnification x100).

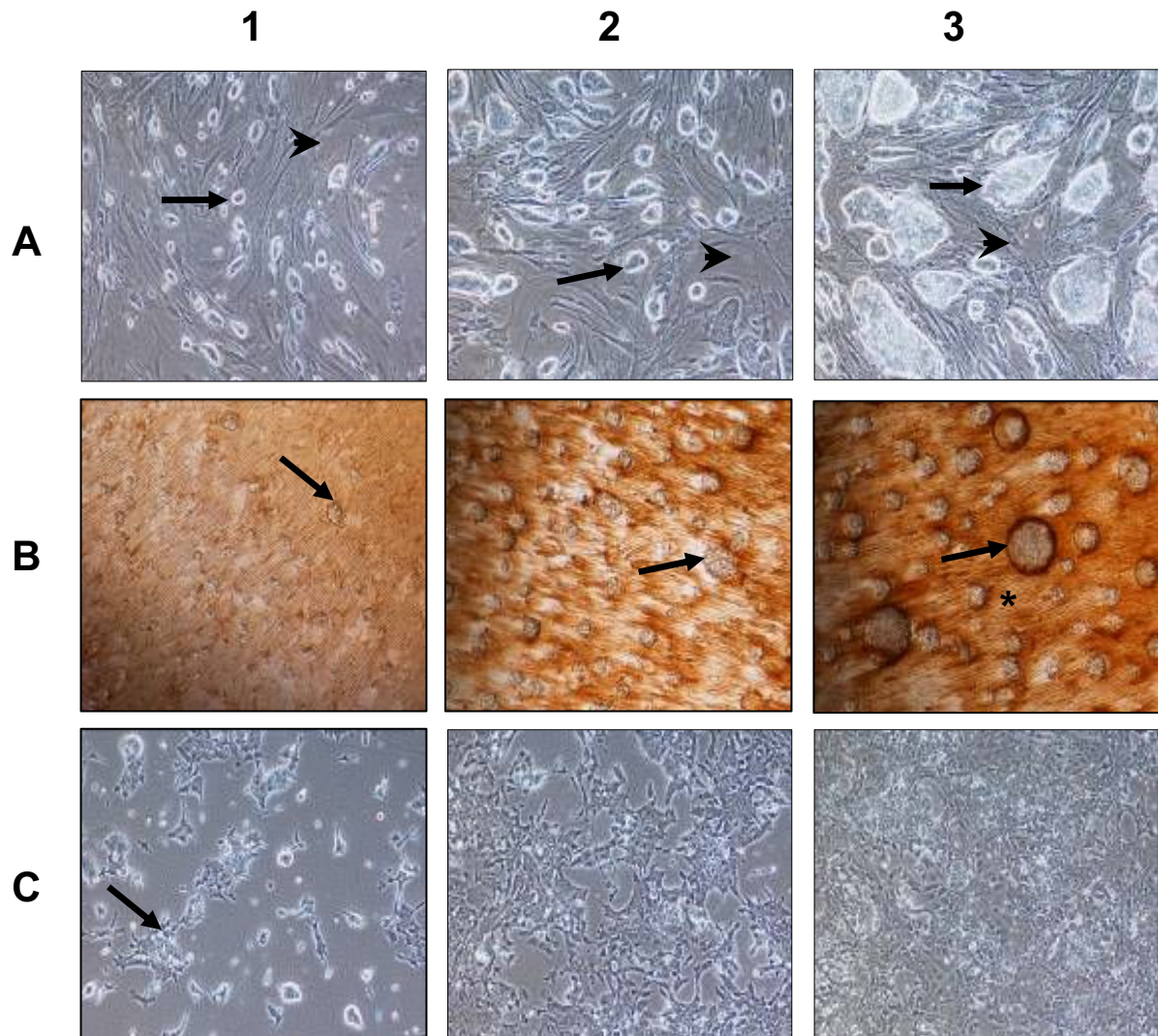


FIG. 2. Murine embryonic stem cells growing in MF-MNP system and monitored at 24 (1), 48 (2) and 72 hours (3). (A) Murine embryonic stem cells growing on a MEF feeder layer. Murine embryonic stem cells can be clearly seen as a syncytial mass (arrows) over a layer of MEF (arrowhead). (B) Murine embryonic stem cells growing on MF-MNP system (arrows). Note the brown background due to the presence of nanoparticles (*). (C) Murine embryonic stem cells growing in 0.1% gelatin-coated flask (arrow). Note that colonies shown signs of differentiation (cells are spreading out and colonies does not have a well defined border). This is a representative result from the six subcultures. (Magnification x100).

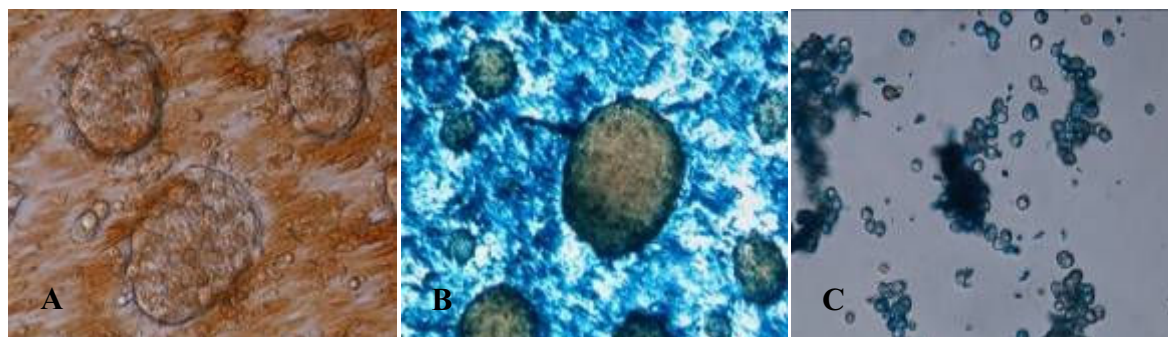


FIG. 3. Prussian blue staining of murine embryonic stem cells grown in the presence of MF-MNP system. (A) Living cells before staining. Prussian blue reaction was performed in (B) fixed colonies followed by (C) enzymatic dissociation to visualize individualized cells. (Magnification x200).

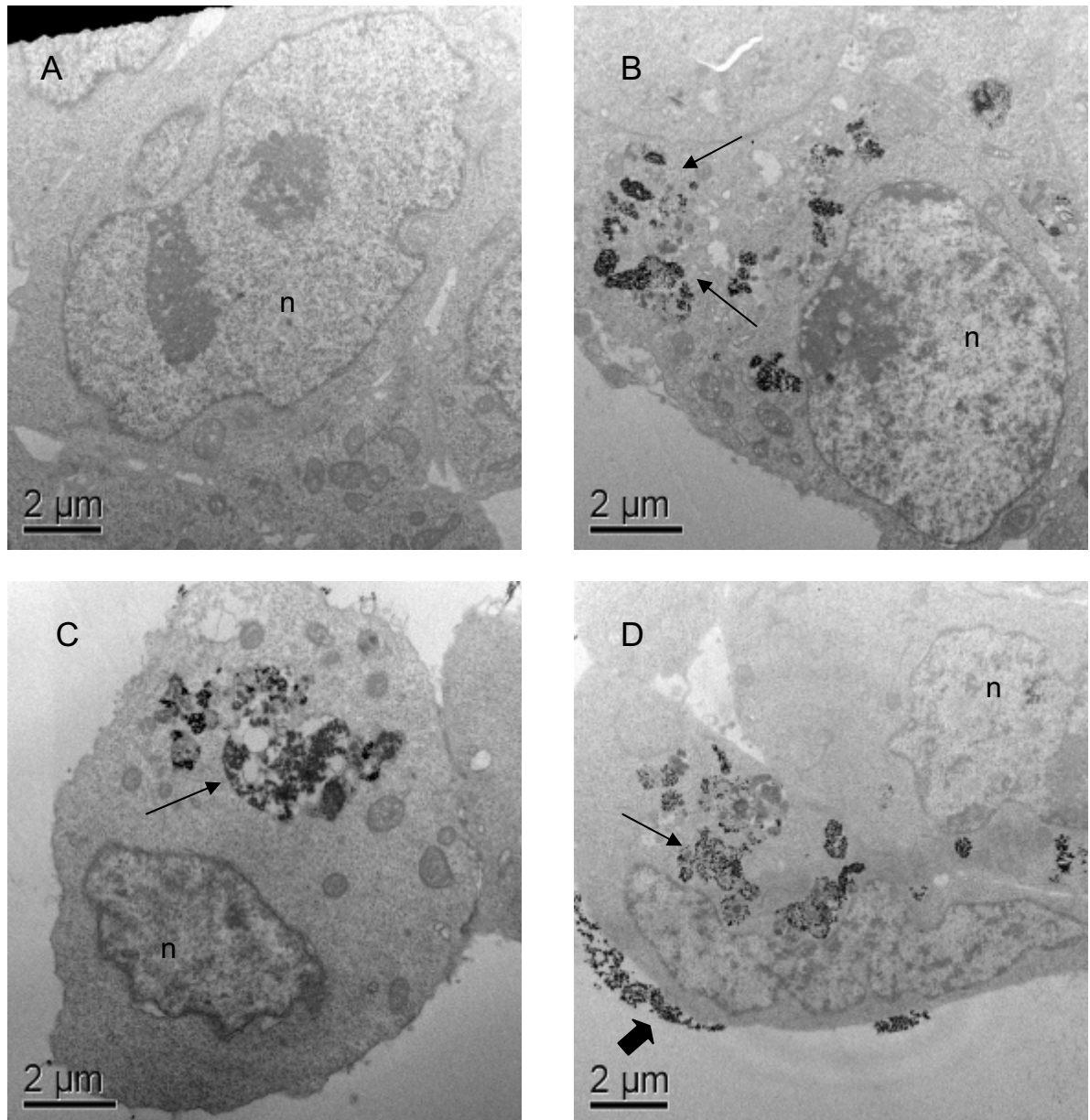


FIG. 4. Transmission electron micrographs of murine embryonic stem cells grown in the presence of MF-MNP system for 72 h at 37°C and 5% CO₂. (A) murine embryonic stem cells grown in the presence of MEF (positive control); (B-C) Magnetic nanoparticles can be seen as agglomerates inside vesicles in cytoplasm (arrows). (D) Besides the presence in the cytoplasm (thin arrow), magnetic nanoparticles can be also observed at the outer face of the plasma membrane (large arrow). Nucleus (n).

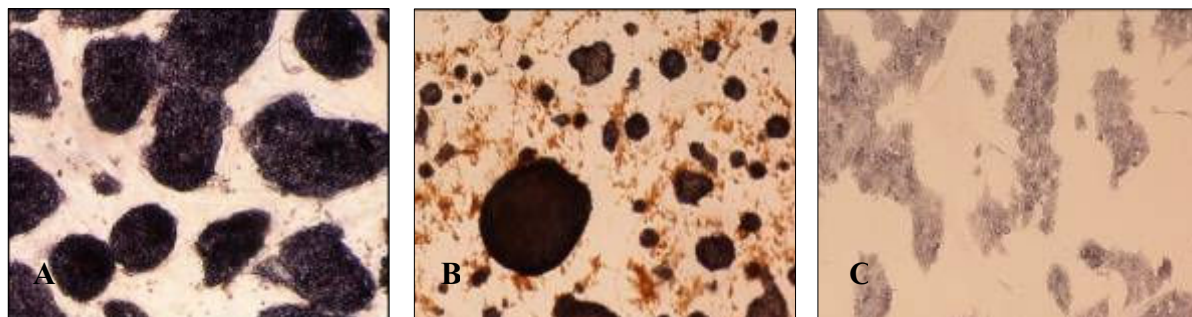


FIG. 5. Alkaline phosphatase staining of mESC grown in the presence of: (A) a mytotically inactivated murine embryonic fibroblasts (positive control); (B) MF-MNP system. Dark areas represent high level of alkaline phosphatase activity (arrows). (C) On the other hand, cells grown in the presence of 0.1% gelatin (negative control), were not stained, since they present a differentiated morphology (arrowheads). All experiments conducted over a period of 48 h incubation at 37°C and 5% CO₂. (Magnification x200).

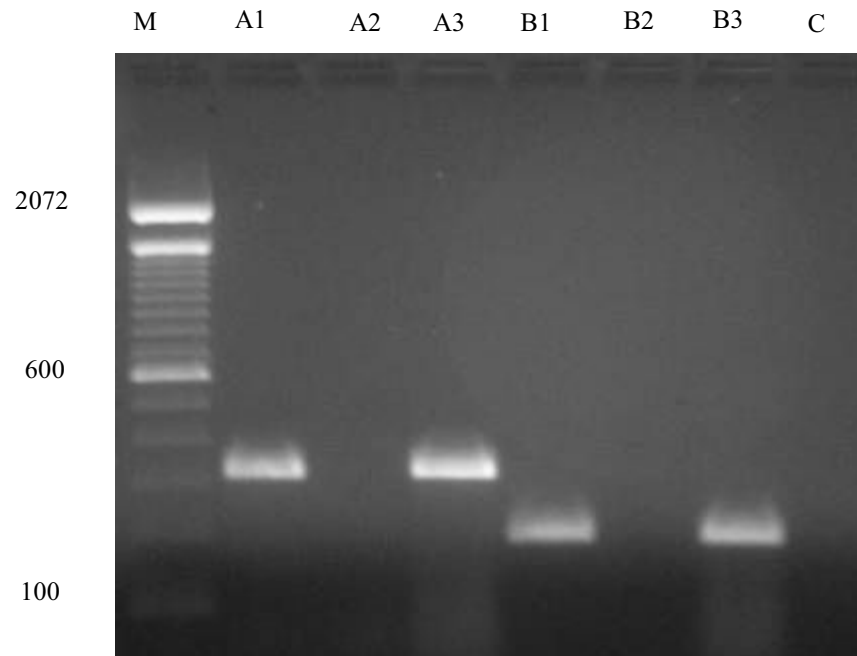


FIG. 6. RT-PCR analysis of genes associated with pluripotency. (A) Oct-4 (314 bp) and (B) Nanog (192 bp) expression of mESC grown in the presence of MF-MNP system (lane 1) and in the presence of mitotically inactivated murine embryonic fibroblasts (lane 3). As controls murine embryonic fibroblasts samples were also included (lane 2). (M) 100 bp DNA ladder. (C) Sample without cDNA (negative control of the PCR reaction). In a companion gel (not show), PCR products of all RT-negative controls were not detected, ruling out the possibility of genomic DNA contamination.

5. ARTIGO III

Erika Regina Leal de Freitas, Bruno Valente Sanches, Maria Lúcia Gambarini, Benedito Dias Oliveira Filho, Lidia Andreu Guillo. **Embryonic stem-like cells derived from in vitro-developed bovine blastocysts.**

Manuscrito submetido na revista *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*

Published by Mary Ann Liebert, Inc. publishers

Latest Impact Factor* is 3.273

* 2008 Journal Citation Reports® published by Thomson Reuters, 2009

Embryonic stem-like cells derived from in vitro-developed bovine blastocysts

Erika Regina Leal de Freitas¹, Bruno Valente Sanches², Maria Lúcia Gambarini², Benedito Dias Olveira Filho², Lidia Andreu Guillo¹.

Affiliation

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brazil.

²Departamento de Produção Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brazil.

Corresponding author

Dr^a. Lidia Andreu Guillo, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Campus II Jardim Samambaia CEP 74001-970, Goiás, Brazil. Phone: 55 62 35211495 Fax: 55 62 35211190. e-mail: guillo@icb.ufg.br.

Abstract

Embryonic stem (ES) cells are derived from the inner cell mass (ICM) of embryos in the blastocyst stage. Methods for the in vitro isolation of ES cells from murine blastocysts are well established. However, it is important that ES cells are isolated from other animals, as cattle, thus contributing to expand the knowledge of the biology of these valuable cells. The objective of this study was to isolate ES cells from the ICM of bovine blastocysts and characterize its pluripotency. For this purpose, 31 fresh blastocysts obtained by in vitro fertilization were used. They are immediately dissected to mechanical removal of the ICM. The isolated ICMs were transferred to a monolayer of murine embryonic fibroblasts (MEF) mitotically inactivated and placed in a CO₂ incubator at 37°C. Six of these 31 ICMs could attach and expand forming several colonies. Ten days after, colonies were mechanically cutted into small pieces and transferred to a new MEF layer. Of these six ICMs, we managed to isolate a cell line with ES-like morphology. Cells could be passaged six times over a 60 days period. The pluripotency of the bovine ES-like cells was confirmed by RT-PCR of Oct-4 and STAT-3 gene markers. In addition, differentiation genes as GATA-4 and Flk-1 were not expressed in our culture. The colonies were weakly stained for alkaline phosphatase. Embryoid bodies were spontaneously formed just after the seventh passage. Our results indicate that ICM could be mechanically isolated from developed blastocysts in vitro to derive cells with embryonic stem-like features.

Introduction

The derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass (ICM) of murine blastocysts [1] has opened a door to a better understanding of some important human diseases, by improving the techniques for the attainment of transgenic animals [2].

The research for the establishment of new ES cell lines from animals is undoubtedly important for studying the basic mechanisms of the biology of such cells, what will bring significative contributions to the regeneration of species under extinction, to genetic improvement and to cure many animal diseases [2].

Embryonic stem cells were already isolated from other animals, such as: mice, hamster [3], pig [4], rat [5], mink [6], cattle [7], equine [8], sheep [9], rabbit [10], nonhuman primates [11], dogs [12], common marmoset [13] and humans [14].

Besides the interest of the agri-business in the use of bovine embryonic stem cells for generating transgenic animals, the isolation and proliferation of these cells in culture amplify the field of research with human stem cells, once cultured bovine ES cells present properties more similar to human ES than the mouse ones [15].

Several methods for isolating ICM have been used to obtain embryonic stem cells. The most popular method is named immunosurgery [16-18]. However this method is not very efficient for the isolation of the ICM from bovine embryos, since the antibodies used are not specific to this animal model [19]. Thus, for obtaining bovine embryonic stem cells, some authors have adopted the mechanical isolation of ICM, since this method has provided good results [20,15].

In this study we aim to isolate and characterize embryonic stem cells from fresh bovine blastocysts obtained by in vitro fertilization. We have chosen to obtain mechanically the ICM, describing a simple technique that could facilitate the isolation of these cells.

Materials and Methods

Embryos

A total of 31 embryos at blastocyst stage were kindly donated from In Vitro Brazil Ltda. Of these, 17 were expanded (Fig. 1A) and 14 were hatched blastocysts (Fig. 1B). Blastocysts were obtained from in vitro fertilization (IVF) and examined under a stereomicroscope for classification regarding stage of development according to the International Embryo Transfer Society standards. All procedures of the embryo development were performed at In Vitro Brazil Ltda, enterprise specialized in IVF. Blastocysts were transferred to PBS supplemented with 10% FBS and immediately processed for isolation of the ICM.

Isolation and culture of murine embryonic fibroblasts

Murine embryonic fibroblasts (MEF), used as a support to expand the mESCs were derived of mouse's embryos. For their isolation, females were sacrificed between the 13th and 14th day of conception. The embryos were isolated and placed in PBS, and after the heads and limbs were removed. The carcasses were washed with PBS, dissociated in 0.25% trypsin/EDTA (Cultilab, Brazil), and placed in culture flasks containing medium DMEM (Gibco-Invitrogen, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Brazil), penicillin (100 UI/ml)/streptomycin (100 µg/ml) (Gibco-Invitrogen, USA) and kept at 37°C and 5% CO₂. After a few days, fibroblasts became visible and are left to grow near the confluence, when they were ready to be frozen and stored for later use. In our hands, a high viability was obtained by freezing fibroblasts directly in a solution containing DMEM (Gibco-Invitrogen, USA), 20% FBS (Cultilab, Brazil) and 10% DMSO (Invitrogen, USA). For using as a feeder for bovine ES-like cells propagation, MEF were cultivated in culture flasks

previously coated with 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) containing DMEM (Gibco- Invitrogen, USA) supplemented with 10% FBS (Cultilab, Brazil), 2mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen, USA) and penicillin (100 UI/ml)/streptomycin (100 µg/ml) (Gibco-Invitrogen, USA). Subcultures were routinely performed every 2 days using 0.05% trypsin/EDTA (Gibco-Invitrogen, USA). The day before mESCs seeding, MEF were mitotically inactivated with 10 µg/ml mitomycin C (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) for 3 h at 37°C and 5% CO₂. The isolation and expansion of MEF was according to standard protocols [21].

Mechanic isolation of the ICM and culture of bovine embryonic stem-like cells

The ICM was isolated manually by microsurgical removal, using two metal needles under a stereomicroscope (Nikon -1500) (Fig. 1C and 1D). One needle was used to hold the blastocyst and the other to cut out the ICM, leaving the ICM free of zona pellucida (ZP) and trophoblast (TE) (Fig. 1E-H). This technique is applied manually, and it does not require any expensive equipment.

The morphologically intact ICM were transferred to a feeder layer of mitotically inactivated murine embryonic fibroblast (MEF) in minimum essential medium α (α -MEM; Invitrogen, USA), supplemented with 15 % FBS (Hyclone; Logan, UT), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen, USA), human leukemia inhibitory factor (LIF) at 10 ng/ml (Esgro, USA), penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (50 µg/ml) and maintained at 37°C with 5% CO₂. The ICM was allowed to grow on the MEF feeder layer for 10 days before the first transfer to a new MEF feeder layer.

Splitting of the bovine ES-like colonies was always performed mechanically at 10 day intervals. Colonies were cut with a housekeeping knife into small pieces and then transferred

onto fresh feeder cells. For passages, only undifferentiated colonies were chosen, as judged by morphology.

Alkaline phosphatase staining

An assay was also performed in order to determine the alkaline phosphatase activity in bovine ES-like cells.

A solution of 5-bromo-4-chloro-3-indol phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) (ROCHE) was prepared, according to manufacturer's specifications. Analysis was performed on cells previously fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. After rinsing with PBS, the BCIP/NBT solution was added and fixed cells were incubated for 30 min in a dark environment. Cells with alkaline phosphatase activity showed a dark blue coloration.

RT-PCR analysis

The characterization of the undifferentiated state of the bovine ES-like cells was performed by RT-PCR.

Total RNA was extracted from bovine ES-like cells using Trizol (Invitrogen, USA), and quantified using a fluorimeter (Qubit™, Invitrogen, USA). Two micrograms were DNase-treated (Invitrogen, USA) for 15 minutes at room temperature. Samples were equally fractionated where one microgram of DNase-treated RNA was reverse-transcribed using Thermo Script RT-PCR™ kit (Invitrogen, USA), according to manufacturer's specifications. RT-negative controls (not reverse-transcribed) were also included. PCR reaction mixture was composed of 0.25 μM of each primer (Table 1), 2 mM MgCl₂, 0.1 mM of each dNTPs, 2.5 U *Taq* Polymerase in 1X PCR buffer (Invitrogen, USA) and 2 μL cDNA in a total volume of 25 μL. The following cycle conditions were applied for STAT-3, GATA-4, Flk-1 primers: an

initial 5 min denaturing at 94°C, followed by 40 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 55°C, 1 min at 72°C and final extension of 10 min at 72°C [22]. Cycle conditions for Oct-4 primer were 5 min at 94°C, followed by 40 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 57°C, 45 s at 72°C and final extension of 7 min at 72°C [8].

The amplified products: 314 bp (Oct-4), 531 bp (STAT-3), 510 bp (GATA-4) and 197 bp (Flk-1) were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel containing ethidium bromide (1 µg/mL). As negative control, sample without cDNA were also used in the PCR reaction.

Results and Discussion

Procedures for isolating ICM and bovine ES-like cells

A total of 17 expanded and 14 hatched blastocysts were used for ICM isolation (Fig. 2A). Within the initial 48 hours six isolated ICM's from 17 expanded blastocysts became attached to MEF layer (Fig. 2B). The ICM's continue to grow (Fig 2C) culminating with the formation of a button in the middle of a large colony (primary colony, Fig. 2D). Ten days after, the primary colony was mechanically dissected as described in Material and Methods, originating the putative ES-like cells (Fig. 2E and 2F). Again, after ten days, these colonies were mechanically dissected into small pieces (Fig. 2G). The pieces were disaggregated into smaller cell clumps by pipetting up and down before transfer onto a new feeder layer. These cells grew and formed flat colonies with well defined boundary (Fig. 2H-J).

These cells were classified as embryonic stem cells according to their morphology, characterized by a small ratio cytoplasm/nucleus, a nucleus with multiple nucleoli, and cytoplasmic vesicles [23-25]. One lineage with these characteristics were established and maintained by six passages for two months in our study. After this period, spontaneous

differentiation has occurred (Fig. 2K) and culminated with the formation of embryoid bodies (EB) (Fig. 2L).

Differentiation could be due to decrease/absence of expression of auto-renewal factors after the first passages, becoming thus difficult the attainment of a permanent cellular line [26]. This was also observed in a study carried by Yadav et al. [27], where isolated bovine ES-like cells were cultivated for a period of two months without exceeding seven passages.

Expression of pluripotency markers by bovine embryonic stem like-cells

In an attempt to characterize these cells, we examined the expression of pluripotency markers.

In our study, colonies did not stain for alkaline phosphatase (AP) (data not show). Alkaline phosphatase activity has been used to identify pluripotent cells in cultures derived from livestock species [28-29]. However, conflicting results have been reported in relation to AP staining in bovine embryonic stem cells. Cao et al. [30] have detected a strong AP activity in both primary bovine ES-like colony and trophoctoderm cells. Yadav et al. [27] have observed a weak or absent AP activity in bovine embryonic ES-like cells. Therefore, AP activity might not be a good pluripotency marker for bovine embryonic stem cells.

We have further examined the level of Oct-4 and STAT-3 gene expression. Results can be seen at Figure 3. Fragments of 314 bp (Oct-4) and 531 bp (STAT-3) were amplified, thus indicating that our colonies were formed by cells in undifferentiated state. Oct-4 is a critical POU transcription factor frequently used as marker for undifferentiated cells. High expression levels have been found in human ES cells [31], mouse ES cells [32], equine ES cells [8] and bovine ES cells [20].

Kurosaka et al. [22], showed that the Oct-4 mRNA expression pattern was restricted to ICM cells in bovine blastocysts. Therefore, Oct-4 transcription factor was a suitable marker for the identification of pluripotent cells in cattle.

STAT-3 is another key regulator for self-renewal of ESC in mouse [33] and it was also expressed in bovine ES cells [20].

Some endoderm and mesoderm gene markers as GATA-4 and Flk-1, respectively, were also assayed by RT-PCR, since they have been used to in vitro progression of ESCs cultures to EB formation [34]. These genes were not expressed in our ES-like cells grown until the seventh passage confirming the undifferentiated state of these cells.

However, as reported recently by Cao et al. [30], the pathways needed to maintain the undifferentiated state of bovine ES cells seem to differ from that ones for mouse and human. Therefore it is important that further studies aimed at isolation of bovine stem cells are encouraged.

Future studies will be carried by us to optimize the derivation technique to expand the culture period and increase the number of passages.

Acknowledgments

This work was financially supported by protocol nº 552593/2005-2 from Ministry of Health and from National Research Council (CNPq) of Brazil. The authors wish to thank to Dr. Mário Approbato (Laboratório de Reprodução Humana/UFG) for assistance on initial experimental delineation of embryo's obtainment. We also thank to Jane Porfírio and Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva for valuable collaboration in initial experiments. Authors thank to In Vitro Brasil Ltda for donation of embryos.

References

1. Evans MJ and MH Kaufman. (1981). Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
2. Wheeler MB, EM Walters, SG Clark. (2003). Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. *Anim Reprod Sci* 79:265-289.
3. Doetschman T, P Williams, N Maeda. (1988). Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 127:224-227.
4. Notarianni E, S Laurie, RM Moor, MJ Evans. (1990). Maintenance and differentiation in culture of pluripotent embryonic cell lines from pig blastocysts. *J Reprod Fertil Suppl* 41:51-56.
5. Iannaccone PM, GU Taborn, RL Garton, MD Caplice, DR Brenin. (1994). Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol* 163:288-292.
6. Sukoyan MA, SY Vatolin, AN Golubitsa, AI Zhelezova, LA Semenova, OL Serov. (1993). Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev* 36:148-158.
7. Strelchenko N, S Saito, H Niemann. (1991). Towards the establishment of bovine embryonic stem cells. *Theriogenology* 35:274.

8. Saito S, H Ugai, K Sawai, Y Yamamoto, A Minamihashi, K Kurosaka, Y Kobayashi, T Murata, Y Obata, K Yokoyama. (2002). Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. *FEBS Lett* 531:389-396.
9. Notarianni E, C Galli, S Laurie, RM Moor, MJ Evans. (1991). Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 43:255-260.
10. Graves KH and RW Moreadith. (1993). Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* 36:424-433.
11. Thomson JA, J Kalishman, TG Golos, M Durning, CP Harris, RA Becker, JP Hearn. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7844-7848.
12. Hatoya S, R Torii, Y Kondo, T Okuno, K Kobayashi, V Wijewardana, N Kawate, H Tamada, T Sawada, D Kumagai, K Sugiura, T Inaba. (2006). Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 73:298-305.
13. Thomson JA, J Kalishman, TG Golos, M Durning, CP Harris, JP Hearn. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 55:254-259.

14. Thomson JA, J Itskovitz-Eldor, SS Shapiro, MA Waknitz, JJ Swiergiel, VS Marshall, JM Jones. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
15. Wang L, E Duan, LY Sung, BS Jeong, X Yang, XC Tian. (2005). Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol Reprod* 73:149-155.
16. Heins N, MC Englund, C Sjöblom, U Dahl, A Tonning, C Bergh, A Lindahl, C Hanson, H Semb. (2004). Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22:367-376.
17. Kim HS, SK Oh, YB Park, HJ Ahn, KC Sung, MJ Kang, LA Lee, CS Suh, SH Kim, DW Kim, SY Moon. (2005). Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23:1228-1233.
18. Chiang SK, HH Chang, YW Ou, P Intawicha, SP Cheng, LR Chen, KH Lee, J Giles, JC Ju. (2008). Successful induction of antisera against rabbit embryos for isolation of the ICM and putative embryonic stem cells. *Reprod Domest Anim* 43:181-188.
19. Strelchenko N. (1996). Bovine pluripotent stem cells. *Theriogenology* 45:131-140.
20. Saito S, K Sawai, H Ugai, S Moriyasu, A Minamihashi, Y Yamamoto, H Hirayama, S Kageyama, J Pan, T Murata, Y Kobayashi, Y Obata, KK Yokoyama. (2003). Generation

- of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 309:104-113.
21. Bryja V, S Bonilla, E Arenas. (2006). Derivation of mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 1:2082-2087.
 22. Kurosaka S, S Eckardt, KJ McLaughlin. (2004). Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. *Biol Reprod* 71:1578-1582.
 23. Stice SL, NS Strelchenko, CL Keefer, L Matthews. (1996). Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod* 54:100-110.
 24. Cibelli JB, SL Stice, PJ Golueke, JJ Kane, J Jerry, C Blackwell, FA Ponce de León, JM Robl. (1998). Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* 16:642-646.
 25. Mitalipova M, Z Beyhan, NL First. (2001). Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. *Cloning* 3:59-67.
 26. Gjørret JO and P Maddox-Hyttel. (2005). Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. *Reprod Fertil Dev* 17:113-124.
 27. Yadav PS, WA Kues, D Herrmann, JW Carnwath, H Niemann. (2005). Bovine ICM derived cells express the Oct4 ortholog. *Mol Reprod Dev* 72:182-190.

28. Talbot NC, TJ Caperna, JL Edwards, W Garrett, KD Wells, AD Ealy. (2000). Bovine blastocyst-derived trophectoderm and endoderm cell cultures: interferon tau and transferrin expression as respective in vitro markers. *Biol Reprod* 62:235-247.
29. Li M, D Zhang, Y Hou, L Jiao, X Zheng, WH Wang. (2003). Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 65:429-434.
30. Cao S, F Wang, Z Chen, Z Liu, C Mei, H Wu, J Huang, C Li, L Zhou, L Liu. (2009). Isolation and culture of primary bovine embryonic stem cell colonies by a novel method. *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol* 311:368-376.
31. Reubinoff BE, MF Pera, CY Fong, A Trounson, A Bongso. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18:399-404.
32. Berrill A, HL Tan, SC Wuang, WJ Fong, AB Choo, SK Oh. (2004). Assessment of Stem Cell Markers During Long-Term Culture of Mouse Embryonic Stem Cells. *Cytotechnology* 44:77-91.
33. Matsuda T, T Nakamura, K Nakao, T Arai, M Katsuki, T Heike, T Yokota. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18:4261-4269.
34. Koike M, S Sakaki, Y Amano, H Kurosawa. (2007). Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies. *J Biosci Bioeng* 104:294-299.

Tables

TABLE 1. Sequence of primers used in RT-PCR analysis.

Gene	Primer sequence	Product (bp)	References
Oct-4	F: GGTTCTCTTTGGAAAGGTGTC R: ACACTCGGACCACGTCTTTC	314	[22]
STAT-3	F: TCTGGCTAGACAATATCATCGACCTTG R: TTATTTCCAAACTGCATCAATGAATCT	531	[8]
GATA-4	F: CTCTGGAGGCGAGATGGGACGGG R: GAGCGGTCATGTAGAGGCCGGCAGGCATT	510	[8]
Flk-1	F: CTGCCTACCTCACCTGTTTCCTGTATGG R: GGATATCTTGAAATGTTTTTACACTCAC	197	[8]

Figures

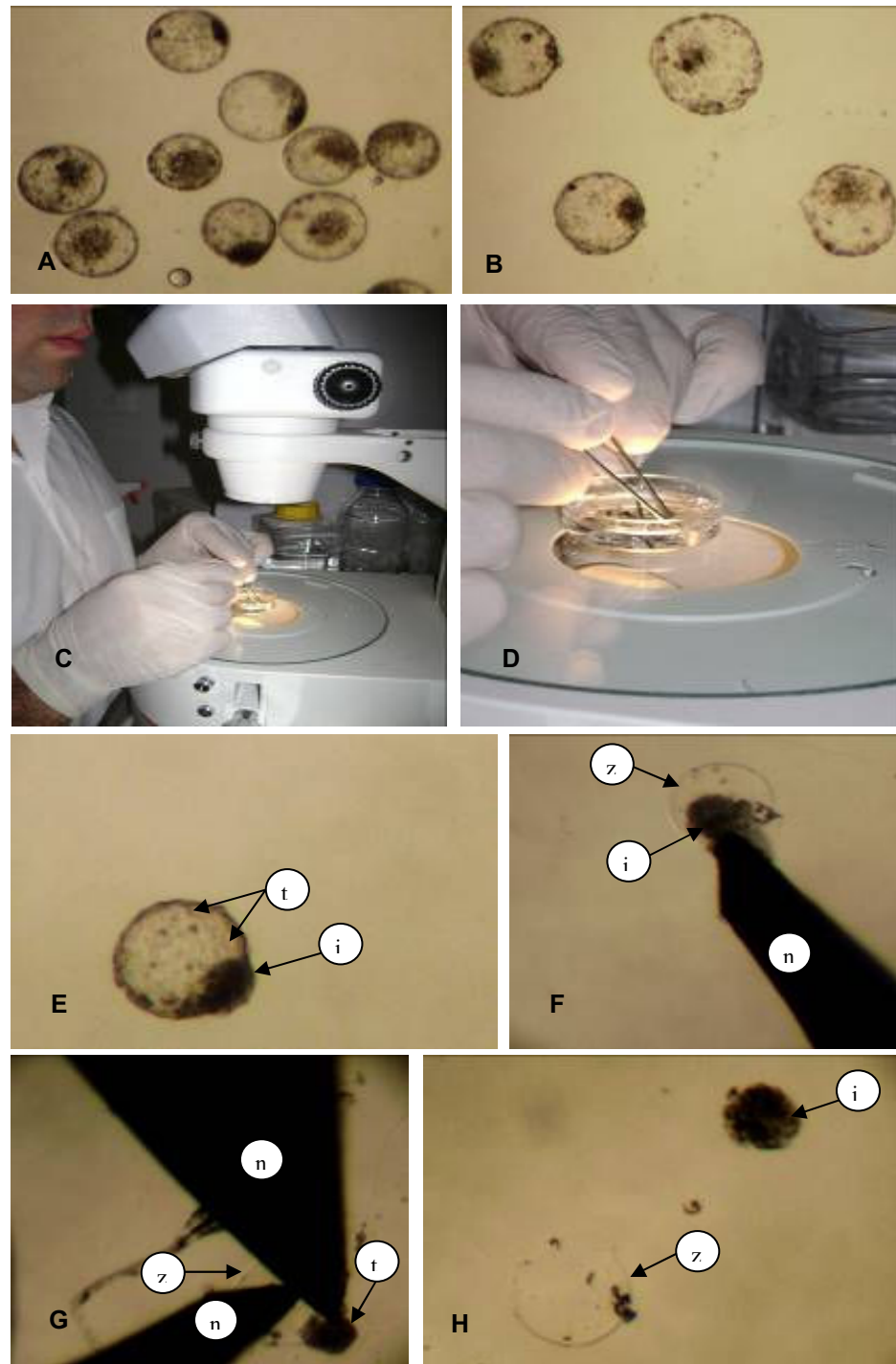


FIG. 1. Bovine ICM isolated mechanically. (A) Expanded blastocysts. (B) Hatched blastocysts. (C-D) Microsurgical removal of ICM using two metal needles for manual operation under a stereo-microscope. (E) One expanded blastocysts showing ICM (i) and trophoblast cells (t). (F) One needle (n) was used to hold the blastocyst and (G) another needle to make a hole in the zona pellucida (z) to open up the blastocyst and (H) to separate the ICM from the zona pellucida and trophoblasts cells.

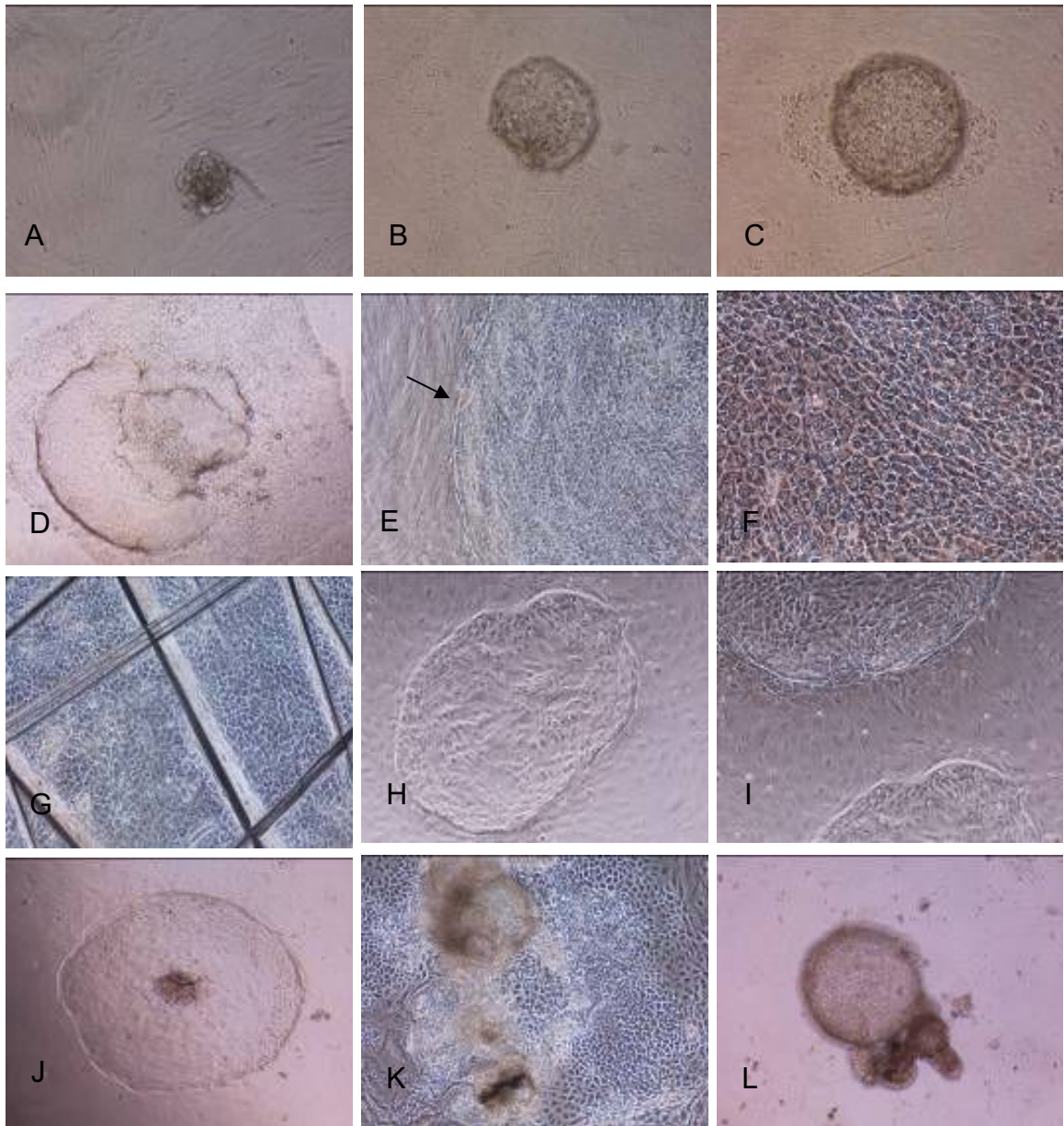


FIG. 2. Phase contrast micrographs of bovine ES-like cells and their differentiated derivatives. (A) A fresh isolated ICM over a MEF layer. (B) ICM expansion after attachment to MEF layer. (C) ICM outgrowth after 48 h isolation. (D) Formation of a button in the middle of a large colony (primary colony). (E) Bovine ES-like cell colony after the first passage. Note the defined demarcation boundary of colony (arrow). (F) A higher magnification at the middle of the colony shown in (E). (G) Mechanical cut of bovine ES-like colony. (H-J) Flat colonies of bovine ES-like cells. (K) Bovine ES-like colony undergoing spontaneous differentiation. (L) Embryoid body (EB) from differentiated bovine ES-like cells. (Magnification: x200 (A-C, F) and x100 (D-E, G-L)).

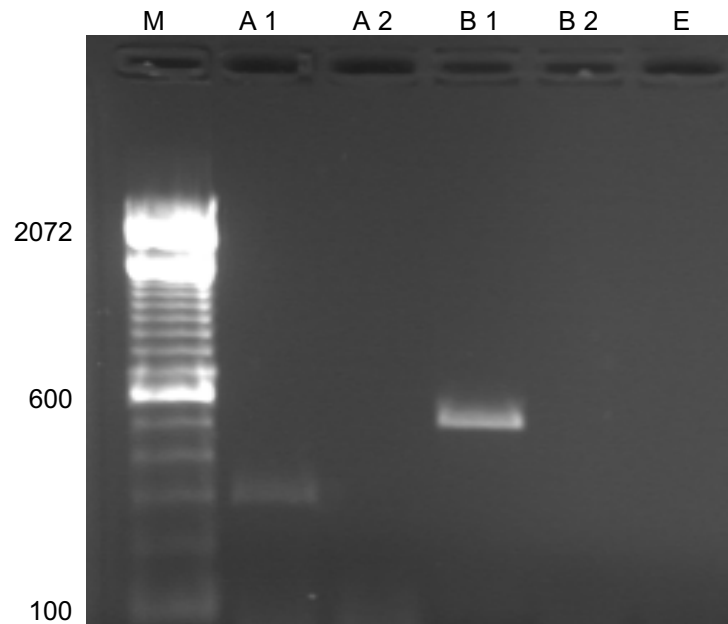


FIG. 3. RT-PCR analysis of genes associated with pluripotency during isolation of bovine ES-like cells. PCR product of DNase-treated RNA reverse-transcribed (lane 1) and without reverse-transcriptase to rule out genomic DNA contamination (lane 2). (A) Oct-4 (314 bp) and (B) STAT-3 (531 bp). (M) 100 bp DNA Ladder. (E) Sample without cDNA (negative control of the PCR reaction).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os estudos de viabilidade celular na presença de NPM empregando-se o ensaio de MTT demonstraram que células de melanoma humano tratadas com NPM funcionalizadas com citrato apresentaram um valor para IC_{50} de 433 μ g de ferro/ml. Para células tratadas com NPM funcionalizadas com ácido láurico o valor encontrado foi de 254 μ g de ferro/ml. Por outro lado, não foi observado nenhum efeito significativo na viabilidade celular para concentrações testadas (0,11 – 2,26 mg de ferro/ml) de NPM funcionalizadas com DMSA, sugerindo que as mesmas não causam citotoxicidade em células de melanoma humano. O alto valor de IC_{50} observado para as NPM funcionalizadas com citrato demonstrou que estas poderiam ser consideradas como não citotóxicas para células de melanoma humano.

Após análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão de células de melanoma tratadas com NPM funcionalizadas com DMSA na concentração de 1,58 mg de ferro/ml e com citrato na concentração de 606 μ g de ferro/ml, foi possível visualizar a membrana plasmática intacta e o núcleo com a cromatina homogeneamente distribuída, observando-se a presença de nanopartículas somente dentro de vesículas no citoplasma. Células tratadas com NPM funcionalizadas com ácido láurico na concentração de 588 μ g de ferro/ml claramente apresentaram *blebs* e grandes vacúolos sugerindo um evento apoptótico.

Os estudos de citotoxicidade foram complementados com experimentos de eletroforese em gel de agarose de DNA extraído das células de melanoma tratadas com NPM funcionalizadas com ácido láurico na concentração de 840 μ g de ferro/ml e citrato na concentração de 866 μ g de ferro/ml. Os resultados demonstraram que o DNA isolado após 24 e 48 horas de incubação não apresentou fragmentação. O DNA isolado após 72 horas de incubação com nanopartículas funcionalizadas com ácido láurico apresentou fragmentação característica de apoptose. Diante dos resultados encontrados após o estudo de citotoxicidade,

conclui-se que, NPM funcionalizadas com ácido láurico apresentam um potencial para estudos que visem ao tratamento do câncer.

Os estudos acima confirmaram a não citotoxicidade de NPM funcionalizadas com citrato, sendo, portanto, utilizadas neste trabalho para expandir células mES na ausência de monocamada de MEF. Para o sistema de cultura, as NPM eram adicionadas em um frasco de cultura contendo meio enriquecido com soro fetal e LIF. Nesse meio, as nanopartículas se ligavam às células mES, as quais, devido à presença de um campo magnético externo, aderiam ao frasco, podendo então ser cultivadas e mantidas no estado indiferenciado. A morfologia das células mES cultivadas nesse sistema foi monitorada após seis subcultivos, ao longo de 24, 48 e 72 horas de incubação. Observou-se que células crescidas na monocamada de MEF ou na presença das nanopartículas após 24 e 48 horas de incubação, apresentavam aproximadamente o mesmo número de colônias indiferenciadas. Porém, após 72 horas, as células cultivadas na monocamada de MEF já apresentavam sinais de diferenciação, enquanto que as células crescidas na presença das nanopartículas apresentavam morfologia de células indiferenciadas. Ainda, as células mES cultivadas em frasco com 0,1% de gelatina na ausência de monocamada de MEF e nanopartículas, apresentaram diferenciação com 24 horas de incubação, como esperado.

O tempo de duplicação das células mES cultivadas em monocamada de MEF foi de $15,95 \pm 0,21$ horas e estava de acordo com o descrito pela literatura (BERRILL et al., 2004), enquanto que, o tempo de duplicação para as células mES cultivadas na presença de nanopartículas foi de $20,67 \pm 0,19$ horas. Embora esse tempo fosse um pouco superior ao encontrado para as células cultivadas em monocamada de MEF, não houve alteração da morfologia das células, que continuaram no estado indiferenciado durante os seis subcultivos.

A presença das NPM no interior das células mES foi confirmada pelo ensaio de Prussian blue e análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão. Foi possível

observar a localização das NPM no citoplasma, bem como, na parte externa da membrana. Não foi observada a sua presença no núcleo, assim como não observamos a formação de corpos apoptóticos e/ou fragmentação da cromatina.

Células mES cultivadas na presença de NPM mantiveram seu estado indiferenciado, o que foi comprovado pela alta atividade de fosfatase alcalina e expressão de altos níveis de transcritos marcadores do estado indiferenciado tais como Oct-4 e Nanog, por RT-PCR. Altos níveis de atividade de fosfatase alcalina e expressão dos transcritos de indiferenciação também foram encontrados em células mES cultivadas em monocamada de MEF (controle positivo).

Portanto, como demonstrado nesse estudo, células ES podem ser cultivadas na presença de NPM e campo magnético externo, abrindo assim a possibilidade de utilização desse sistema de cultivo para expandir hES na ausência de monocamada de MEF, eliminando o risco de contaminação por patógenos animais, contribuindo assim para um futuro uso clínico das células hES. Em adição, células hES marcadas com NPM poderiam ser direcionadas através de um campo magnético externo para um local específico do corpo, permanecendo o tempo necessário para que ocorra a regeneração do tecido. Ainda, para a efetiva diferenciação *in vivo* das células hES, proteínas e fatores de crescimento poderiam ser associados a essas NPM e carregados ao tecido alvo.

Ainda com o objetivo de tentar elucidar alguns aspectos básicos da biologia das células ES e padronizar uma metodologia de isolamento rápida e de baixo custo, uma linhagem de células ES foi isolada a partir de 31 blastocistos bovinos frescos produzidos por FIV.

A pluripotência das células bES isoladas foi determinada e confirmada pela expressão de transcritos marcadores de indiferenciação tais como Oct-4 e STAT-3, por RT-PCR. A

expressão de transcritos marcadores para endoderme (GATA-4) e mesoderme (Flk-1) não foi observada.

A linhagem foi mantida por seis subcultivos ao longo de um período de dois meses, ocorrendo após esse período uma diferenciação espontânea com a formação de corpos embrióides, característicos de células ES. A indução do processo de diferenciação pode ser devido à diminuição ou ausência da expressão de fatores de auto-renovação logo após as primeiras passagens, tornando-se difícil a obtenção de uma linhagem celular permanente. Resultado semelhante também foi encontrado por Yadav et al. (2005), onde as células bES isoladas foram mantidas ao longo de dois meses, não excedendo sete passagens.

Assim, futuros estudos devem ser realizados para aperfeiçoar a técnica de isolamento. Com isso, será possível aumentar o número de passagens, obtendo-se uma linhagem contínua, a qual poderia ser um modelo mais próximo ao humano em estudos envolvendo NPM e células ES com finalidades terapêuticas.

7. CONCLUSÕES

1. As nanopartículas magnéticas funcionalizadas com ácido láurico possuem efeito antiproliferativo *in vitro* sobre células de melanoma humano, fato não observado para nanopartículas funcionalizadas com DMSA e citrato.
2. Nanopartículas funcionalizadas com citrato foram utilizadas como suporte para expandir *in vitro* células tronco embrionária murinas.
3. A pluripotência das células tronco embrionárias murinas mantidas na presença das NPM foi confirmada pela expressão de transcritos de indiferenciação (Oct-4 e Nanog), pela alta atividade de fosfatase alcalina e ausência de alterações morfológicas ultra-estruturais na célula.
4. Uma linhagem de células tronco embrionárias bovinas foi isolada e mantida por até seis passagens, sendo a mesma caracterizada quanto à expressão de transcritos de indiferenciação (Oct-4 e STAT-3).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, E. et al. Expansion of mouse embryonic stem cells on microcarriers.

Biotechnol Bioeng, v. 96, n. 6, p. 1211-1221, 2007.

AEPLI, G.; PANKHURST, Q. Launch of the London Centre for Nanotechnology.

Nanomed, v. 1, n. 4, p. 393-398, 2006.

AMIT, M.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. **J Anat**, v. 200, n. 3, p. 225-232, 2002.

AMIT, M. et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. **Dev Biol**, v. 227, n. 2, p. 271-278, 2000.

BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **J. Phys. D: Appl. Phys**, v. 36, p. 198-206, 2003.

BERRILL, A. et al. Assessment of Stem Cell Markers During Long-Term Culture of Mouse Embryonic Stem Cells. **Cytotechnology**, v. 44, p. 77-91, 2004.

BETTS, D. et al. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, n. 3, p. 1077-1082, 2001.

BHATIA, M. et al. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, n. 10, p. 5320-5325, 1997.

BISWAS, A.; HUTCHINS, R. Embryonic stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 16, n. 2, p. 213-222, 2007.

BOEUF, H. et al. Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. **J Cell Biol**, v. 138, n. 6, p. 1207-1217, 1997.

BOHELER, K. R. et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. **Circ Res**, v.91, n. 3, p. 189-201, 2002.

BOIANI, M.; SCHOLER, H. R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 872-884, 2005.

BRADLEY, A. et al. Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature**, v. 309, p. 255-256, 1984.

BRYJA, V.; BONILLA, S.; ARENAS, E. Derivation of mouse embryonic stem cells. **Nat Protoc**, v. 1, n. 4, p. 2082-2087, 2006.

BULTE, J. W.; KRAITCHMAN, D. L. Monitoring cell therapy using iron oxide MR contrast agents. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 5, n. 6, p. 567-584, 2004.

BUDDE, M. D.; FRANK, J. A. Magnetic Tagging of Therapeutic Cells for MRI. **J Nucl Med**, v. 50, n. 2, p.171-174, 2009.

BURDON, T. et al. Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. **Cells Tissues Organs**, v. 165, n. 3-4, p. 131-143, 1999.

BURDON, T.; SMITH, A.; SAVATIER, P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. **Trends Cell Biol**, v. 12, n. 9, p. 432-438, 2002.

CARPENTER, M. K. et al. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. **Exp Neurol**, v. 172, n. 2, p. 383-397, 2001.

CARPENTER, M. K.; ROSLER, E.; RAO, M. S. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. **Cloning Stem Cells**, v. 5, n. 1, p. 79-88, 2003.

CHAMBERS, I. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p.643-655, 2003.

CORMIER, J. T. et al. Expansion of undifferentiated murine embryonic stem cells as aggregates in suspension culture bioreactors. **Tissue Eng**, v. 12, n. 11, p. 3233-3245, 2006.

CZYZ, J. et al. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. **Biol Chem**, v. 384, n.10-11, p. 1391-409, 2003.

DARR, H.; BENVENISTY, N. Factors involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. In: WOBUS, A.; BOHELER, K. **Stem cells**. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2006, p. 1-19.

DAVIS, S. S. Biomedical applications of nanotechnology – implications for drug targeting and gene therapy. **Trends Biotechnol**, v. 15, p. 217-224, 1997.

DE CUYPER, M.; JONIAU, M. Magnetoliposomes. Formation and structural characterization. **Eur Biophys J**, v. 15, n. 5, p. 311-319, 1988.

DERDA, R. et al. Defined substrates for human embryonic stem cell growth identified from surface arrays. **ACS Chem Biol**, v. 2, n. 5, p. 347-355, 2007.

DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Drug Devel Res**, v. 67, n. 1, p. 55-60, 2006.

DOUZIECH-EYROLLES, L. et al. Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 541-550, 2007.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981

EVANS, M. J. et al. Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell lines from porcine and bovine blastocyst. **Theriogenology**, v. 33, p. 125-128, 1990.

FERNANDES, A. M. et al. Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 6, p. 515-522, 2009.

FERREIRA, L. et al. New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 2, p. 136-146, 2008.

FISCHBACH, G. D.; FISCHBACH, R. L. Stem cells: science, policy, and ethics. **J Clin Invest**, v. 114, n. 10, p. 1364-1370, 2004.

FOK, E.Y.; ZANSTRA, P. W. Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. **Stem Cells**, v. 23, n. 9, p. 1333-1342, 2005.

FREEMAN, J. A.; GEER, J. C. Intestinal fat and iron transport, goblet cell mucus secretion, and cellular changes in protein deficiency observed with the electron microscope. **Am J Dig Dis**, v. 10, n. 12, p. 1005-1025, 1965.

GERECHT-NIR, S.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. Human embryonic stem cells: a potential source for cellular therapy. **Am J Transplant**, v. 6, p. 51-57, 2004.

GINIS, I. et al. Differences between human and mouse embryonic stem cells. **Dev Biol**, v. 269, n. 2, p. 360-380, 2004.

GJORRET, J. O.; MADDUX-HYTTEL, P. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. **Reprod Fertil Dev**, v.17, n.1-2, p. 113-124, 2005.

GOODWIN, S. C.; PETERSON, C. L.; HOH, C. Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy. **J Magnetism Magn Materials**, v. 194, p.132–139, 1999.

GOONERATNE, C. P.; MUKHOPADHYAY, S. C.; YAMADA, S. An SV-GMR Needle Sensor-Based Estimation of Volume Density of Magnetic Fluid inside Human Body. **J Sensor**, v. 2008, p. 1-7, 2008.

GORDON, R. T.; HINES, J. R.; GORDON, D. Intracellular hyperthermia. A biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations. **Med Hypothesis**, v. 5, p. 83-102, 1979.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.

HALAVAARA, J. et al. Efficacy of sequential use of superparamagnetic iron oxide and gadolinium in liver MR imaging. **Acta Radiol**, v. 43, n. 2, p. 180-185, 2002.

HOFFMAN, L. M.; CARPENTER, M. K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 6, p. 699-708, 2005.

HESCHELER, J. et al. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. **Cardiovasc Res**, v. 36, n. 2, p. 149–162, 1997.

HOLTZER, H. Cell lineages, stem cells and the "quantal" cell cycle concept. In: LORD, B. I.; POTTEN, C. S.; COLE, R. J. **Stem Cells and Tissue Homeostasis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1978, p. 1-27.

HOU, L.; HONG, T. Stem cells and neurodegenerative diseases. **Sci China C Life Sci**, v. 51, n. 4, p. 287-294, 2008.

HWANG, W. S. et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. **Science**, v. 303, n. 5664, p. 1669-1674, 2004.

HUH, Y. M. et al. In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. **J Am Chem Soc**, v. 127, n. 35, p. 12387-12391, 2005.

ITO, A. et al. A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles. **Biochem Eng J**, v. 20, p. 119–125, 2004a.

ITO, A. et al. Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of cocultured hepatocytes and endothelial cells. **Tissue Eng**, v. 10, n. 5-6, p. 833-840, 2004b.

ITO, A. et al. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. **J Biosci Bioeng**, v. 100, n. 1, p. 1-11, 2005a.

ITO, A. et al. Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. **Tissue Eng**, v. 11, n. 9-10, p. 1553-1561, 2005b.

ITSKOVITZ-ELDOR, J. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. **Mol Med**, v. 6, n. 2, p. 88-95, 2000.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, p. 41-49, 2002.

JOHANNSEN, M. et al. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. **Int J Hyperthermia**, v. 21, n. 7, p. 637-647, 2005.

KANEMATSU, M. et al. Imaging liver metastases: review and update. **Eur J Radiol**, v. 58, n. 2, p. 217-228, 2006.

KAWAI, T. et al. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. **Circ J**, v. 68, n. 7, p. 691–702, 2004.

KELLER, T. M. et al. USPIO-enhanced MRI for preoperative staging of gynecological pelvic tumors: preliminary results. **Eur Radiol**, v. 14, n. 6, p. 937-944, 2004.

KIM, H. S. et al. Methods for derivation of human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 9, p. 1228-1233, 2005.

KIM, J. H. et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 50–56, 2002.

KODA, J. et al. Phase I/II trial of hepatic intraarterial delivery of doxorubicin hydrochloride adsorbed to magnetic targeted carriers in patients with hepatocarcinoma. **Eur J Cancer**, v. 38, p. 18, 2002.

KROTZ, F. et al. Magnetofection-a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. **Mol Ther**, v. 7, p. 700-710, 2003a.

KROTZ, F. Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. **Vasc Res**, v. 40, n. 5, p. 425-434, 2003b.

KUBO, T. et al. Targeted systemic chemotherapy using magnetic liposomes with incorporated adriamycin for osteosarcoma in hamsters. **Int J Oncol**, v. 18, n. 1, p. 121-125, 2001.

LACAVA, L. M. et al. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. **J Magn Magn Mater**, v. 272-276, p. 2434-2435, 2004.

LEE, J. B. et al. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. **Reproduction**, v. 128, n. 6, p. 727-735, 2004.

LEE, J. B. et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. **Biol Reprod**, v. 72, n. 1, p. 42-49, 2005.

LI, X. J. et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 2, p. 215–221, 2005.

LOK, C. Picture perfect. **Nature**, v. 412, n. 6845, p. 372-374, 2001.

LUBBE, A. S. et al. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy. **Cancer Res**, v. 56, n. 20, p. 4694-4701, 1996a.

LUBBE, A. S. et al. Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. **Cancer Res**, v. 56, n. 20, p. 4686-4693, 1996b.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci**, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.

MATSUOKA, F. et al. Hypertermia using magnetite cationic liposomes for hamster osteosarcoma. **Biomagn Res Technol**, v. 2, p. 1-6, 2004.

MITALIPOVA, M.; BEYHAN, Z.; FIRST, N. L. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. **Cloning**, v. 3, n. 2, p. 59-67, 2001.

MITSUI, K. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 631-642, 2003.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. **FASEB J**, v. 19, n. 3, p. 311-330, 2005.

MUMMERY, C. et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. **Circulation**, v. 107, n. 21, p. 2733–2740, 2003.

NIWA, H. et al. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. **Genes Dev**, v. 12, n. 13, p. 2048-2060, 1998.

NOTARIANNI, E. et al. Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 41, p. 51-56, 1990.

NOTARIANNI, E. et al. Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 43, p. 255-260, 1991.

OH, S. K. et al. Methods for expansion of human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 5, p. 605-609, 2005.

PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **J Phys D: Appl Phys**, v. 36, p. 167–181, 2003.

PASSIER, R. et al. Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. **Stem Cells**, v. 23, n. 6, p. 772–780, 2005.

PESCE, M.; ANASTASSIADIS, K.; SCHOLER, H. R. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. **Cells Tissues Organs**, v. 165, n. 3-4, p. 144-152, 1999.

PICKERING, S. J. et al. Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research. **Reprod Biomed Online**, v. 7, n. 3, p. 353-364, 2003.

PRELLE, K. et al. Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species-present status and future prospects. **Cells Tissues Organs**, v. 165, n. 3-4, p. 220-236, 1999.

PULFER, S. K.; GALLO, J. M. Targeting tumors using magnetic drug delivery. In: TORRENCE, P. F. **Biomedical chemistry: applying chemical principles to the understanding and treatment of diseases**. New York: Wiley-Interscience, 2000, p. 211-225.

REYNOLDS, B. A.; WEISS, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**, v. 255, n. 5052, p. 1707-1710, 1992.

REUBINOFF, B. E. et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. **Nat Biotechnol**, v. 18, n. 4, p. 399-404, 2000.

REUBINOFF, B. E. et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 19, n. 12, p. 1134-1140, 2001.

RICHARDS, M. et al. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. **Stem Cells**, v. 22, n. 1, p. 51-64, 2004.

RUSSELL, M.; ANZAI, Y. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide enhanced MR imaging for lymph node metastases. **Radiography**, v. 13, n. 1, p. 73-84, 2007.

SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M. Magnetic Nanoparticles and Biosciences. **Monatshefte für Chemie**, v. 133, p. 737-759, 2002.

SAITO, S. et al. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 309, n. 1, p. 104-113, 2003.

SAIYED, Z. M.; TELANG, S. D.; RAMCHAND, C. N. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. **BioMagn Res Technol**, v. 1, p. 1-8, 2003.

SCHERER, F. et al. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. **Gene Ther**, v. 9, n. 2, p. 102-109, 2002.

SCHOEPPF, U. et al. Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies. **Biotechniques**, v. 4, p. 648-651, 1998.

SCHOLER, H. R. et al. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. **EMBO J**, v. 8, n. 9, p. 2551-2557, 1989.

SCHOONJANS, L. et al. Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. **Mol Reprod Dev**, v. 45, n. 4, p. 439-443, 1996.

SCHULDINER, M. et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, n. 21, p. 11307-11312, 2000.

SCHUTT, W. et al. New methods for the investigation of blood-biomaterial interaction. **Artif Organs**, v. 19, n. 8, p. 847-851, 1995.

SHI, Y. et al. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. **Stem Cells**, v. 23, n. 5, p. 656–662, 2005.

SILVA, G. A. et al. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofirbes. **Science**, v. 303, n. 5662, p. 1352-1355, 2004.

SMITH, A. G. et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. **Nature**, v. 336, n. 6200, p. 688-690, 1988.

SMITH, A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 435-462, 2001.

SOLTER, D.; KNOWLES, B. B. Immunosurgery of mouse blastocyst. **Proc Natl Acad Sci**, v. 72, n. 12, p. 5099-5102, 1975.

SOLTER, D.; KNOWLES, B. B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). **Proc Natl Acad Sci**, v. 75, n. 11, p. 5565-5569, 1978.

SORIA, B.; SKOUDY, A.; MARTIN, F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 44, n. 4, p. 407-415, 2001.

STICE, S. L. et al. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. **Biol Reprod**, v. 54, n. 1, p. 100-110, 1996.

STRELCHENKO, N.; MITALIPOVA, M.; STICE, S. L. Further characterization of bovine pluripotent stem cells. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 327, 1995.

STROM, S. et al. Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. **Hum Reprod**, v. 22, n. 12, p. 3051-3058, 2007.

SUDIMACK, J.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 41, n. 2, p. 147-162, 2000.

SUZUKI, M. et al. Development of a target-directed magnetic resonance contrast agent using monoclonal antibody-conjugated magnetic particles. **Noshuyo Byori**, v. 13, n. 2, p. 127-132, 1996.

SUZUKI, M. et al. Anticancer effect and immune induction by hyperthermia of malignant melanoma using magnetic cationic liposomes. **Melanoma Res**, v. 13, p. 129-135, 2003.

TAKAHASHI, T. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. **Circulation**, v. 107, n. 14, p. 1912–1916, 2003.

TARTAJ, P. et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **J Phys D Appl Phys**, v. 36, p. 182–197, 2003.

THOMSON, J. A. et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proc Natl Acad Sci**, v. 92, n. 17, p. 7844-7848, 1995.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TOMA, J. G. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 778 – 784, 2001.

ULLOA-MONTOYA, F.; VERFAILLIE, C. M.; HU, W. S. Culture systems for pluripotent stem cells. **J Biosci Bioeng**, v. 100, n. 1, p. 12-27, 2005.

VAN EIJK, M. J. et al. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. **Biol Reprod**, v. 60, n. 5, p. 1093-1103, 1999.

VASSILIEVA, S. et al. Establishment of SSEA-1- and Oct-4-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. **Exp Cell Res**, v. 258, n. 2, p. 361-373, 2000.

WEISSLEDER, R. et al. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. **J Magn Reson Imaging**, v. 7, n. 1, p. 258-263, 1997.

WICHTERLE, H. et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. **Cell**, v. 110, n. 3, p. 385-397, 2002.

WILHELM, C. et al. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their coating. **Biomaterials**, v. 24, p. 1001-1011, 2002.

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.

WILLIAMS, R. L. et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. **Nature**, v. 336, n. 6200, p. 684-687, 1988.

WOBUS, A. M. et al. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. **Exp Cell Res**, v. 152, n. 1, p. 212-219, 1984.

WOBUS, A. M. et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 29, n. 6, p. 1525–1539, 1997.

WOBUS, A. M. Potential of embryonic stem cells. **Mol Aspects Med**, v. 22, n. 3, p. 149-164, 2001.

XU, C. et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 19, n. 10, p. 971-974, 2001.

XU, C. et al. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. **Circ Res**, v. 91, n. 6, p. 501–508, 2002.

YADAV, P. S. et al. Bovine ICM derived cells express the Oct4 ortholog. **Mol Reprod**, v. 72, n. 2, p. 182-190, 2005.

YANASE, M. et al. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: an in vivo study. **Jpn J Cancer Res**, v. 88, n. 7, p. 630-632, 1998.

ZHANG, Y.; KOHLER, N.; ZHANG, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. **Biomaterials**, v. 23, n. 7, p. 1553-1561, 2002.

ZUR NIEDEN, N. I. et al. Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors. **J Biotechnol**, v. 129, n. 3, p. 421-432, 2007.

9. ANEXOS

9.1 Confirmação de submissão do Artigo II

ScholarOne Manuscripts

Página 1 de 1

Edit Account | Instructions & Form

Stem Cells and Development

Main Menu → Author Dashboard → Submission Confirmation

Yol

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Stem Cells and Development*.

Manuscript ID: SCD-2009-0259

Title: Magnetic field-magnetic nanoparticles system used to grow in vitro murine embryonic stem cells

Authors: Freitas, Erika
Soares, Paula
Santos, Rachel
Santos, Regiane
Porfírio, Elaine
Báo, Sonia
Uma, Emilia
Gullo, Lidia

Date Submitted: 15-Jul-2009

Payment method: Waived
15-Jul-2009

 Print  Return to Desktop

ScholarOne Manuscripts™ v4.1.3 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

9.2 Confirmação de Submissão do Artigo III

ScholarOne Manuscripts

Página 1 de 1

[Edit Account](#) | [Instructions & Form](#)

Stem Cells and Development

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Stem Cells and Development*.

Manuscript ID: SCD-2009-0257

Title: Embryonic stem-like cells derived from in vitro-developed bovine blastocysts

Authors: Freitas, Erika
Sanches, Bruno
Gambarini, Maria
Filho, Benedito
Guillo, Lidia

Date Submitted: 15-Jul-2009

Payment method: Waived
15-Jul-2009

 [Print](#)  [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.1.3 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)