

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Juliana Amaral Passipieri

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS
DERIVADAS DO MESODERMA EXTRA-EMBRIONÁRIO DA PLACENTA
HUMANA A TERMO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Antonio Carlos Campos de Carvalho

Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Rio de Janeiro
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Passipieri, J.A.

Isolamento, caracterização e diferenciação de células derivadas do mesoderma extra-embriônico da placenta humana a termo – Rio de Janeiro, 2008

88 fls

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Biofísica) – Universidade federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde, 2008

Orientador: Antônio Carlos Campos de Carvalho.

1.Placa coriônica; 2.Vilosidade coriônica; 3. Placenta humana; 4. Células Mesenquimais – Teses I. Campos-de-Carvalho, Antonio Carlos (orient.) e Goldenberg, Regina Coeli dos Santos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde. III. Isolamento, caracterização e diferenciação de células derivadas do mesoderma extra-embriônico da placenta humana a termo.

Aos meus avós

Dalila e João Amaral,

Laudelina e João Passipieri

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Antonio Carlos Campos de Carvalho e a Profa Regina C. S. Goldenberg, pela oportunidade de trabalhar em um dos melhores laboratórios do país.

Ao Dr. Laudelino Lopes, nosso colaborador na Clínica Perinatal, por fornecer o material de estudo e estar sempre disposto a tirar dúvidas; e a toda sua equipe, principalmente o Dr. Renato, a Cris e a Ester, sempre muito prestativos.

A Tais H. Kasai-Brunswick e Andreza B. Martins (por ordem de tamanho), não só pela ajuda nos experimentos e análises, mas por uma amizade que nunca imaginei encontrar no Rio, por me ajudarem a crescer como profissional e como pessoa, por dividirem comigo sonhos, anseios, problemas e soluções.

A Beatriz B. Christie, a melhor aluna de iniciação científica que alguém pode ter, pela ajuda, paciência, competência e amizade.

Ao Igor Cruz, pelas análises de citometria de fluxo.

A Patrícia Fidelis, primeira aluna que acompanhei quando cheguei no laboratório, pela ajuda, exemplo e conselhos.

A todos os alunos e técnicos do laboratório: Ju Fígado, Ju Silva, Ju Pena, Danúbia, Leandro, Fernanda, Luiza, Ramon, noBru, Bruno Esporcatte, Luiz Fernando, Débora Mello, Débora França, Adriana, Suzana, Maurício, Rosângela, Renan, Marcelo, Ruy, Leandro, Roberta, Rafaella, Conceição, sr. José, Thiago, Gil, Jasmin, Ricardo, Karina, Márcia.

A Fabiana Mucillo e Patrícia Costa, por nos receberem no INC e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao Rafael, minha paixão, meu melhor amigo, pela força, carinho e compreensão em todos os momentos, por me ensinar o otimismo e me fazer acreditar que tudo sempre dá certo no final.

Aos meus pais, Milton e Adelaide Passipieri, pelo apoio e amor incondicional, pelo exemplo de conduta e por representarem tudo o que eu espero ser um dia.

A minha irmã, Daniela Passipieri, exemplo de coragem e determinação.

Ao meu novo irmão Tiago, pela felicidade que proporcionou a nossa família.

A minha prima Renata Passipieri, por ser praticamente uma irmã.

A Deus, que sempre estará ao meu lado.

A Capes que me concedeu uma bolsa de mestrado.

Ao Prof. Marcelo Santiago, pela revisão deste trabalho e aulas de microscopia.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

Especialmente, gostaria de agradecer aos membros da banca que estão corrigindo e sugerindo avanços neste trabalho.

"In the name of the best within you,
do not sacrifice this world to those who are its worst (...).

Do not let the hero in your soul perish (...).
Check the road and the nature of your battle."

Ayn Rand

RESUMO

Passipieri, J.A. Isolamento, caracterização e diferenciação de células derivadas do mesoderma extra-embriônico da placenta humana a termo. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) – IBCCF-UFRJ

A placenta é órgão materno-fetal temporário, e por ser descartado após o parto, é um material disponível em larga escala, de fácil obtenção, e seu uso não está associado a riscos para a saúde da mãe ou do feto. Tal característica a torna uma fonte promissora de células para terapia celular. Este trabalho visa isolar, caracterizar e avaliar o potencial de diferenciação de células derivadas do mesoderma extra-embriônico da placenta humana. Para isso, placas coriônicas de placentas humanas (n=12) e vilosidades coriônicas (n=12) foram dissecadas e as células isoladas após digestão enzimática. Foram isoladas $22,0 \pm 0,23 \times 10^5$ and $6,30 \pm 0,35 \times 10^5$ células/grama de placa e vilosidade coriônica processada, respectivamente. Quando mantidas em cultura, essas células adquiriram morfologia semelhante a de fibroblasto e $92,02 \pm 1,37\%$ das células derivadas da placa coriônica e $79,13 \pm 2,76\%$ das células derivadas das vilosidades coriônicas expressavam um painel fenotípico característico de células mesenquimais estromais multipotentes (MSCs) derivadas da medula óssea: CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD166⁺, CD54⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻, CD133⁻ e HLA-DR⁻. Para testar o potencial multipotente, as células derivadas da placa e vilosidade coriônica foram submetidas a protocolos de indução adipogênica (n=3) e osteogênica (n=3). Após 21 dias, as células mantidas apenas com meio de cultura completo não apresentavam diferenciação espontânea; enquanto as mantidas em meio de indução acumularam vacúolos de lipídeos no citoplasma, e depósitos de cálcio na matriz extracelular, indicadores de diferenciação adipogênica e osteogênica, respectivamente. Quando submetidos ao mesmo protocolo de diferenciação, fibroblastos cardíacos de ratos neonatos (n=3) não eram induzidos a adipogênese ou osteogênese, confirmando a multipotencialidade das células placentárias. As células placentárias a fresco (n=4) foram submetidas a caracterização por citometria de fluxo e apenas $13,47 \pm 6,62\%$ e $11,63 \pm 4,66\%$ das células derivadas da placa e vilosidade coriônica, respectivamente, eram células CD45⁻ CD34⁻ e CD105⁺. Essas células não expressavam marcadores da linhagem hematopoiética (CD14⁻, CD133⁻ e HLA-DR⁻), mas, comparando com o observado em cultura, houve uma redução na quantidade de células que coexpressavam CD90, CD73, CD166 e CD54. Podemos propor que a expansão *in vitro* foi responsável pela seleção de células com o imunofenótipo que corresponde ao de MSCs ou o imunofenótipo das células a fresco não corresponde a aquele expresso pelas células em cultura. Com base nestes dados, concluímos que características expressas pelas células derivadas do mesoderma extra-embriônico da placa e vilosidade coriônica da placenta humana, como aderência ao frasco de cultura, perfil imunofenotípico e a diferenciação em células da linhagem mesodérmica, permite-nos classificá-las como MSCs. Assim, é importante desenvolver mais estudos que avaliem o perfil imunofenotípico destas células a fresco.

Palavras-chave: placenta a termo, caracterização, células mesenquimais, diferenciação, adipogênese, osteogênese.

ABSTRACT

Passipieri, J.A. Isolation, characterization and differentiation of term placenta derived extraembryonic mesodermal cells. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) – IBCCF-UFRJ

The placenta is a temporary organ, and because it is discarded *post partum*, it is available in large quantities and its use in research is not associated with health risks to the mother or fetus. Such characteristics turn it into an attractive alternative source of progenitor cells for basic research cellular therapy. This study aims to isolate, characterize and evaluate the differentiation potential of term placenta derived extraembryonic mesodermal cells. The chorionic plate (n=12) and villi (n=12) of human term placentas (n=12) were dissected and the cells were isolated through enzymatic digestion. There were isolated $22.0 \pm 0.23 \times 10^5$ and $6.30 \pm 0.35 \times 10^5$ cells/gram of chorionic plate and villi, respectively. In culture, the cells displayed fibroblast-like morphology and $92.02 \pm 1.37\%$ of the chorionic plate cells and $79.13 \pm 2.76\%$ of the chorionic villi cells expressed immunophenotypical characteristics that were similar to those expressed by bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD166⁺, CD54⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻, CD133⁻ e HLA-DR⁻. In order to test their multipotent potential, cells derived from chorionic plate and villi were submitted to adipogenic (n=3) and osteogenic (n=3) protocols. After 21 days, the cells maintained in complete culture medium did not show spontaneous differentiation, while those maintained in induction media showed cytoplasmatic lipid vacuoles and calcium crystal in the extracellular matrix, adipogenesis and osteogenesis indicators, respectively. When cardiac fibroblasts (n=3) were submitted to differentiation protocols, they did not show adipogenic and osteogenic indicators, which helped us to confirm the multipotent properties of the placental cells. Freshly isolated placental cells were also characterized by flow cytometry (n=4) and only $13.47 \pm 6.62\%$ and $11.63 \pm 4.66\%$ of chroionic plate and villi, respectively, were CD45⁻ CD34⁻ and CD105⁺ cells. They did not expressed hematopoietic lineage markers (CD14⁻, CD133⁻ and HLA-DR⁻), but, compared to cultured cells, there were a reduction of the amount of cells co-expressing CD90, CD73, CD166 and CD54. It is possible that the *in vitro* expansion was responsible for the selection of cells that displayed immunophenotypical characteristics that were similar to MSCs, or it is also possible that the immunophenotypical characteristics found in freshly isolated cells is influenced by their *in vitro* expansion. Based on these findings, we concluded that the characteristics expressed by the cells derived from the extraembryonic mesoderm found in the chorionic plate and villi of human placenta, such as plastic adherence, immunophenotypical profile and differentiation potential, allow us to classify them as MSCs. However, it is important to develop more studies to identify the characteristics displayed by freshly isolated cells.

Key words: term placenta, characterization, mesenchymal cells, differentiation, adipogenesis, osteogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Desenho esquemático representando as três regiões da decídua: basal, capsular e parietal. _____ 11
- FIGURA 2** - Vista do lado materno e fetal da placenta _____ 13
- FIGURA 3** - Desenho esquemático dos vasos sanguíneos fetais na placenta _____ 13
- FIGURA 4** - Desenho esquemático representando a proliferação do sinciotrofoblasto e implantação do blastocisto no endométrio _____ 15
- FIGURA 5** - Desenho esquemático representando a formação da cavidade amniótica, saco vitelino e, entre eles, o embrioblasto _____ 16
- FIGURA 6** - Desenho esquemático representando a formação de vilosidades coriônicas induzidas pela presença do mesoderma extra-embriônico _____ 18
- FIGURA 7** – Foto ilustrando a face fetal da placenta. A) Retirada de porções da placa coriônica; B) Retirada de porções de vilosidades coriônicas _____ 35
- FIGURA 8** - Quantidade de células extraídas por cada grama de tecido placentário submetido ao protocolo de isolamento celular _____ 36
- FIGURA 9** - Aspecto morfológico das células derivadas da placa coriônica e vilosidades coriônicas _____ 37
- FIGURA 10** - Caracterização por citometria de fluxo da população prevalente na cultura de células derivadas da placa coriônica em terceira passagem, mostrando (A) a relação tamanho-granulosidade das células, (B) ausência da expressão dos marcadores CD45 e CD34 e (C) a expressão das proteínas CD105, CD90, CD73 _____ 39
- FIGURA 11** - Caracterização por citometria de fluxo da população prevalente na cultura de células derivadas da placa coriônica em terceira passagem, mostrando (A) expressão de CD54 e CD166 e (B) ausência de expressão dos marcadores CD14, CD133 e HLA-DR _____ 40
- FIGURA 12** - Caracterização por citometria de fluxo da população prevalente na cultura de células derivadas das vilosidades coriônicas em terceira passagem, mostrando (A) a relação tamanho-granulosidade das células, (B) ausência da expressão dos marcadores CD45 e CD34 e (C) a expressão das proteínas CD105, CD90, CD73 _____ 41
- FIGURA 13** - Caracterização por citometria de fluxo da população prevalente na cultura de células derivadas das vilosidades coriônicas em terceira passagem, mostrando (A) expressão de CD54 e CD166 e (B) ausência de expressão dos marcadores CD14, CD133 e HLA-DR _____ 42
- FIGURA 14** - Comparação da expressão dos antígenos estudados na população CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ presente na cultura de células derivadas da placa coriônica de terceira passagem _____ 45

FIGURA 15 - Avaliação do potencial osteogênico _____	48
FIGURA 16 - Foto macroscópica da placa de cultura submetida a indução osteogênica _____	49
FIGURA 17 - Avaliação do potencial adipogênico _____	51
FIGURA 18 - Proporção de células CD45 ⁻ CD34 ⁻ CD105 ⁺ em relação ao total de células a fresco extraídas da placa coriônica e vilosidades coriônicas placentárias _____	53
FIGURA 19 - Quantificação do perfil imunofenotípico das células CD45 ⁻ CD34 ⁻ CD105 ⁺ em cultura e a fresco derivadas (A) da placa coriônica, (B) das vilosidades coriônicas e (C) comparação das células a fresco derivadas das duas regiões placentárias estudadas _____	56

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Tabela 1: Painel de anticorpos utilizados na caracterização das células derivadas da placa e vilosidade coriônica _____30
- TABELA 2** - Identificação das células por citometria de fluxo, baseada na expressão dos marcadores CD45 e CD34_____31
- TABELA 3** - Análise da expressão dos antígenos estudados na população CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ presente na cultura de células derivadas da placa coriônica de terceira passagem_____44
- TABELA 4** - Análise da expressão dos antígenos estudados na população CD45⁻ CD34⁻CD105⁺ presente na fração a fresco de células isoladas da placa coriônica de terceira passagem_____54

LISTA DE SIGLAS

AMP	Monofostato de adenosina
APC	Aloficocianina
BSS	Solução salina balanceada
BSS-CMF	Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio
cAMP	Monofostato de adenosina cíclico
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CD11b	Mac-1; Mo1; receptor iC3b; cadeia ingrina α M
CD14	receptor LPS (lipopolissacarídeo) associado ao TLR-4 (receptor Toll-Like)
CD18	LCAMB, Integrina Beta-2
CD19	B4
CD29	Subunidade de Integrina beta-1
CD31	PECAM-1, Molécula de Adesão Celular Endotelial de Plaquetas
CD34	Gp105-120; Glicoproteína de superfície,
CD38	T-10; Ectoenzima funcional
CD40	Molécula co-estimulatória
CD44	Receptor de hialurona
CD45	Antígenos comum dos leucócitos
CD54	ICAM-1 - Molécula de Adesão Intercelular
CD56	NCAM-1, Molécula de Adesão Celular Neuronal
CD59	Protectina; Inibidor de membrana da lise reativa
CD73	Ecto-5'-nucleotidase
CD79a	Ig α ; MB1
CD80	B7-1; BB1; Molécula co-estimulatória
CD86	B7-2; Molécula co-estimulatória
CD90	Thy1; Antígenos de diferenciação de timócitos 1
CD105	Endoglina
CD166	ALCAM - Molécula de Adesão Celular para Leucócitos Ativados
CD117	Receptor C-kit
CD318	CDCP1
CFU-F	Unidades formadoras de colônias de fibroblastos
CTA	Célula-tronco adulta
CTE	Célula-tronco embrionária
CTH	Células-tronco hematopoéticas

DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
Fc	Porção constante do anticorpo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FZD9 e 10	Receptores tipo frizzled
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulocitárias
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HLA-ABC	Antígeno leucocitário humano-ABC Complexo de histocompatibilidade tipo I
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano-DR; Complexo de histocompatibilidade tipo II
HLA-G	Antígeno leucocitário humano-A
IBMX	1 metil-3-isobutilxantina
ISTC	Sociedade Internacional de Terapia Celular
LIF	Fator inibidor de leucemia
LPS	lipopolissacarídeo
MSC	Células mesenquimais estromais multipotentes
Oct-4	Octamer-4
PBS	Solução tampão de fosfato
PE	Ficoeritrina
PKA	Quinase A dependente de cAMP
RGD	Arginina-Glicina-Ácido aspártico
SFB	Soro fetal bovino
SSEA-4	Antígeno embrionário de estágio específico 4
TGF- β	Fator de crescimento transformante
TLR	Receptor toll-like
TRA1-60 e 1-80	Antígenos relacionados a matriz proteoglicana pericelular de tetracarcinomas e CTE
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular)

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Natureza das células-tronco.....	1
1.2 Terapia celular e células-tronco.....	2
1.2.2 Células-tronco adultas	3
1.3 Placenta.....	10
1.3.1 Aspectos gerais.....	10
1.3.2 Embriologia	14
1.4 Células mesenquimais derivadas da placenta.....	18
2. Objetivos.....	23
3. Materiais e métodos.....	24
3.1 Material	24
3.2 Métodos	24
3.2.1 Isolamento das células derivadas do mesoderma extra-embriônico da placenta a termo	24
3.2.2 Expansão das células.....	26
3.2.3 Citometria de fluxo	28
3.2.4 Cultura de fibroblastos cardíacos	31
3.2.5 Estudos de diferenciação.....	32
3.2.6 Análise estatística	33
4. Resultados	34
4.1 Isolamento	34
4.2 Morfologia	34
4.3 Imunofenotipagem.....	38
4.4 Diferenciação.....	46
4.4.1 Osteogênese.....	46
4.4.2 Adipogênese	50
4.5 Imunofenotipagem das células a fresco.....	52
5. Discussão	57
6. Conclusões.....	69
7. Referências Bibliográficas.....	70
APÊNDICES.....	84

1. Introdução

1.1 Natureza das células-tronco

Células-tronco são células clonogênicas indiferenciadas capazes de auto-renovação, ou seja, produzir continuamente células-filhas cujas características são semelhantes as da célula-mãe, e diferenciação, caracterizada pela produção de células-filhas diferenciadas com capacidade funcional normal (TILL & MCCULLOCH, 1961; SMITH, 2006). As células podem sofrer divisões simétricas e assimétricas. Na divisão assimétrica, a célula-tronco divide-se gerando uma nova célula-tronco e uma célula que sofrerá diferenciação. Na divisão simétrica, algumas células-tronco dividem-se gerando novas células-tronco, enquanto outras geram apenas células com potencial para diferenciação. Assim, cada tipo de divisão celular ocorre seguindo modelo determinístico ou estocástico.

As células do zigoto são consideradas células-tronco totipotentes, pois são capazes de gerar todos os tipos celulares, inclusive os anexos placentários. Após diversas divisões assimétricas, o zigoto atinge o estágio de blastocisto, constituído pela massa interna de células e células do trofoblasto. A massa interna é composta por células pluripotentes, ou seja, células dos três folhetos germinativos (endoderma, mesoderma e ectoderma), mas não são capazes de gerar os anexos placentários.

No indivíduo adulto, há uma população rara de células multipotentes consideradas células-tronco adultas (CTA). Elas são células indiferenciadas entre as células diferenciadas que compõe cada tecido, e possuem capacidade de replicação limitada, diferenciando apenas em linhagens relacionadas ao seu tecido de origem. Elas estão distribuídas pelo corpo em “nichos” e acredita-se que seu papel esteja relacionado ao processo de reparo do organismo. Suas principais funções são

manter homeostase do tecido (HOLTZER, 1978), e substituir, seguindo os limites de regeneração de cada tecido, as células especializadas mortas por envelhecimento, injúria ou doença (LEBLOND, 1964). As células-tronco olipotentes e unipotentes são capazes de gerar poucos e apenas um tipo celular, respectivamente. Os progenitores mielóides são bons exemplos de células olipotentes, pois conseguem diferenciar-se em monócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e eritrócitos (AKASHI *et al.*, 1999). Como consequência do ilimitado potencial terapêutico que essas células oferecem, elas despertam muito interesse NA comunidade científica e clínica.

1.2 Terapia celular e células-tronco

O principal objetivo da medicina regenerativa é substituir ou restabelecer a função de células, tecidos ou órgãos danificados. A engenharia tecidual e a terapia celular são componentes fundamentais utilizados pela medicina regenerativa, e diversos tipos de células tronco têm potencial para serem aplicadas na terapia celular.

1.2.1 Células-tronco embrionárias

As células-tronco embrionárias (CTE) são formadas a partir da extração de células da massa interna do blastocisto. As CTE foram isoladas pela primeira vez em 1981 (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981), quando a massa interna de célula do blastocisto de camundongos foi cultivada sobre uma camada de fibroblastos de embrião de camundongo mitoticamente inativos, e mantidos em meio de cultura convencional complementado com soro fetal bovino. A adição de uma citocina chamada Fator Inibitório de Leucemia (LIF) possibilitou o cultivo das CTE sem que elas perdessem seu estado indiferenciado, permitindo o cultivo de CTE em

maiores proporções (SMITH *et al.*, 1988; WILLIAMS *et al.*, 1988). E, finalmente, em 1998, foi estabelecida a primeira linhagem de células-tronco embrionárias humanas (THOMSON *et al.*, 1998).

O método mais descrito para diferenciação de células-tronco embrionárias é via formação de corpos embrióides. A diferenciação ocorre de maneira heterogênea, levando a formação de células dos três folhetos germinativos, ectoderma, endoderma e mesoderma. No entanto, como o transplante de CTE indiferenciadas leva a formação de teratomas, a pré-diferenciação e purificação das células são etapas fundamentais para sua utilização em terapia celular. E apesar dos inúmeros esforços de cientistas para direcionar a diferenciação das células (KLUG *et al.*, 1996), a obtenção de uma população homogênea e pura ainda não foi estabelecida.

O uso terapêutico das CTE tem limitações como a geração de uma quantidade de células suficiente para transplante, e ainda é preciso determinar a melhor maneira de aplicá-las, e como evitar a rejeição pelo sistema imunológico do paciente (ROBERTSON, 2001).

1.2.2 Células-tronco adultas

As células-tronco adultas são muito raras, e residem em nichos em muitos tecidos, como, por exemplo, a medula óssea, cérebro, fígado, pele, músculo esquelético, pâncreas sangue e polpa dentária (PRESNELL, PETERSEN & HEIDARAN, 2002; SPRADLING, DRUMMOND-BARBOSA & KAI, 2001; JIANG *et al.*, 2002()). A fonte de células-tronco adultas mais bem estabelecida é a medula óssea, onde residem células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células-tronco mesenquimais (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974). A terapia utilizando células adultas

começou em 1956, quando foi realizado o primeiro transplante de medula óssea (THOMAS *et al.*, 1957).

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) foram caracterizadas por Till e McCollough, na década de 1960 (TILL & MCCULLOUGH, 1961). Estas células apresentam capacidade de auto-renovação e são responsáveis pela renovação de todos os tipos celulares do sangue; podem ser mobilizadas da medula para a circulação periférica mediante estímulos específicos, como por exemplo, através da aplicação da citocina G-CSF (Fator estimulador de colônias granulocitárias) (FU & LIESVELD, 2000), e ainda controlam mecanismos de apoptose, mantendo nas CTH o equilíbrio entre geração e morte. (NIH, 2006).

As células-tronco hematopoiéticas são raras, representando apenas 1 em 10 – 15 x 10⁵ células da medula, e morfologicamente semelhantes às outras células. A presença de marcadores de superfície celular denominados “Cluster” de Diferenciação (CD) 34, CD59 (Protectina), CD90 (Thy1- antígenos de timócitos); a baixa expressão (positivo fraco) de CD38 (ectoenzima funcional), CD117 (Receptor c-kit); e ausência de marcadores de linhagens específicas (Lin⁻) (BAUM *et al.*, 1992) têm sido aceitos como características de CTH humanas.

A presença de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea foi sugerida pela primeira vez a mais de 130 anos (COHNHEIM, 1867), e confirmada através do trabalho de Friedenstein e colaboradores (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974). Recentemente, foram denominadas “Células mesenquimais estromais multipotentes” (MSC) (HORWITZ *et al.*, 2005), e são caracterizadas por sua capacidade de aderência ao plástico, potencial multipotente para expressar indicadores de diferenciação em células de linhagens de tecido conjuntivo, e expressão de antígenos de superfície específica (DOMINICI *et al.*, 2006).

Fenotipicamente, as MSC expressam diversos marcadores, mas nenhum deles é exclusivo deste tipo celular. Expressam CD105 (também chamada de endogлина), CD90 (ou Thy1) e CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD166 (ALCAM, Molécula de Adesão Celular para Leucócitos Ativados), CD54 (ICAM-1, Molécula de Adesão Intercelular) e CD29 (Cadeia de Integrina beta-1). No entanto, é consenso que as MSC adultas não expressam antígenos de superfície típicos de células hematopoiéticas: CD45 (marcador de leucócitos), CD34 (presente em progenitores hematopoiéticos e endoteliais), CD14 ou CD11b (expressos em monócitos e macrófagos), e CD79a ou CD19 (marcadores de linfócitos B), e HLA-DR (complexo de histocompatibilidade tipo II) ou CD31 (PECAM-1, Molécula de Adesão Celular Endotelial de Plaquetas, expresso em plaquetas, monócitos, granulócitos e células endoteliais), CD18 (LCAMB, Integrina Beta-2, expresso em leucócitos) e CD56 (NCAM-1, Molécula de Adesão Celular Neuronal, expresso em células “natural killers”, linfócitos B e T)

O CD105, também conhecida como endogлина, é uma glicoproteína homodimérica de aproximadamente 180 kDa, que compõe o complexo receptor do fator de crescimento transformante (TGF- β) (BARBARA *et al.*, 1999; CHEIFETZ *et al.*, 1992). No seu domínio extracelular é encontrado um tripeptídeo Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RGD), importante na interação célula-célula, sugerindo que seja exercido pelo CD105 um papel funcional de ligante de integrinas e/ou outros receptores RGD (GOUNGOS & LETARTE, 1990; LASTRES *et al.*, 1992). O CD105 está presente na superfície celular de células endoteliais vasculares em proliferação (GOUNGOS & LETARTE, 1990), células precursoras hematopoiéticas (BUHRING *et al.*, 1991; PIERELLI *et al.*, 2001), sinciciotrofoblasto da placenta a termo (GOUNGOS *et al.*, 1992) e células com potencial mesenquimal (LODIE *et al.*, 2002). Seu papel

nas MSCs está associado a modulação da diferenciação das células-tronco, principalmente nos processos relacionados a osteogênese (HAYNESWORTH, BABER & CAPLAN, 1992; FONSATI *et al.*, 2001).

O marcador CD90 foi identificado pela primeira vez em precursores de células T no timo de camundongos, por isso, também é denominado Thy1 (Antígeno de diferenciação de Timócito 1). É uma proteína de membrana de 25-37 kDa associada ao glicosilfosfatidilinositol. Está expressa em fibroblastos humanos (SAALBACH *et al.*, 1998), células-tronco hematopoiéticas (CRAIG *et al.*, 1993), neurônios (HAERYFAR *et al.*, 2004) e células endoteliais (SAALBACH *et al.*, 1999). O CD90 exerce diversos papéis, relacionados ou não ao sistema imune. Ele é importante na condução do sinal que inibe ou ativa respostas relacionadas à maturação dos linfócitos T (CERASOLI, KELSOE & SARZOTTI, 2001), modula o crescimento de neuritos (axônios e dendritos) (TIVERON, *et al.*, 1992), induz apoptose em timócitos (Hueber *et al.*, 1994), promove adesão de timócitos ao epitélio do timo, e de leucócitos e monócitos a células endoteliais e fibroblastos (HE *et al.*, 1991; SAALBACH, HAUSTEIN & ANDEREGG, 2000). Muitas informações sobre o CD90 e seus ligantes permanecerem indefinidas, mas acredita-se que o CD90 seja uma importante proteína de adesão que regula interações entre a MSC e a matriz extracelular (BAKER *et al.*, 2004).

Assim como o CD90, o CD73 também é uma proteína de superfície acoplada a glicosilfosfatidilinositol. Trata-se de uma enzima chamada ecto-5'-nucleotidase, responsável pela hidrólise extracelular de nucleosídeos monofosfatos, como o AMP (monofosfato de adenosina), em unidades nucleosídicas bioativas, fornecendo precursores para o metabolismo energético e para síntese de ácidos nucleicos (ZIMMERMANN, 1992). O CD73 está relacionado à coordenação de diversas

repostas fisiológicas, como no transporte de íons e fluídos pela membrana epitelial (STROHMEIER *et al.*, 1997), regulação da permeabilidade exercida pelas barreiras criadas pelo epitélio (SYNNESTVEDT *et al.*, 2002) e endotélio (LENNON *et al.*, 1998), adaptação celular a hipóxia, uma vez que a regulação positiva da expressão e função do CD73 já foi observada em diversos tipo celulares (SYNNESTVEDT *et al.*, 2002; ELZCHIG *et al.*, 2003; LEDOUX *et al.*, 2003; NAPIERALSKI *et al.*, 2003). No entanto, o papel exercido pelo CD73 nas MSCs permanece desconhecido. Sugere-se que seu papel não esteja relacionado a funções enzimáticas, mas seja responsável por sinais de ativação, como em linfócitos T (THOMPSON *et al.*, 1987) ou exerça papel de molécula de adesão, controlando interações da célula-matriz e regulando a sinalização para diferenciação celular (BARRY *et al.*, 2001).

O CD166, também conhecido como ALCAM (Molécula de Adesão Celular de Leucócito Ativado), é uma glicoproteína transmembrana de aproximadamente 65 kDa, membro da superfamília da imunoglobulinas, responsável por mediações intercelulares (SWART, 2002). Embora esteja presente em diversos tecidos, o ALCAM normalmente está restrito a tipos celulares envolvidos em crescimento dinâmico e/ou migração, logo, ele exerce um papel importante em processos fisiológicos, como hematopoiese (MATSUMOTO *et al.*, 1997; UCHIDA *et al.*, 1997), desenvolvimento do timo (PATEL *et al.*, 1995), resposta immune (Levesque *et al.*, 1998), extensão de neuritos (SEKINE-AIZAWA *et al.*, 1998), migração de neurônios (Heffron & Golden, 2000) e osteogênese (BRUDER *et al.*, 1998).

O CD54, conhecido como ICAM-1 (Molécula de Adesão Intercelular), também é um membro da superfamília das imunoglobulinas, e apresenta peso molecular de 80-114 kDa, dependendo do seu grau de glicosilação. Seus domínios extracelulares estão associados a adesão intercelular e entre a célula e a matriz. Compõe a

membrana de diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, leucócitos, queratinócitos, hepatócitos, e células de músculo liso (revisado em VAN DE STOLPE & VAN DER SAAG, 1996). Sua função mais bem descrita é na participação da migração de leucócitos através do endotélio e ativação de linfócitos T, processo no qual funcionam como moléculas co-estimulatórias (ZUCKERMAN *et al.*, 1998).

A caracterização imunofenotípica das MSCs revela que elas expressam níveis variáveis de HLA-ABC (conhecido como complexo de histocompatibilidade de classe I) e níveis negligenciáveis de HLA-DR (complexo de histocompatibilidade de classe II) e moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80, e CD86. A ausência destas moléculas co-estimulatórias faz com que os linfócitos T ativados pelo HLA-DR não se complete, resultando em linfócitos T inativos (JAVAZON *et al.*, 2004), o que confere a essas células propriedades não-imunogênicas, permitindo que seu transplante em hospedeiro alogênico possa ocorrer sem a utilização de imunossupressores (BARRY *et al.*, 2005).

De acordo com o trabalho de Pittenger *et al.* (1999), além de apresentarem características imunofenotípicas peculiares, as MSCs derivadas da medula óssea podem ser induzidas *in vitro* a expressar indicadores de diferenciação em células do tecido conjuntivo, como adipócitos, osteócitos e condrócitos. As células submetidas ao meio de indução osteogênico passam a acumular agregados de cristais de cálcio na matriz extracelular e aumentam sua expressão de fosfatase alcalina. As células submetidas a indução adipogênica acumulam vacúolos de lipídeos no citoplasma e expressam proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos, como lípases e proteínas que se ligam a ácidos graxos. As células que adquirem características típicas de condrócitos passam a se organizar em multicamadas e a acumular

glicosaminoglicanas na matriz extracelular. Wakitani *et al.* (1995) mostraram que as MSCs derivadas da medula óssea são capazes de diferenciação *in vitro* em mioblastos, após tratamento com o composto 5-aza-citidina. Em adição, Woodbury *et al.* (2000) relataram que essas células podiam passar a expressar marcadores típicos de neurônios, embora não apresentassem os canais iônicos dependentes de voltagem necessários para gerar potencial de ação (HOFSTETTER *et al.*, 2002).

Como as MSC apresentam características imunológicas únicas que suprimem proliferação de linfócitos *in vitro*, prolongam a sobrevivência de implantes de pele *in vivo* (BARTHOLOMEW *et al.*, 2002), apresentam ampla capacidade de diferenciação, propriedades imunoregulatórias e capacidade de auto renovação (GERSON, 1999), estas são consideradas um promissor agente terapêutico.

A utilização de MSC da medula óssea em terapia celular é vantajosa, porque pode ser extraída do próprio paciente, permitindo a realização de um transplante autólogo. No entanto, as MSCs são uma população rara na medula óssea do indivíduo adulto (aproximadamente 0,001-0,01%) (PITTENGER *et al.*, 1999), a sua frequência e capacidade de diferenciação tendem a diminuir com o avanço da idade do indivíduo (D'IPPOLITO *et al.*, 1999; RAO & MATTSON, 2000) e a extração da medula óssea é um processo invasivo.

Logo, diversos grupos investiram na procura de fontes alternativas de células mesenquimais. Assim, MSC já foram isoladas de músculo esquelético (WILLIAMS *et al.*, 1999), tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), líquido sinovial (BARI *et al.*, 2001), polpa dentária (GRONTHOS *et al.*, 2000). Elas foram encontradas também em sangue periférico adulto (ZVAIFLER *et al.*, 2000), embora em quantidade muito pequena (DAZZI *et al.*, 2006). No entanto, apesar de residirem no tecido conjuntivo da maioria dos órgãos (YOUNG *et al.*, 1995), as MSCs não são equivalentes em

relação ao seu potencial de diferenciação, principalmente nos ensaios *in vivo* (KUZNETSOV *et al.*, 1997). A expressão de marcadores de superfície varia de acordo com o tecido de origem, os métodos de isolamento e cultivo e espécie de origem (JAVAZON, BEGGS & FLAKE, 2004; BADDOO *et al.*, 2003).

Como a formação destes tecidos extra-embrionários ocorre no início do desenvolvimento embrionário, é possível que dentre as células, resida populações de células-tronco com capacidade de diferenciação maior que a das células-tronco adultas (MARCUS & WOODBURY, 2008). Dentre os tecidos-alvo de estudos estão o sangue, vasos e estroma do cordão umbilical (ERICES, CONGET & MINGUELL, 2000; COVAS *et al.*, 2003; KARAHUSEYINOGLU *et al.*, 2007), membranas fetais coriônica e amniótica (BAILO *et al.*, 2004; MIKI & STROM, 2006; SONCINI *et al.*, 2007), e placenta a termo (FUKUCHI *et al.*, 2004; YEN *et al.*, 2005; BATTULA *et al.*, 2007) Como esses tecidos são normalmente descartados após o nascimento, eles são adquiridos facilmente, através de meios não invasivos, e estão disponíveis em larga escala.

1.3 Placenta

1.3.1 Aspectos gerais

A placenta e o cordão umbilical formam o sistema de transporte entre a mãe e o feto, transportando oxigênio e nutrientes da mãe para o feto, e excretas e dióxido de carbono, no sentido oposto. As principais funções da placenta e membrana fetais são: proteção, nutrição, respiração, excreção e produção de hormônios (GEORGIADES *et al.* 2001).

A placenta (do grego *Plakuos*, Bolo Chato) humana é um órgão feto-maternal temporário, que geralmente apresenta forma discóide com 15-20 cm de diâmetro e

2-3 cm de espessura, e quando totalmente desenvolvido, pesa aproximadamente um sexto do peso do feto. A superfície de intercâmbio formada pela placenta é de aproximadamente 10 m² (BAERGEN, 1997).

A decídua (do latim *Deciduus*, que se desprende) corresponde a camada funcional do endométrio da mulher grávida. Há três regiões deciduais: Basal, porção mais distante do concepto e forma a parte materna da placenta; Capsular, porção superficial que recobre o concepto; Parietal, é a parte restante da decídua (Figura 1).

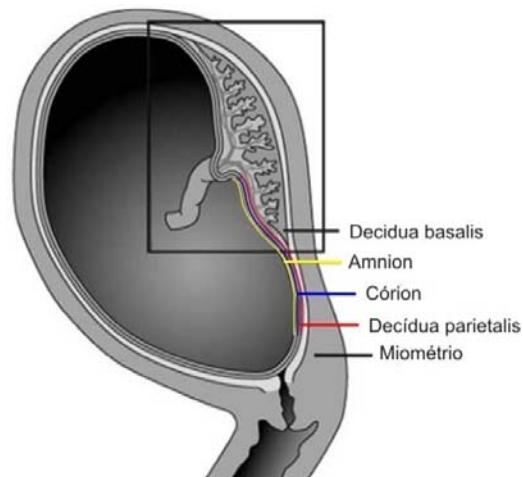


Fig. 1: Desenho esquemático representando a decídua basal e parietal (adaptado de 't Anker *et al.*, 2004).

A porção fetal da placenta corresponde ao córion viloso ou frondoso, constituído pela placa coriônica, nome atribuído a parede do córion relacionada a placenta, de onde surgem as vilosidades coriônicas. Ela fica voltada para a cavidade amniótica e é constituída por duas estruturas: a membrana amniótica e o córion. A membrana amniótica é formada por um epitélio, uma camada compacta, mesoderma amniótico e camada esponjosa. O córion é composto por mesênquima (originado a partir do mesoderma extra-embrionário), uma região de células trofoblásticas extravilosas, cobertas ou não por células do sinciotrofoblasto.

A partir da placa coriônica são formadas as vilosidades coriônicas. No início do desenvolvimento, as vilosidades coriônicas recobrem todo saco coriônico, mas com o decorrer do desenvolvimento, as vilosidades associadas a decídua capsular são comprimidas e degeneram, formando o córion liso. Ao mesmo tempo, as vilosidades associadas a decídua basal aumentam e ramificam, formando o córion viloso.

As vilosidades-tronco da placa coriônica ramificam-se e projetam-se para o espaço interviloso, onde está o sangue materno, provenientes dos vasos sanguíneos deciduais. A capa citotrofoblástica é uma camada externa de células do trofoblasto. A fixação das vilosidades-tronco a essa camada é responsável pelo ancoramento do saco coriônico à decídua basal.

Proliferações do citotrofoblasto, induzidas pelo mesoderma extra-embriônico, penetram no sinciciotrofoblasto formando vilosidades coriônicas primárias, que originarão as vilosidades coriônicas da placenta. A estrutura das vilosidades coriônicas sofre variações dependentes do grau de desenvolvimento da placenta. As vilosidades precoces possuem em seu interior vasos sanguíneos fetais com parede muscular distinta, além de tecido conjuntivo composto por fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos (células de Hoffbauer). As vilosidades intermediárias e de termo possuem capilares e um mesênquima fino. Projeções da placa basal, no lado materno, dentro das vilosidades coriônicas produzem o septo placentar, que divide o parênquima em cotilédones irregulares, visíveis apenas no lado materno da placenta (CASTELLUCCI *et al.*, 2000) (Figura 2). Cada cotilédone contém duas ou mais vilosidades-tronco principais e seus inúmeros ramos.

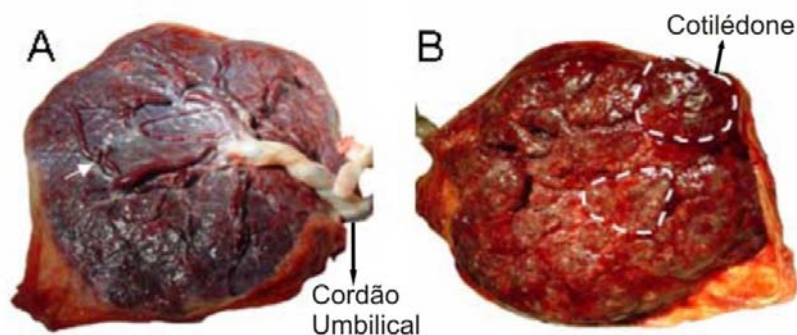


Fig. 2: Vista do lado fetal (A) e materno (B) da placenta humana (Huppertz, 2008).

As artérias e veias endometriais atravessam a capa citotrofoblástica e irrigam e drenam, respectivamente, o espaço interviloso, formado pelas lacunas do sinciotrofoblasto. As vilosidades ramificadas, que se projetam das vilosidades-tronco coriônicas, criam uma enorme superfície e permite a troca gasosa e de nutrientes entre o sangue materno e o fetal (Figura 3).

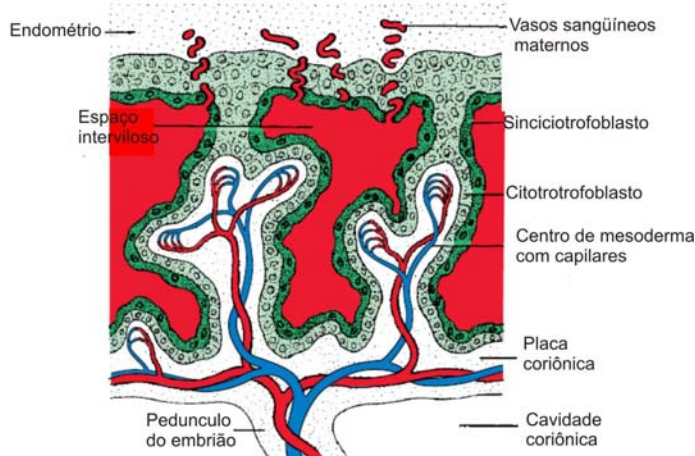


Fig. 3: Desenho esquemático mostrando o sistema de irrigação da placenta, realizado pelos vasos sanguíneos fetais (adaptado de Sandler, 2006).

Membrana amniótica e membrana coriônica (formada pelo córion liso) formam as membranas fetais, circundam o feto e o fluido amniótico. O crescimento da membrana amniótica é mais acelerado que o crescimento da membrana coriônica,

logo ocorre fusão entre elas, formando a membrana amniocoriônica. Esta, por sua vez, funde-se a decídua capsular.

A membrana amniótica é um tecido de origem fetal, constitui a camada mais interna da placenta, e é composta por uma camada epitelial fina, membrana basal e estroma avascular, que são contínuas com a pele do feto, através do cordão umbilical. Nela são encontrados dois tipos celulares, cujas origens embrionárias são distintas: as células amnióticas epiteliais são formadas a partir do ectoderma embrionário (BENIRSCHKE & KAUFMAN, 2000), e as células mesenquimais amnióticas são provenientes do mesoderma extra-embrionário, e elas ficam adjacentes a camada de células epiteliais (HOYES, 1975; ENDERS & KING, 1988). Recentemente, foi proposta a presença de um terceiro tipo celular, encontrado entre as células mesenquimais, cujas características eram semelhantes a monócitos (MAGATTI *et al.*, 2008).

A membrana coriônica é composta por uma região mesodérmica e uma região trofoblástica. O mesoderma amniótico e coriônico são separados por uma camada esponjosa de fibras de colágeno, mas ambos apresentam uma composição muito semelhante. As células trofoblásticas são dispersas e apresentam marcadores imunohistoquímicos de proliferação (BENIRSCHKE AND KAUFFMANN, 2000).

1.3.2 Embriologia

Evolutivamente, a formação da placenta demandou uma drástica reestruturação da anatomia materna e o acréscimo de um órgão fetal capaz de absorver nutrientes maternos. Assim, o desenvolvimento do embrião dentro da mãe, sem a utilização do saco vitelino, tornou-se possível.

Após a fecundação do ovócito, é formado o zigoto, que sofre diversas

divisões assimétricas originando um blastocisto, formado por uma massa interna de células e uma fina camada externa de células do trofoblasto, que circunda a massa interna de células e a cavidade blastocística. No quinto ou sexto dia após a fecundação, o blastocisto fixa-se a parede do endométrio. A camada de trofoblasto, ao entrar em contato com o endométrio, prolifera, formando o sinciciotrofoblasto, um conjunto de células ativamente erosivo, que invade a camada de endométrio através da liberação de enzimas proteolíticas, facilitando a implantação do blastocisto (LINDENBERG *et al.*, 1989) (Figura 4).

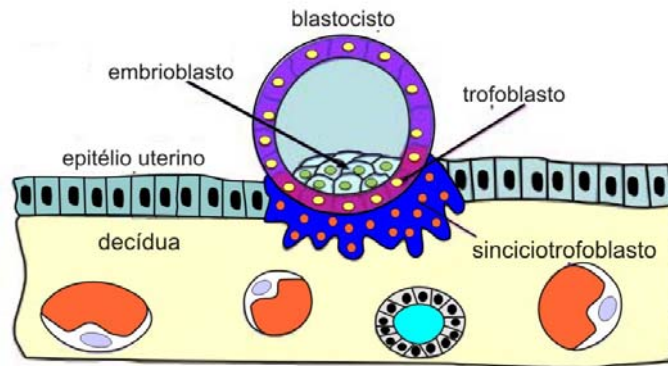


Fig. 4 Desenho esquemático representando a proliferação do sinciciotrofoblasto e implantação do blastocisto no endométrio (adaptado de HUPPERTZ, 2008).

O útero responde a invasão realizada pelas células do trofoblasto enviando vasos sanguíneos para a área, que logo entrarão em contato com o sinciciotrofoblasto. Enquanto a implantação progride até a segunda semana de gestação, ocorrem mudanças morfológicas na massa celular interna, cujas células segregam-se, formando as camadas celulares hipoblasto e epiblasto.

Células do epiblasto, chamadas amnioblastos, desprendem-se e passam a revestir a cavidade amniótica. As células que permanecem no epiblasto e as células do hipoblasto formam o embrioblasto. Ele sofre gastrulação e dá origem aos três folhetos germinativos – ectoderma, endoderma e mesoderma, que formarão tecidos

e órgãos específicos.

O hipoblasto recobre a teto da cavidade exocelômica e é contínuo com a membrana que reveste esta cavidade. A cavidade exocelômica dá origem ao saco vitelino primitivo, cujo endoderma dará origem a uma camada de tecido conjuntivo frouxo, denominado mesoderma extra-embriônico, que reveste a cavidade amniótica, saco vitelino e embrioblasto (Figura 5). O mesoderma extra-embriônico também também recebe tecido mesodérmico do embrião, que migra pela linha primitiva e torna-se extra-embriônico (BIANCHI *et al.*, 1993).

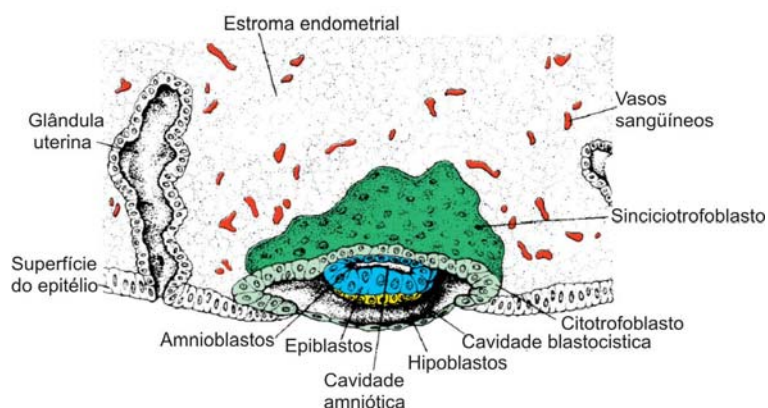


Fig. 5: Desenho esquemático representando a formação da cavidade amniótica, saco vitelino e a presença do embrioblasto, situado entre eles (adaptado de Sandler, 2006).

O sinciotrofoblasto sofre expansões e adquire um aspecto esponjoso, dada a formação de uma rede de lacunas, preenchidas com sangue materno e secreções de glândulas uterinas erodidas. Os nutrientes maternos presentes nessas lacunas chegam até o embrião bilaminar por difusão, alimentando-o. Concomitantemente, o mesoderma extra-embriônico também sofre proliferação, e aparecem espaços isolados dentro deles, que se fundem rapidamente, formando o celoma extra-embriônico. Este celoma é preenchido por fluidos e sua formação promove a redução do tamanho do saco vitelino primitivo, formando o saco vitelino secundário

ou definitivo.

A presença do mesoderma extra-embrionário, agora, restringe-se ao contorno do embrião implantado, próxima a camada de trofoblasto, que é formado por duas camadas celulares. O citotrofoblasto é uma camada interna mononucleada de células, de proliferação rápida, formadoras das novas células do trofoblasto. Essas células migram para o sinciotrofoblasto, fundem-se e perdem suas membranas plasmáticas. O sinciotrofoblasto é a camada externa, formada por uma massa contínua e multicelulada, cujos limites celulares são imperceptíveis. A membrana basal destas células as separa das células do citotrofoblasto. O sinciotrofoblasto é responsável pela produção de gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio que mantém a atividade do corpo lúteo.

Proliferações do citotrofoblasto, induzidas pelo mesoderma extra-embrionário, fazem com que ele penetre no sinciotrofoblasto, formando vilosidades coriônicas primárias, que originarão as vilosidades coriônicas da placenta (Figura 6 A e B).

O pedículo de mesoderma extra-embrionário, que conecta o embrião ao trofoblasto forma vasos sanguíneos, 2 veias e 1 artéria, e origina o cordão umbilical. Os vasos do cordão umbilical ramificam-se no mesoderma extra-embrionário do córion, formando os capilares presentes nas vilosidades coriônicas (Figura 6 C). As trocas gasosas, absorção de nutrientes e eliminação de excretas é realizada através da superfície dos capilares presentes nas vilosidades coriônicas.

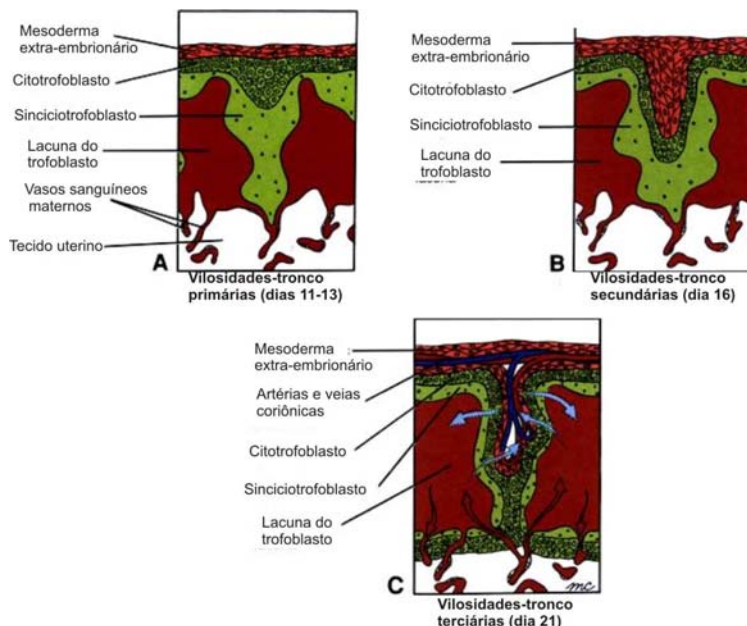


Fig. 6: Desenho esquemático representando a formação de vilosidades coriônicas induzidas pela presença do mesoderma extra-embriônico. A) Mesoderma extra-embriônico induz proliferação das células do citotrofoblasto. B) Células do mesoderma extra-embriônico e células do citotrofoblasto invadem o sinciotrofoblasto. C) Vasos sanguíneos são formados a partir do mesoderma extra-embriônico (Moore & Persaud, 2003).

Resumidamente, o córion é formado pelo mesoderma extra-embriônico e as duas camadas de trofoblasto, o sinciotrofoblasto e o citotrofoblasto. O córion e a decídua, ao fundirem-se, formam a placenta. O epitélio amniótico é derivado do ectoderma do epiblasto; a região de mesoderma do âmnion e do córion é derivada do mesoderma extra-embriônico; e a região trofoblástica do córion é derivada do trofoblasto.

1.4 Células mesenquimais derivadas da placenta

A placenta é composta pela membrana amniótica, o mesoderma coriônico, ambos de origem fetal, e a decídua, porção materna da placenta.

O potencial terapêutico dos tecidos amnióticos e coriônicos já é descrito desde o século XX. Em 1910, Davis relatou casos clínicos nos quais membranas

fetais foram utilizadas em transplantes de pele (DAVIS, 1910). Desde então, o uso de membranas amnióticas já foi descrito para tratamento de queimaduras (FAULK *et al.*, 1980, SUBRAHMANYAM, 1995), úlceras crônicas nos membros inferiores (WARD *et al.*, 1989), e, mais recentemente, têm sido usado como base para reconstrução da superfície ocular (GOMES *et al.*, 2005). Sabe-se a membrana amniótica pode auxiliar na regeneração da pele (GRUSS & JIRSCH, 1978), inibição do crescimento bacteriano (TALMI *et al.*, 1991), e do sistema imune celular, e além de estimular angiogênese (AKLE *et al.*, 1981; UETA *et al.*, 2002). No entanto, os mecanismos responsáveis por tais propriedades ainda não estão completamente elucidados (TSENG *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2000).

Estudos têm mostrado que MSCs residem no mesoderma do córion da placenta (FUKUCHI *et al.*, 2004) e apresentam propriedades imunossupressoras (LI *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2007), sendo assim uma das fontes mais seguras de células alogênicas para terapia celular.

Análises por microscopia óptica mostraram que as MSCs derivadas da placenta têm aproximadamente 30 μm de diâmetro por 100 μm de comprimento. No entanto, a análise do tamanho destas células por citometria de fluxo mostra que as células não aderidas apresentam tamanhos variados, cujo diâmetro varia entre 30 μm e 120 μm , indicando que ele seja pelo menos 6 vezes maior que um linfócito (BROOKE *et al.*, 2008).

Ao contrário das células trofoblásticas, as MSC derivadas do córion expressam CD9 (proteína transmembrana que modula adesão e migração celular, e ativação de plaquetas) e vimentina, não secretam o hormônio β -gonadotrofina coriônica (YEN *et al.*, 2005), e não expressam HLA-G e citoqueratina 7, marcadores típicos de células trofoblásticas (FRANK *et al.*, 2001).

O perfil fenotípico das MSCs derivadas do córion já foi descrito por diversos autores (IGURA *et al.*, 2004; YEN *et al.*, 2005; PORTMANN-LANZ *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006b), que confirmam a expressão de CD105, CD90, CD73, CD44, CD29 e HLA-ABC, e a ausência dos antígenos CD45, CD34, CD31, CD133, CD14, HLA-DR, um perfil muito semelhante aquele expresso por MSCs derivadas da medula óssea adulta, como foi descrito por Pittenger *et al.* (1999) e Minguell *et al.* (2001). Interessantemente, estudos mostram que as MSCs derivadas da placenta também são fortemente positivas para proteínas de membrana que geralmente estão associadas a superfície de células-tronco embrionárias, como o SSEA-4 (Antígeno embrionário de estágio específico 4), TRA1-60 e TRA1-80 (antígenos relacionados a matriz proteoglicana pericelular de tetracarcinomas e células-tronco embrionárias) (YEN *et al.*, 2005).

O estudo de Battula *et al.* (2007) mostrou que, além do SSEA-4, as MSC derivadas da placenta também expressam outros marcadores de células-tronco embrionárias, como FZD9, FZD10 (receptores tipo *Frizzled*), and CD318 (CDCP1, Buhring *et al.*, 2004), Octamer-4 (Oct-4, uma proteína associada a auto-renovação de CTE indiferenciadas) e Nanog (fator de transcrição expresso por CTE que exerce um papel muito importante na manutenção da pluripotencialidade), sugerindo que essas células apresentam um fenótipo mais imaturo que as MSCs derivadas da medula óssea. Além disso, este trabalho mostrou que a expressão destes marcadores aumenta quando as células são cultivadas em meio de cultura livre de soro fetal bovino, como descrito por Xu *et al.* (2001). Em adição, Nishishita *et al.* (2004) mostraram que essas células secretam, de maneira expressiva, VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), em proporções semelhantes a aquela produzida por células HeLa.

A análise das MSC coriônicas por microscopia eletrônica de transmissão revela que, apesar de fenotipicamente semelhantes, as MSC coriônicas e as MSC de medula óssea apresentam diferenças ultra-estruturais, que talvez explique o potencial de diferenciação de cada uma (PASQUINELLI *et al.*, 2007).

A diferenciação das MSC coriônicas em células com características endoteliais e neurais já foi descrita (YEN *et al.*, 2005; MIAO *et al.*, 2006), além da diferenciação em linhagens mesodérmicas clássica, tanto para culturas primárias como para células imortalizadas (ZHANG *et al.*, 2006a). Trabalho conduzido por Okamoto e colaboradores (2007) relatou a diferenciação de MSC da placa coriônica em cardiomiócitos funcionais, através da co-cultura com cardiomiócitos neonatais de camundongos, e o alto índice de diferenciação desta células quando comparado com o das MSC de medula óssea submetidas ao mesmo protocolo. Constatou-se que as MSC coriônicas extraídas da placa coriônica expressam o fator de transcrição Csx/Nkx2.5 ainda no seu estado indiferenciado, o que lhes confere potencial cardiogênico (OKAMOTO *et al.*, 2007). Além disso, Portmann-Lanz *et al.* (2006), ao submeterem MSCs de origem coriônica a diferenciação neurogênica por meio do ácido retinóico, mostraram que elas são capazes de expressar marcadores típico de células-tronco neurais, precursores neuronais e neurônios maduros, e têm potencial neurogênico maior que aquele expresso por MSCs derivadas da medula óssea, células amnióticas epiteliais e MSCs derivadas do âmnion.

Como a maioria das MSCs humanas, as MSC derivadas da placenta têm vida média de 21 duplicações da população, quando então entram em estágio de senescência e cessam a divisão celular (CAMPISI, 1996). A senescência celular pode ser provocada pela disfunção ou perda de expressão das telomerasas (HARLEY, FUTCHER & GREIDER, 1991). Em adição, o crescimento celular pode

ser suspenso quando as células são submetidas a estresse oxidativo ou danos ao DNA (RAMIREZ *et al.*, 2001). As MSCs coriônicas puderam ser imortalizadas com sucesso através da ativação da telomerase e regulação negativa do gene INK4a, que codifica o supressor tumoral p16 (ZHANG *et al.*, 2006a).

A baixa imunogenicidade das células derivadas da placenta (células epiteliais e mesenquimais) é caracterizada pela baixa expressão de antígenos de MHC de classe I e a ausência de moléculas de MHC classe II (KUBO *et al.*, 2001). Graças a isso, essas células têm sido usadas em diversos procedimentos cirúrgicos, como o tratamento da perda destrutiva de córnea (SOLOMON *et al.*, 2003) e em ensaios pré-clínicos, onde mostraram-se capazes de se estabelecer com sucesso em diversos órgãos e tecidos de ratos e suínos neonatais após transplante, formando microquimeras (BAILO *et al.*, 2004).

Apesar de vários autores terem definido as propriedades *in vitro* das MSCs derivadas da placenta, poucos expõem, de maneira clara, qual região placentária está sendo utilizada, e poucos estudos comparam a presença de MSCs no mesoderma extra-embriônico presente na placa coriônica e no estroma das vilosidades coriônicas.

2. Objetivos

Objetivo geral:

- Estabelecer um modelo de cultura de células derivadas do mesoderma extra-embriônico da placa coriônica e vilosidade coriônica da placenta

Objetivos específicos:

- Isolar e cultivar as células derivadas do mesoderma extra-embriônico da placa e vilosidade coriônica.
- Caracterizar o perfil imunofenotípico das células derivadas de ambas regiões cultivadas em 3ª passagem.
- Comparar o perfil imunofenotípico das células da placa e vilosidades coriônica cultivadas com a fração recém isolada.
- Diferenciar as células do mesoderma extra-embriônico da placa e vilosidade coriônica em adipócitos e osteócitos.

3. Materiais e métodos

3.1 Material

Foram utilizadas 12 placentas humanas de gestações a termo (entre 38 e 42 semanas) obtidas na Clínica Perinatal do Centro Pré-Natal de Diagnóstico e Tratamento (CPDT®) - Rio de Janeiro-RJ, após parto cesáreo e com o consentimento da paciente, que em geral, eram gestantes com até 32±2 anos de idade, com gestações normais, não fumantes, sem doença hipertensiva, diabetes e infecções diagnosticadas e, também, com aprovação do Comitê de Ética da Clínica Perinatal e da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento das células derivadas do mesoderma extra-embriônico da placenta a termo

Para isolamento das células derivadas da placa coriônica e vilosidades coriônicas, a membrana amniótica foi removida mecanicamente do córion da placenta e descartada. Porções de aproximadamente cinco gramas da placa coriônica e vilosidades coriônicas foram retiradas da placenta, e armazenada, separadamente, em duas placas de Petri contendo BSS (Solução Salina Balanceada) (138mM NaCl; 54mM KCl; 1,1 mM Na₂HPO₄, 1,1 mM KH₂PO₄, 6,11 mM C₆H₁₂O₆; 0,082 mM CaCl₂; 0,6 mM MgSO₄; 0,025% Vermelho de Fenol; pH 7,4). Sucessivas lavagens com BSS foram feitas para retirar o excesso de sangue. Em seguida, os tecidos foram fragmentados para facilitar a próxima etapa, a digestão enzimática.

Os tecidos fragmentados foram colocados, separadamente, em dois

Erlenmeyer, e pesados em uma balança analítica, para determinar com precisão a quantidade de cada tecido que estava sendo processado. Soluções de colagenase (Worthington collagenase II, 400 U/mg) em PBS (Solução Tampão de Fosfato) (138,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,9 mM KH_2PO_4 ; 6,4 mM Na_2HPO_4 .) 100 U/mL para placa coriônica e 200 U/mL para as vilosidades coriônicas, suplementadas com 100 U/mg de penicilina e 100 mg/ml estreptomicina foram adicionadas aos Erlenmeyers. Os Erlenmeyers foram vedados cuidadosamente e colocados em um agitador a 37°C, onde os tecidos foram submetidos à digestão enzimática por aproximadamente 12h.

Os dois homogenatos com os tecidos digeridos foram colocados em dois tubos de poliestireno Falcon® de 50 ml. Cada tubo foi completado com BSS até 50 ml a fim de reduzir a viscosidade e centrifugado durante 15 minutos a 670 x g em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado de cada tubo foi ressuscitado em 50 mL de BSS. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado de cada tubo foi ressuscitado em 50 mL de BSS. Após 15 minutos, os fragmentos de tecido não digeridos depositaram-se no fundo do tubo. Os sobrenadantes foram retirados com uma pipeta graduada, colocados em novos tubos de poliestireno de 50 mL e submetidos a uma nova centrifugação por 15 minutos a 240 x g. Os sobrenadantes foram descartados mais uma vez e os sedimentos de células provenientes do mesmo tecido foram ressuscitados em um total de 10 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich Co.) e adicionados cuidadosamente sobre 10 mL de Ficoll-Paque (1,077g/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) de forma que duas fases distintas obtidas por diferença de densidade fossem observadas. Em seguida, estes conteúdos foram centrifugados por 30 minutos a 400 x g a temperatura ambiente,

com objetivo de se obter anéis de células mononucleares formados por diferença de velocidade de sedimentação e visíveis na interface Ficoll-Paque - Meio de cultura.

Os anéis de células foram coletados e armazenados, separadamente, em tubos de poliestireno de 15 ml (Falcon®) com a adição de aproximadamente 10 ml de BSS. Para remover o excesso de Ficoll-Paque®, eles foram centrifugados três vezes, durante 10 minutos a 240g x. Os precipitados finais foram ressuspendidos em cinco mL de Meio de cultura DMEM suplementado com 15% Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab®), 100 U/ml de Penicilina e 100mg/ml de Estreptomicina (Gibco). Para lisar hemácias ainda presentes na amostra e facilitar a contagem de células, uma alíquota 10 µL de cada tipo celular foi adicionada a uma alíquota de solução de ácido acético 3%, na proporção de 1:1. Dos 20 µL resultantes, 10 µL foram adicionados a uma alíquota de 10 µL de corante Azul de Trypan, corante capaz de penetrar apenas a membrana de células mortas, corando-as de azul. Os 20 µL resultantes foram transferidos para a Câmara de Neubauer, e a visualização no microscópio óptico permitiu a contagem das células viáveis pelo método de exclusão do Azul de Trypan. A quantidade de células extraída por cada grama de tecido processado foi calculada. As células obtidas foram divididas para caracterização por citometria de fluxo e cultura de células.

3.2.2 Expansão das células

As células derivadas da placa coriônica e da vilosidade coriônica foram plaqueadas a aproximadamente 10^5 células/cm² em garrafas de poliestireno de 25 cm² (Falcon® 3847) previamente gelatinizadas (Gelatina Sigma-Aldrich Co., 0,01%). Elas foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 15% SFB, 2 mM de L-Glutamina (Sigma®) 100 U/ml de Penicilina e 100mg/ml de

Estreptomicina (Gibco), e foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂.

Após dois dias, o meio de cultura foi retirado das garrafas, e centrifugado a por 10 minutos a 240 x g em temperatura ambiente. Os precipitados de células foram ressuspensos em 5 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 15% SFB, 100 U/ml de Penicilina e 100mg/ml de Estreptomicina (Gibco), e recolocados nas suas respectivas garrafas. No terceiro dia após o plaqueamento inicial, o meio de cultura foi descartado, junto com células não aderentes, e as células aderentes foram lavadas, cuidadosamente, três vezes com BSS. Novo meio de cultura DMEM suplementado com 15% SFB, 100 U/ml de Penicilina e 100mg/ml de Estreptomicina (Gibco) foi adicionado em cada garrafa. O meio de cultura era renovado 2-3 vezes por semana. As células foram mantidas em cultura até atingirem 85% de confluência, quando então passam pelo processo de tripsinização, com Tripsina 0,25% + 0,01% EDTA (Gibco).

O meio de cultura das garrafas foi descartado. Em seguida, as células foram lavadas com solução BSS-CMF (Solução Salina Balanceada Livre de Cálcio e Magnésio) (138 mM NaCl; 54 mM KCl; 1,1 mM Na₂HPO₄, 1,1 mM KH₂PO₄, 6,11 mM C₆H₁₂O₆; 0,8 mM Na₂SO₄; 0,025% Vermelho de Fenol, pH 7,4) para remover o excesso de meio de cultura DMEM e SFB. Essa etapa foi repetida pelo menos duas vezes. Em seguida, era aplicada tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) (40 µL de tripsina por cm²) por 2 minutos. Durante este período, era realizada agitação mecânica manual monitorada por microscópio óptico para visualizar a perda de adesão das células ao frasco de cultura. A ação da tripsina foi bloqueada com a adição de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, na proporção de 1:2. O conteúdo da garrafa de cultura foi removido, colocado em um tubo de poliestireno de 15 mL (Falcon®), e

centrifugado a 240 x g por 10 minutos a temperatura. O sobrenadante foi descartado vertendo o tubo sobre um recipiente de descarte.

As células da placa coriônica e as células das vilosidades coriônicas, agora chamadas de primeira passagem, foram contadas através do método de exclusão do Azul de Trypan, com auxílio da câmara de Neubauer, como descrito previamente, e plaqueadas a aproximadamente 10^4 células/cm². O meio de cultura DMEM suplementado com 15% SFB, 100 U/ml de Penicilina e 100mg/ml de Estreptomicina (Gibco) era renovado a cada 3-4 dias. O procedimento para cultivo repetiu-se, até que fossem obtidas células de terceira passagem. As células da placa coriônica e das vilosidades coriônicas de terceira passagem foram caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo, ou submetidas ao processo de indução adipogênica e osteogênica.

3.2.3 Citometria de fluxo

As células da placa coriônica e das vilosidades coriônicas, tanto recém isoladas, como de terceira passagem, foram incubadas com anticorpos específicos contra marcadores associados a linhagens mesenquimais, hematopoiéticas e endoteliais.

Foram utilizados os seguintes anticorpos: CD105 conjugado ao Isotiocianato de Fluoresceína (FITC); CD45 conjugado ao Alofocianina (APC); CD133, CD166, CD14 e CD73 conjugados ao Ficoeritrina (PE); CD90, CD54, CD117 e HLA-DR conjugados ao PE-Cy5; e CD34 conjugado ao PE-Cy7. Os anticorpos Anti-CD90, anti-CD105, anti-CD14 e anti-CD45 foram fornecidos pela Immunostep, os anticorpos anti-CD117, anti-CD34, anti-HLA-DR, anti-CD166 e anti-CD54, pela BD Pharmingen™, e o anticorpo anti-CD133, pela Macs Miltenyi Biotec.

As células da placa coriônicas e das vilosidades coriônicas em terceira passagem foram removidas dos frascos pela ação da tripsina 0,25%+ 0,01% EDTA (Gibco), como descrito previamente. Os precipitados de células tripsinizadas e as células a fresco, derivadas da placa coriônica ou das vilosidades coriônicas, foram ressuspensos em PBS (Solução Tampão de Fosfato) (138,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,9 mM KH_2PO_4 ; 6,4 mM Na_2HPO_4) e centrifugados a 1510 x g por três minutos, a temperatura ambiente. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes, para a eliminação do excesso de meio de cultura. Terminado o processo de lavagem, as células foram ressuspensas em 600 μL de PBS. Deste total, uma alíquota da ordem de 10 μL foi adicionada a uma alíquota de Azul de Trypan, na proporção de 1:1. Os 20 μL resultantes foram separados em duas alíquotas para contagem na câmara de Neubauer. Foram separadas aproximadamente 500.000 células por tubo de poliestireno (12x75mm, Falcon®) para marcação com anticorpos específicos. Nos tubos 1 a 4, foram adicionados 3 μL de anticorpos de acordo com a Tabela 1.

O tubo número 5 foi utilizado como controle negativo. Nele foram colocadas as células e 3 μL de anticorpos isotipos. Os anticorpos isotipos são imunoglobulinas cujo fragmento Fab (porção do anticorpo específica para ligação do antígeno) está inativado. Assim, esse anticorpo só é capaz de ligar-se a célula pelo fragmento Fc (porção constante). Essa ligação só acontecerá se houver um sítio de ligação inespecífico para estes fragmentos na superfície celular. Como os controles isotipos são produzidos em camundongos, é muito baixa a probabilidade de haver na membrana de uma célula humana um sítio de ligação para a porção Fc de camundongo. Assim, qualquer emissão de fluorescência associada ao controle isotipo é relacionada a ligações inespecíficas. Neste trabalho utilizamos isotipos

conjugados aos fluorocromos FITC e PE.

O tubo número 6 foi o tubo branco, ou seja, nele foram adicionadas células e nenhum tipo de anticorpo. Este tubo é muito importante para ajustarmos a auto-fluorescência natural da célula. As células, principalmente aquelas mantidas em cultura por longos períodos, passam a emitir auto-fluorescência. Assim, o tubo branco foi utilizado para não confundirmos a auto-fluorescência natural celular com aquela emitida pelas ligações específicas dos anticorpos.

Todos os tubos foram guardados ao abrigo da luz por 20 minutos, permitindo a ligação antígeno-anticorpo. Após esse período, o volume em cada tubo foi completado até 500 μ L com PBS.

Tabela 1: Painel de anticorpos utilizados na caracterização das células derivadas da placa coriônica e vilosidades coriônicas.

	APC	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7
Tubo 1	CD45	CD105	CD 133	CD90	CD34
Tubo 2	CD45	CD105	CD166	CD54	CD34
Tubo 3	CD45	CD105	CD14	HLA-DR	CD34
Tubo 4	CD45	CD105	CD73	---	CD34
Tubo 5	---	Isotipo	Isotipo	---	---
Tubo 6	---	---	---	---	---

As amostras foram analisadas no citometro FACSaria II, adquiridas e analisadas pelo software FACSDiva (BD Bioscience).

Os anticorpos CD45 e CD34 foram utilizados como base para todas as análises. A presença ou ausência destes marcadores permitiu uma triagem das

células analisadas de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2: Identificação das células por citometria de fluxo, baseado na expressão dos marcadores CD45 e CD34.

Marcadores	Classificação	Referência
CD45 ⁺ CD34 ⁺	Células precursoras hematopoiéticas	KATZ <i>et al.</i> , 1985
CD45 ⁺ CD34 ⁻	Células hematopoiéticas maduras	DAHLE <i>et al.</i> , 2004
CD45 ⁻ CD34 ⁺	Células precursoras endoteliais	HRISTOV, ERL & WEBER, 2003
CD45 ⁻ CD34 ⁻	Células mesenquimais	PITTENGER <i>et al.</i> , 1999

Assim a população de interesse foi identificada através da exclusão das células que expressavam CD45 ou CD34. Os demais marcadores eram muito importantes para facilitar essa exclusão, uma vez que cada tubo permitia a identificação de certos tipos celulares. O Tubo 1 identificava células precursoras endoteliais (CD45⁻ CD34⁺ CD133⁺), MSCs (CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ CD90⁺) e células precursoras hematopoiéticas (CD45⁺ CD34⁺ CD90⁺). Os anticorpos no tubo 2 permitiam a identificação de MSCs (CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ CD166⁺ CD54⁺), células precursoras endoteliais (CD45⁻ CD34⁺ CD54⁺). As marcações do tubo 3 eram muito importantes para a identificação de células hematopoiética maduras da linhagem dos monócitos-macrófagos (CD45⁺ CD34⁻ CD14⁺ HLA-DR⁺). E, por fim, analisando o tubo 4, eram possível identificar células precursoras endoteliais (CD45⁻ CD34⁺ CD73⁺) e MSCs (CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ CD73⁺).

3.2.4 Cultura de fibroblastos cardíacos

Para sua obtenção, foram utilizados ratos Wistar neonatos com 1-2 dias de

nascimento. Os animais foram rapidamente sacrificados e os corações removidos e colocados em placa de Petri contendo PBS gelado. Foram utilizados, em média, dois corações por experimento. Os corações foram rapidamente lavados, para remover o excesso de sangue, e transferidos para outra placa com solução de dissociação (NaCl 136,7mM; KCl 2,68mM; Na₂HPO₄ 0,352mM; NaHCO₃ 11,9mM; Dextrose 11mM) contendo pancreatina 1,25mg/mL e albumina de soro bovino (BSA) 3mg/mL. Os corações foram cortados com auxílio de pinça e tesoura e transferidos para um frasco contendo uma barra magnética e 5mL de solução de dissociação. Após 5 minutos de digestão a 37°C em banho-maria sobre uma placa de aquecimento e agitação, o conteúdo digerido foi transferido para um tubo de poliestireno (Falcon®) de 15 mL e a atividade da enzima foi bloqueada com a adição de 5 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB. O conteúdo foi centrifugado a 240 x g por 5 minutos. O tecido não digerido passou por 5 ou 6 novos ciclos de digestão. Ao término da dissociação, as células foram submetidas a um pré-plaqueamento de 1 hora em garrafas de 75cm² (Falcon®) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Como os fibroblastos aderem ao frasco de cultura mais rapidamente que os cardiomiócitos, após 1 hora, o sobrenadante foi coletado. O frasco de cultura foi lavado com BSS e, em seguida, foi adicionado DMEM suplementado com 15% SFB, 50 U/ml Penicilina e 50 mg/ml estreptomicina. Os fibroblastos cardíacos foram mantidos em cultura a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, como descrito anteriormente, até a terceira passagem.

3.2.5 Estudos de diferenciação

A capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica das células derivadas da placa coriônica, vilosidades coriônicas e da cultura de fibroblastos cardíacos, expandidos até terceira passagem, foi testada como descrito previamente

(PITTINGER *et al.*, 1999). Resumidamente, as células foram plaqueadas a uma densidade de 10^4 células/cm² em placa 24 poços (TTP®).

Para indução da osteogênese, as células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, 50 U/ml Penicilina, 50 mg/ml estreptomicina, 10^{-7} μM de dexametasona, 10mM de β-glicerofosfato, e 50 μM de ácido ascórbico (todos reagentes são da Sigma-Aldrich).

Para indução da adipogênese, as células foram cultivadas em meio de cultura DMEM high glicose suplementado com 10% SFB, 50 U/ml Penicilina, 50 mg/ml Streptomicina, 50 μM de indometacina, 10μg/ml de insulina humana, e 10^{-7} μM de dexametasona (todos reagentes são da Sigma-Aldrich).

Após 21 dias de cultivo em meio de indução, as células foram fixadas com Formaldeído 10% em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. O fixador foi retirado e as células foram lavadas com água destilada. Depois de seca, foi adicionado aos poços da placa de cultura os corantes Vermelho de Alizarina 1% (Sigma-Aldrich) e Óleo Vermelho O 0,2% (Sigma-Aldrich), capazes de corar aglomerados de cristais de cálcio e vacúolos citoplasmáticos de lipídeos, respectivamente, por aproximadamente 20 minutos. O corante foi retirado e as placas foram lavadas novamente com água destilada.

3.2.6 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como Média ± Desvio Padrão. Para análise entre grupos independentes, foi utilizado teste t de Student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0,01$.

4. Resultados

4.1 Isolamento

Na tentativa de encontrar uma fonte alternativa de células mesenquimais a partir do mesoderma extra-embrionário de placentas humanas, foi desenvolvido um protocolo para isolar células da placa coriônica (Figura 7A) e das vilosidades coriônicas (Figura 7B) das placentas a termo. Nossos dados demonstraram que o protocolo utilizado resultou na obtenção de células cuja viabilidade era superior a 95%, pelo teste de exclusão de corante Azul de Trypan.

A Figura 8 mostra a quantidade de células que foram obtidas a partir de um grama de cada região da placenta, após o término do protocolo de isolamento. Observa-se que o processamento da placa coriônica proporcionou o isolamento de mais células placentárias que o processamento das vilosidades coriônicas ($22,0 \pm 6,30 \times 10^5$ células/grama de placa coriônica e $6,30 \pm 3,5 \times 10^5$ células/grama de vilosidade coriônica $p=0,0035$).

4.2 Morfologia

Células obtidas após o término do protocolo de isolamento celular foram plaqueadas a uma densidade de $4,0 \times 10^5$ células/cm² em frascos de cultura previamente gelatinizados. A partir do 2º dia em cultura, as células aderentes ao plástico exibiam morfologia semelhante a de fibroblastos. Em aproximadamente 5 dias, elas formavam uma monocamada celular. As células não aderentes foram removidas da cultura após lavagens com BSS ou BSS-CMF, antes da troca de meio de cultura ou passagens enzimáticas, respectivamente (Figura 9 A e C).

As células atingiam a confluência 5 dias após o plaqueamento inicial, e em

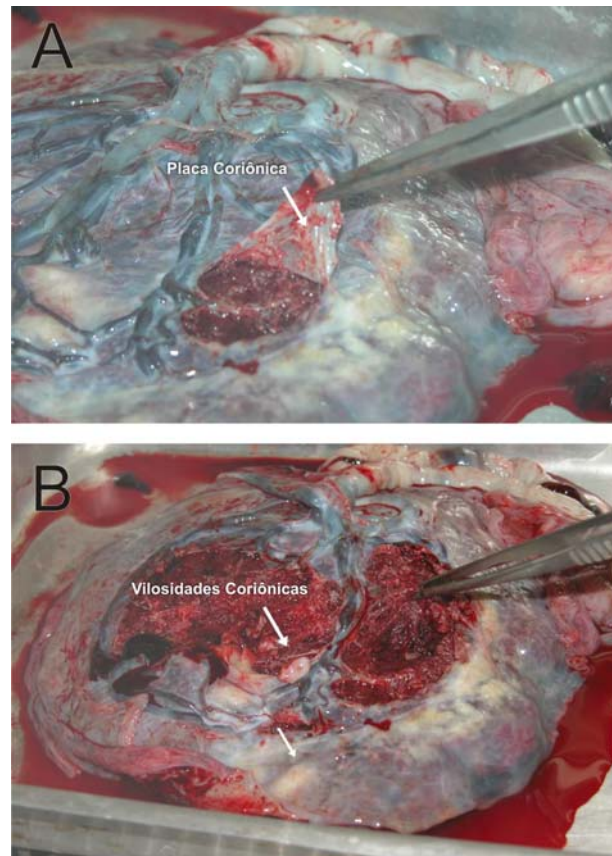


Figura 7: Foto ilustrando a face fetal da placenta. A) Placa coriônica; e B) Vilosidades coriônicas.

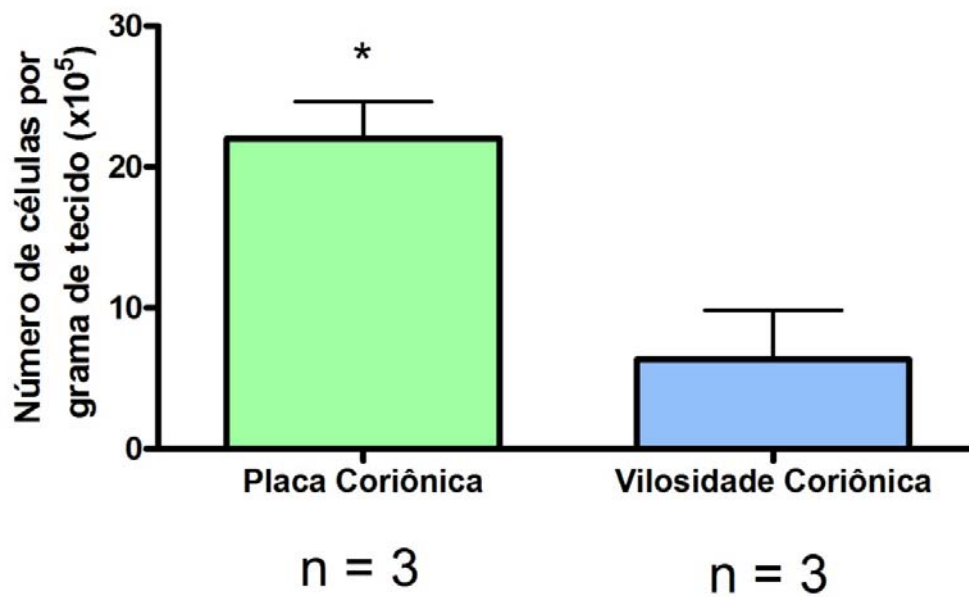


Fig.8: Número de células extraídas por cada grama de tecido placentário submetido ao protocolo de isolamento celular. * $p= 0,0035$

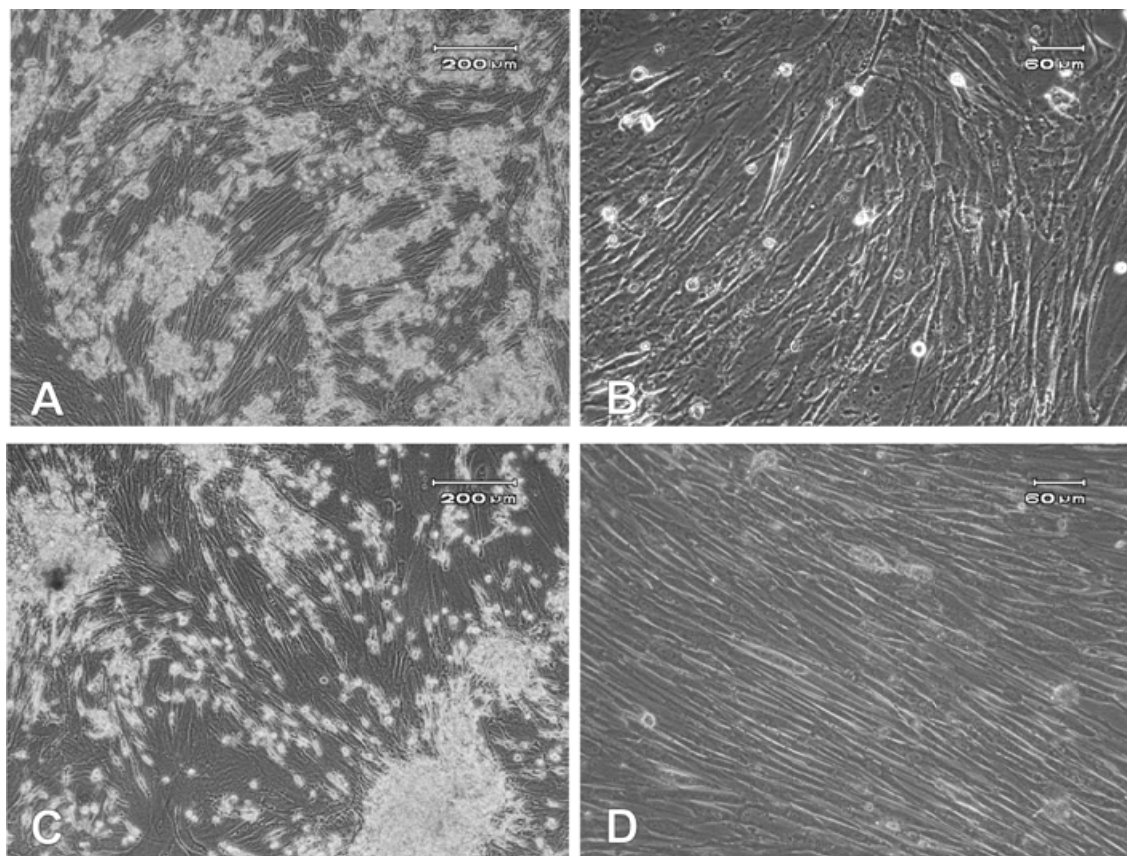


Fig. 9: Aspecto morfológico das células derivadas da placenta. (A) Células derivadas da placa coriônica e (C) células derivadas das vilosidades coriônicas, antes da primeira passagem enzimática, após 5 dias em cultura. (B) Células derivadas da placa coriônica e (D) células derivadas das vilosidades coriônicas em terceira passagem, após 20 dias em cultura.

aproximadamente 20 dias em cultura, elas formavam uma monocamada confluyente em terceira passagem. A morfologia semelhante a de fibroblastos observada após plaqueamento inicial foi mantida durante todo o experimento (Figura 9 B e D).

4.3 Imunofenotipagem

Buscamos avaliar, por meio da citometria de fluxo, qual tipo celular estava presente na cultura de células derivadas da placa e vilosidades coriônicas da placenta. Utilizando os critérios estabelecidos para análise, foram identificadas duas populações: uma população CD45⁻ CD34⁻ e outra população CD45⁺ CD34⁻.

A população CD45⁻ CD34⁻ compreendia a maioria das células presentes nas culturas, representando 92,0±1,4% das células derivadas da placa coriônica e 79,1±2,9% das células derivadas das vilosidades coriônicas. O gráfico de dispersão SSC x FSC (granulosidade x tamanho) está representado na Figura 10A e 12A. As células CD45⁻ CD34⁻ (Figura 10B e 12B) expressavam os antígenos CD105, CD73, CD90 (Figura 10C e 12C), CD166 e CD54 (Figura 11A e 13A) e, eram negativas para marcadores hematopoiéticos CD133, CD14 e HLA-DR (Figura 11B e 13B). O painel fenotípico expresso por ambas populações assemelha-se aquele descrito para MSCs derivadas de medula óssea humana (PITTINGER *et al.*, 1999).

Baseando-se na recomendação feita pela Sociedade Internacional para Terapia Celular, na qual é sugerido que pelo menos 95% da população de MSCs derivadas da medula óssea humanas expressem CD90, CD73 e CD105, ao mesmo tempo em que no máximo 2% sejam positivas para marcadores hematopoiéticos

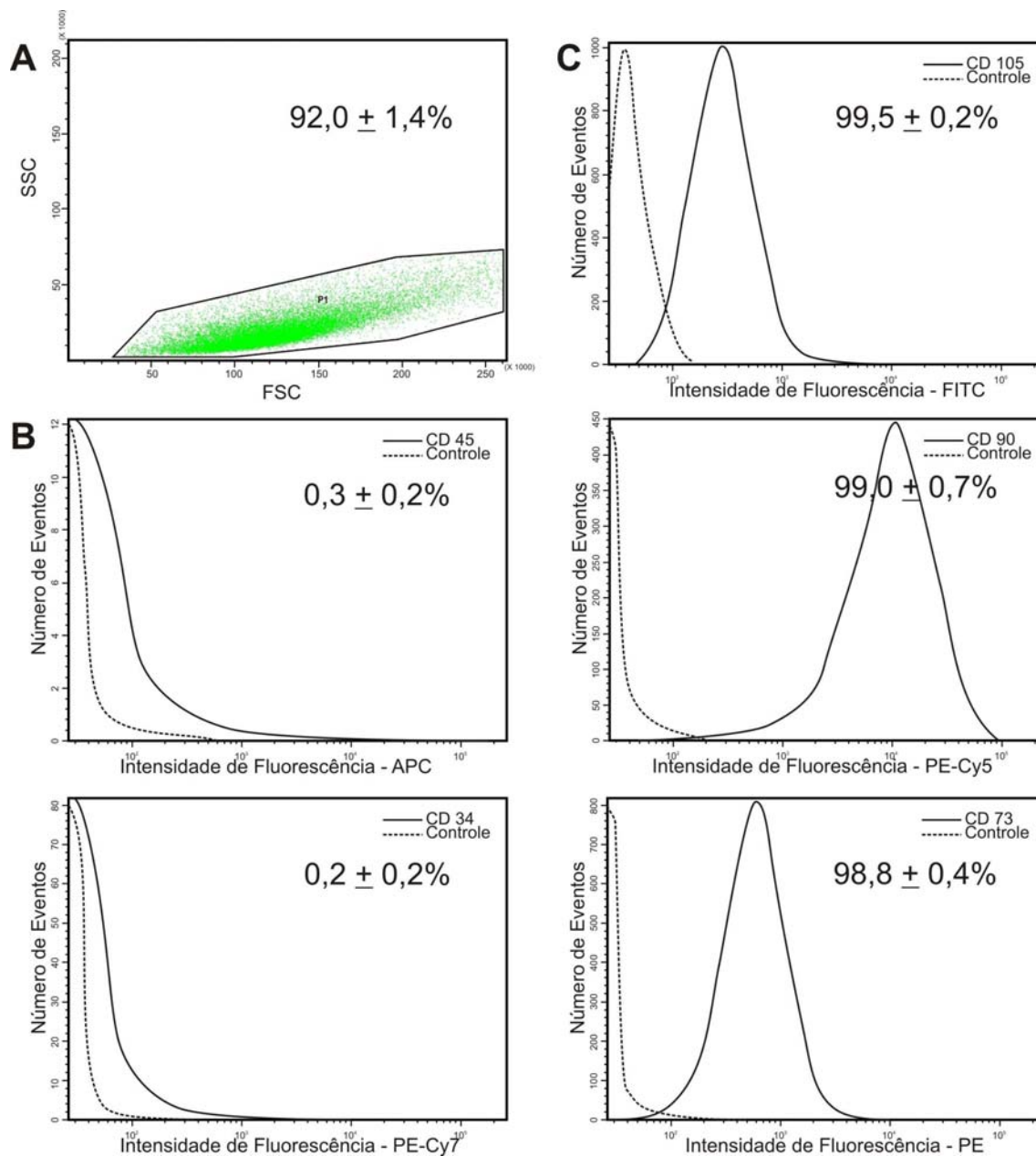


Fig. 10: Caracterização por citometria de fluxo da população prevalente na cultura de células derivadas da placa coriônica em terceira passagem, mostrando (A) a relação tamanho-granulosidade das células, (B) ausência da expressão dos marcadores CD45 e CD34 e (C) a expressão das proteínas CD105, CD90, CD73.

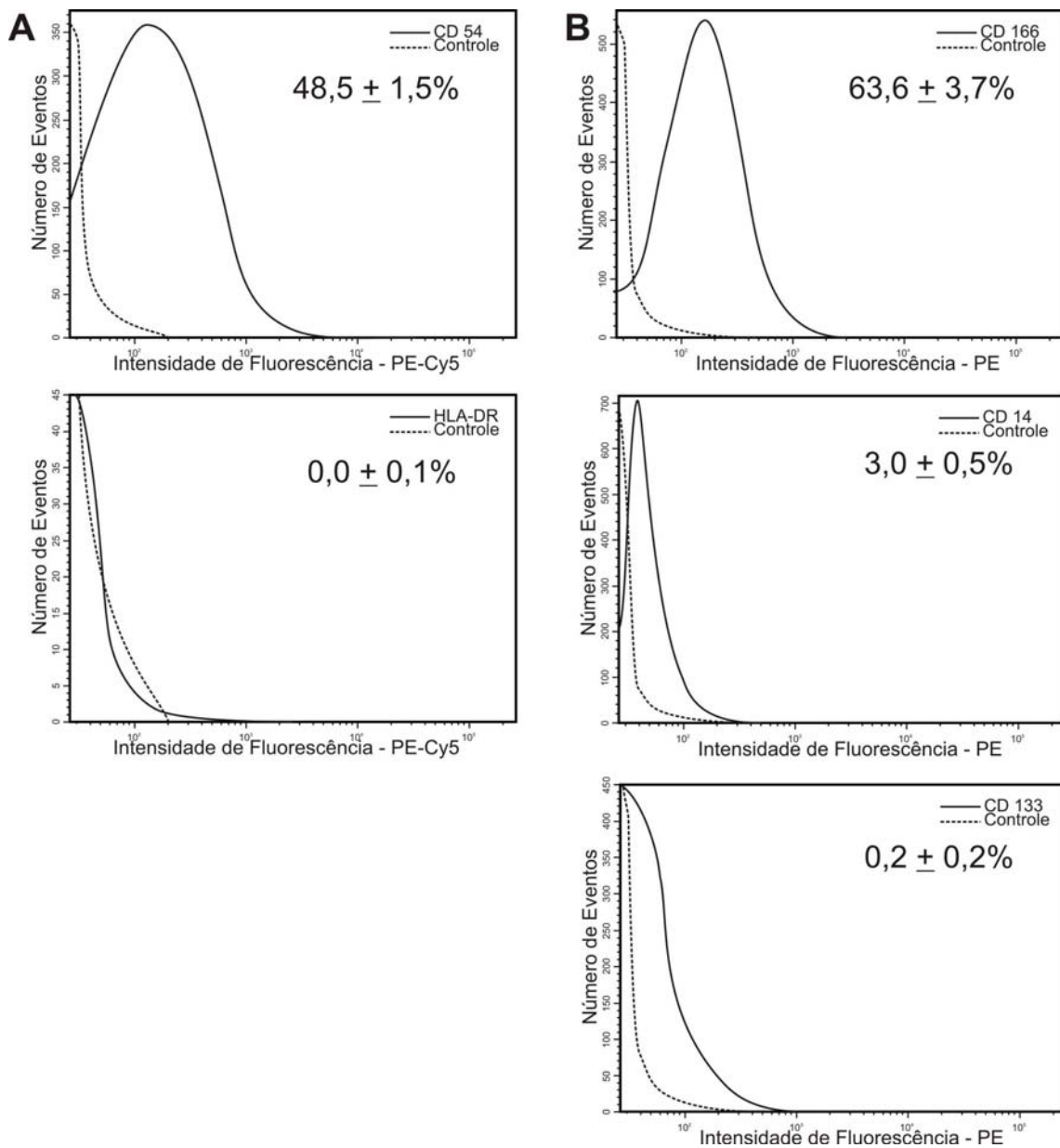


Fig. 11: Caracterização por citometria de fluxo da população prevalente na cultura de células derivadas da placa coriônica em terceira passagem, mostrando (A) expressão de CD54 e CD166 e (B) baixa expressão dos marcadores CD14, CD133 e HLA-DR.

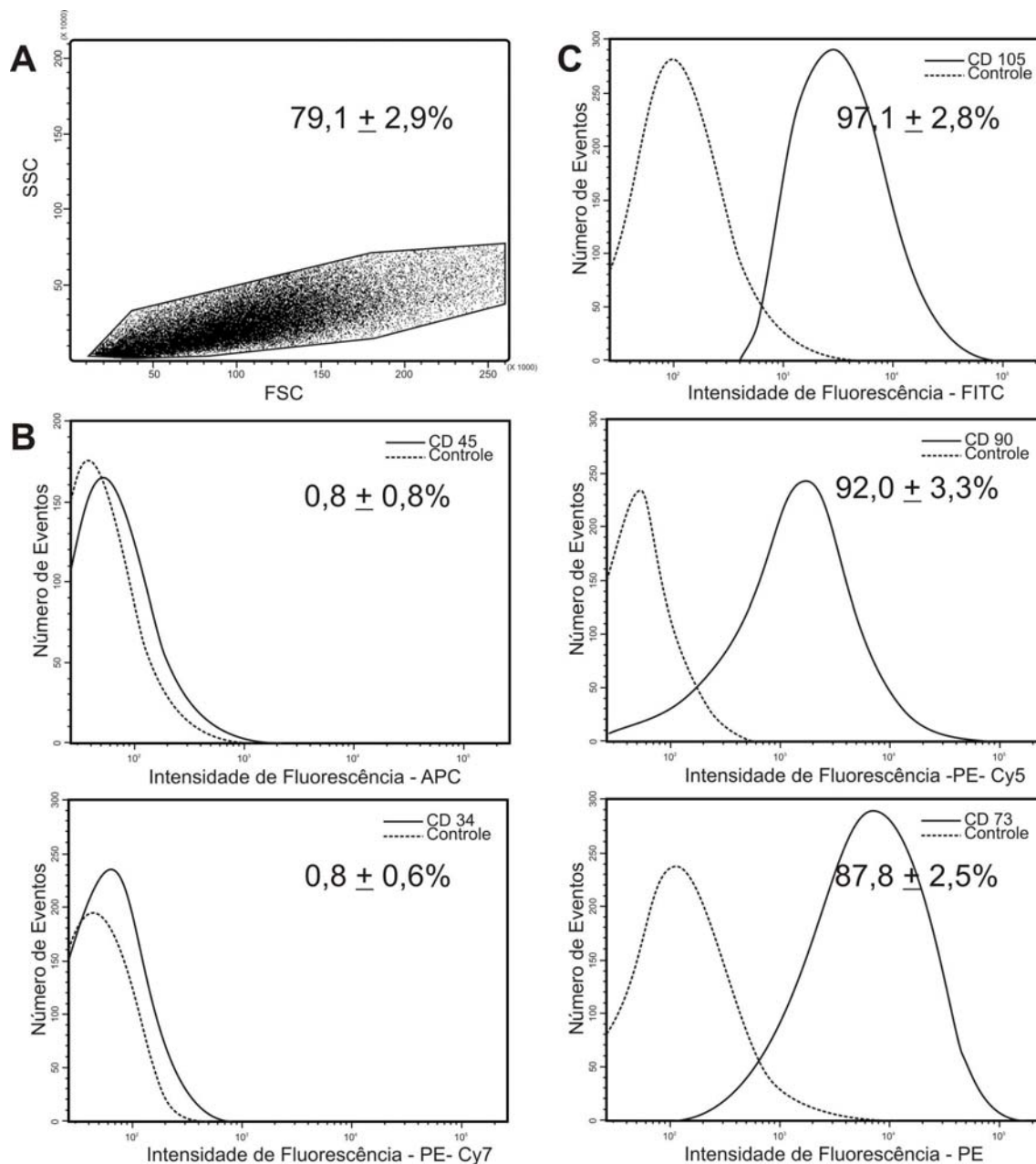


Fig. 12: Caracterização por citometria de fluxo da população prevalente na cultura de células derivadas das vilosidades coriônicas em terceira passagem, mostrando (A) a relação tamanho-granulosidade das células, (B) ausência da expressão dos marcadores CD45 e CD34 e (C) a expressão das proteínas CD105, CD90, CD73.

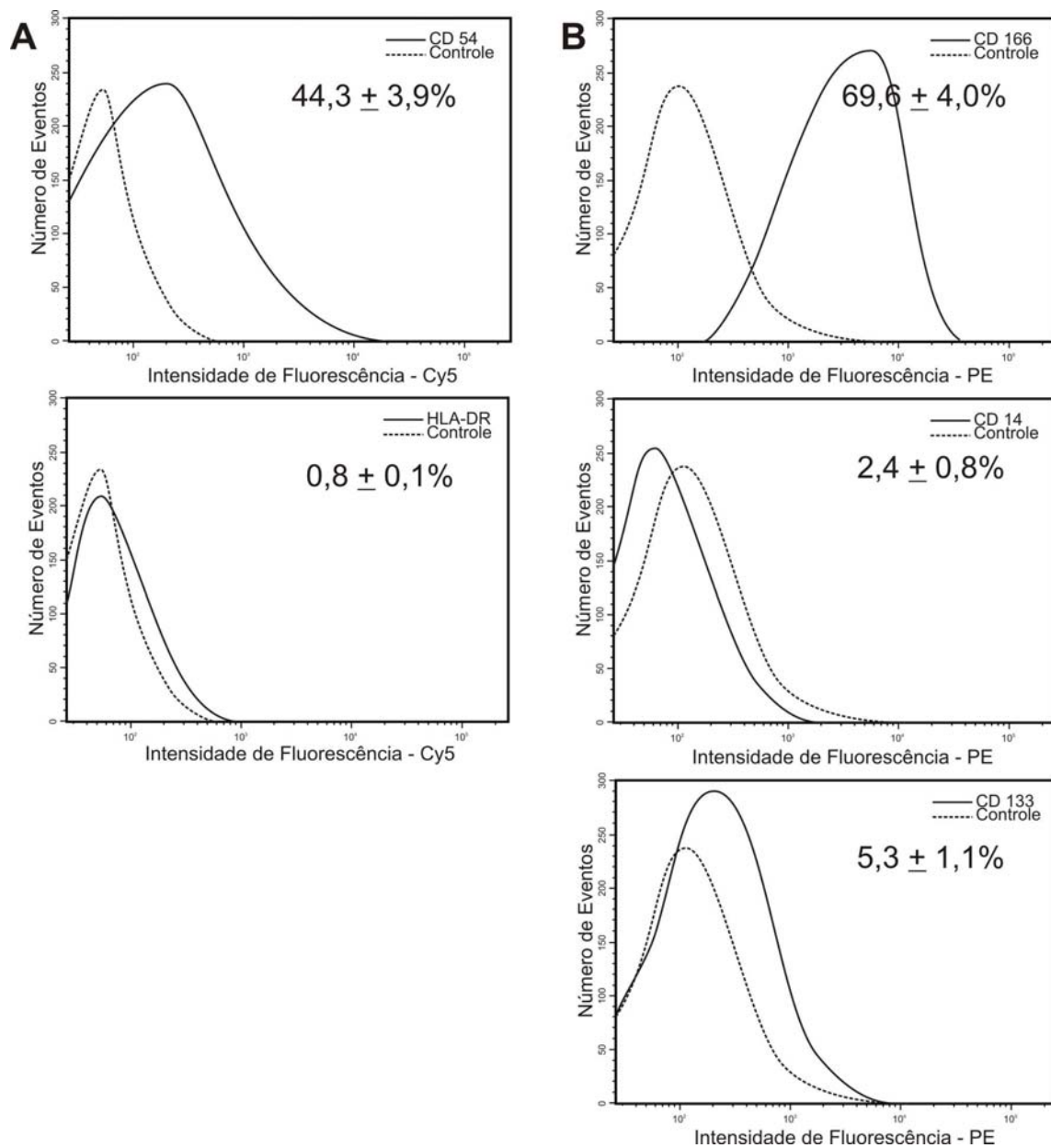


Fig 13: Caracterização por citometria de fluxo da população prevalente na cultura de células derivadas das vilosidades coriônicas em terceira passagem, mostrando (A) expressão de CD54 e CD166 e (B) baixa de expressão dos marcadores CD14, CD133 e HLA-DR.

como CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006), analisamos a expressão de cada um dos antígenos nas populações CD45⁻ CD34⁻ com características mesenquimais. Como estão representadas na Tabela 3, aproximadamente 90% das células derivadas da placa coriônica e da vilosidade coriônica expressavam CD90, CD105 e CD73 (Figura 14).

Em seguida, analisando a expressão do CD54 e CD166, observamos que a expressão do CD54 dava-se em apenas $48,5 \pm 1,5\%$ e $44,3 \pm 3,9\%$ das células derivadas da placa coriônica e vilosidade coriônica, respectivamente. Da mesma maneira, observamos que a proteína CD166 estava sendo expressa em $63,6 \pm 3,7\%$ e $69,6 \pm 4,0\%$ das células da placa e vilosidade coriônicas, respectivamente. Estes dados corroboram com as análises destes antígenos em células derivadas do córion, publicados por Bailo *et al.* (2004) e Yen *et al.* (2005), respectivamente. As MSC derivadas da medula óssea humana também expressam moléculas de adesão, como CD54 e CD166, como descrito por Conget e Minguell (1999). No entanto, estes autores descreveram que tais moléculas são expressas de maneira homogênea no tipo celular descrito, diferentemente dos resultados encontrados neste estudo.

Observamos que, em relação as células da placa coriônica, as células derivadas das vilosidades coriônicas apresentavam um aumento da expressão do antígeno CD133 ($0,2 \pm 0,2\%$ versus $5,3 \pm 1,1\%$; $p = 0,0015$). Não houve diferença significativa em relação a expressão do CD14 e HLA-DR (Figura 14).

A população CD45⁺ CD34⁻ estava presente em menor proporção, representando $7,5 \pm 0,4\%$ e $18,3 \pm 2,0\%$ das células presentes na cultura derivada da placa e vilosidade coriônica, respectivamente. A forte expressão da proteína de superfície CD14 indica que a população minoritária encontrada na cultura pode ser

Tabela 3: Análise da expressão dos antígenos estudados na população CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ presente na cultura de células derivadas da placa coriônica de terceira passagem.

	Células derivadas da placa coriônica #3		Células derivadas da vilosidade coriônica #3	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
CD105	99.5	0.2	97,1	2,8
CD90	99.0	0.7	92,0	3,3
CD73	98.8	0.4	87,8	2,5
CD54	48.5	1.5	44.3	3,9
CD166	63.6	3.7	69,6	4,0
CD45	0.3	0.2	0,8	0,8
CD34	0.2	0.2	0,8	0,6
HLA-DR	0.0	0.1	0,7	0,1
CD14	3.0	0.5	2,4	0,8
CD133	0.2	0.2	5,3	1,1

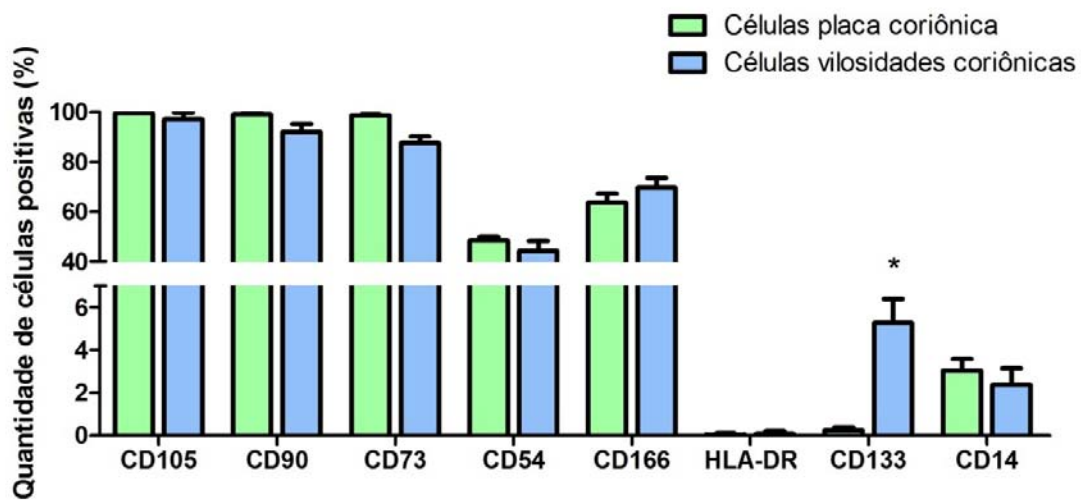


Fig. 14: Comparação da expressão dos antígenos estudados na população CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ presente na cultura de células derivadas da placa coriônica de terceira passagem.

composta por monócitos/macrófagos (dados não mostrados). Os monócitos/macrófagos são células da linhagem hematopoiética, caracterizadas pela expressão do antígeno CD14 (GORDON, 1995), e é descrita como a principal contaminante da cultura de células mesenquimais derivadas da medula óssea (Dominici *et al.*, 2006). É importante ressaltar que esta população será investigada em um estudo posterior.

4.4 Diferenciação

Após a confirmação que as culturas de células da placenta eram compostas principalmente por células cujo perfil imunofenotípico assemelhava-se aquele descrito para as MSCs derivadas da medula óssea adulta (PITTENGER *et al.*, 1999), avaliamos a multipotencialidade das células submetendo-as a um protocolo de indução osteogênico e adipogênico. Para confirmar que a multipotencialidade era exclusiva das MSCs, fibroblastos cardíacos, que são células mesenquimais adultas, foram submetidos aos mesmos protocolos como controle negativo.

4.4.1 Osteogênese

As células derivadas da placa coriônica (n=3) e as células derivadas das vilosidades coriônicas (n=3) em terceira passagem foram submetidas a um protocolo de osteogênese previamente descrito por Pittenger *et al.* (1999). As culturas controle mantidas em meio de cultura DMEM suplementado apenas com SFB não formou depósitos de cálcio na matriz extracelular, ou seja, não apresentaram diferenciação espontânea (Figura 15 A e C e 16 A e C). Em comparação, as culturas mantidas em meio de indução osteogênico apresentou matriz extracelular corada em vermelho, indicando a secreção de cálcio, característica típica de osteócitos (Figura 15 B e D e 16 B e D).

Para garantir que os resultados do protocolo de diferenciação eram específicos para células mesenquimais multipotentes, culturas de fibroblastos cardíacos (n=3) foram submetidas ao mesmo tratamento. Nossos resultados demonstraram que as células mantidas com meio de cultura e SFB (Figura 15 E e 16 E), bem como as células mantidas com meio de indução (Figura 15 F e 16 F), não acumularam cristais de cálcio na matriz extracelular, indicando que não foi possível induzir características neste tipo celular.

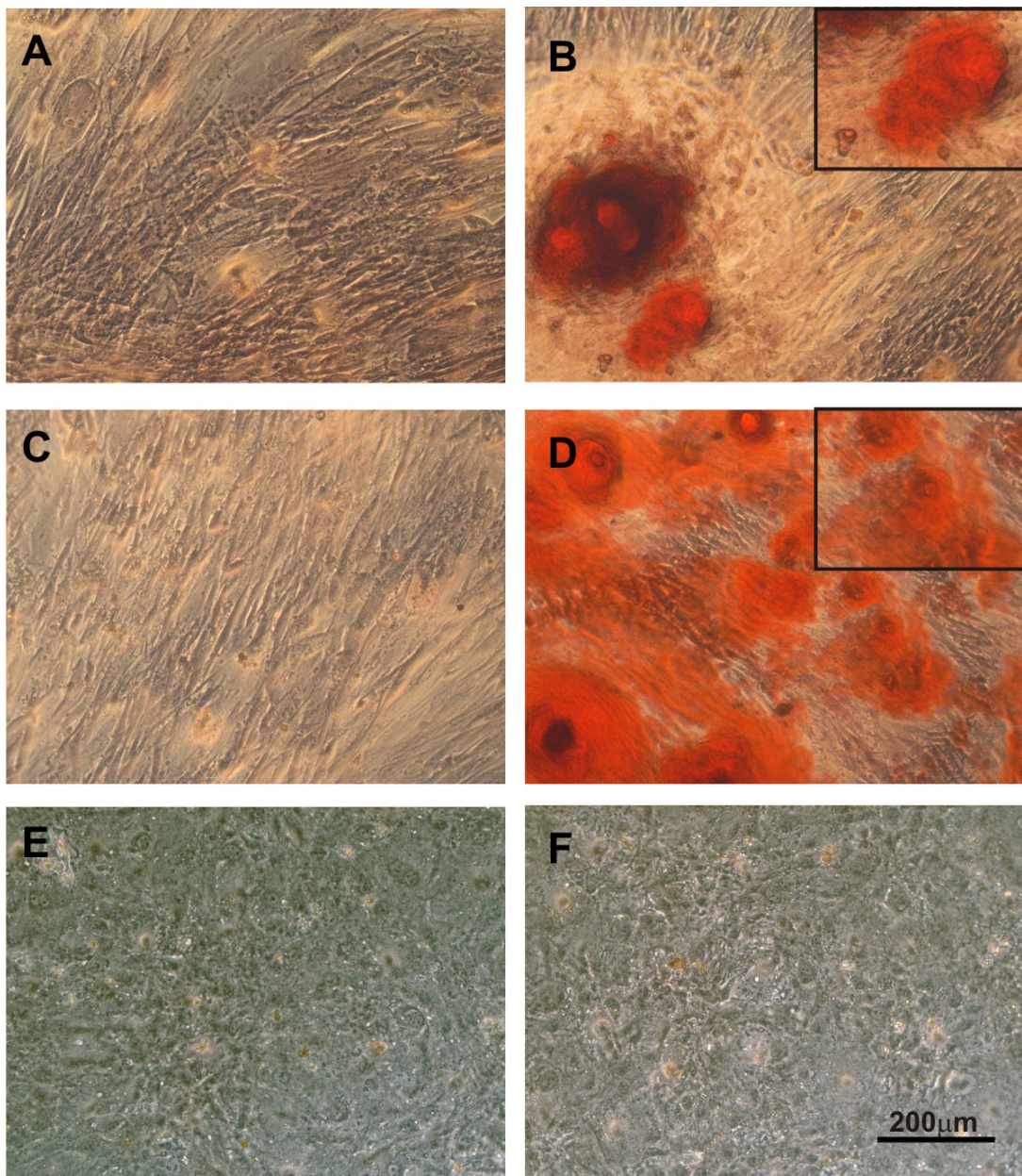


Fig. 15: Avaliação do potencial osteogênico (n=3). Células derivadas da placa coriônica (A), das vilosidades coriônicas (C) e fibroblastos cardíacos de ratos neonatos (E) mantidos em meio de cultura DMEM suplementado com SFB não acumularam cristais de cálcio na matriz extracelular. Após cultivo em meio de indução osteogênico, células derivadas da placa coriônica (B) e das vilosidade coriônicas (D) agregaram cálcio na matriz, o que não foi observado na cultura de fibroblastos cardíacos submetida a mesma indução (F).

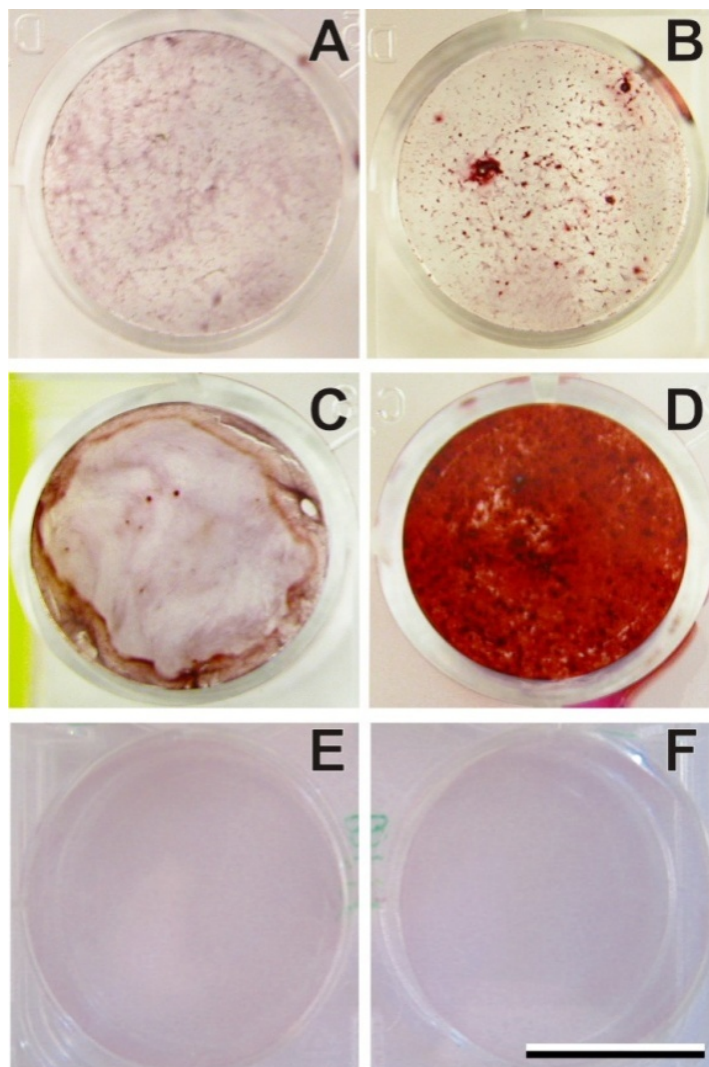


Fig. 16: Foto macroscópica da placa de cultura, mostrando a ausência de cristais de cálcio nas culturas de células derivadas da placa coriônica (A), da vilosidade coriônica (C) e de fibroblastos cardíacos (E) mantidas com meio de cultura suplementado com SFB e na cultura de fibroblastos mantidos em meio de indução osteogênico (F); Em paralelo, observa-se a presença de cristais de cálcio na cultura de células derivadas da placa coriônica (B) e das vilosidades coriônicas (D). Barra calibração = 1 cm; n=3.

4.4.2 Adipogênese

As células derivadas da placa coriônica (n=3) e células derivadas das vilosidades coriônicas (n=3) em terceira passagem também foram submetidas a um protocolo de adipogênese, adaptado de Pittenger *et al.* (1999). No decorrer dos 21 dias de indução, as células mantidas em meio de indução adipogênica passaram a acumular, no seu citoplasma, vacúolos contendo triglicerídeos, que coraram em vermelho, após fixação e a adição do corante Óleo Vermelho O (Figura 17 B e D). Tais modificações morfológicas não foram observadas nas células cultivadas em condições controle, ou seja, meio de cultura suplementado apenas com soro fetal bovino (Figura 17 A e C).

Como foi descrito para o protocolo de osteogênese, fibroblastos cardíacos de ratos neonatos (n=3) foram submetidos ao mesmo protocolo de indução adipogênica, como controle pareado. O acúmulo de lipídeos não foi observado nas culturas mantidas com meio de indução adipogênico (Figura 17 F) nem nas células mantidas com meio de cultura e soro fetal bovino (Figura 17 E), indicando que não foi possível induzir características neste tipo celular.

A multipotencialidade das culturas de células derivadas da placa coriônica e vilosidades coriônicas foi confirmada com os ensaios osteogênicos e adipogênicos. Assim, conclui-se que estas culturas são compostas principalmente por células que tem características semelhantes as MSCs derivadas de medula óssea (PITTENGER *et al.*, 1999), como aderência ao frasco de cultura, painel fenotípico característico e multipotencialidade.

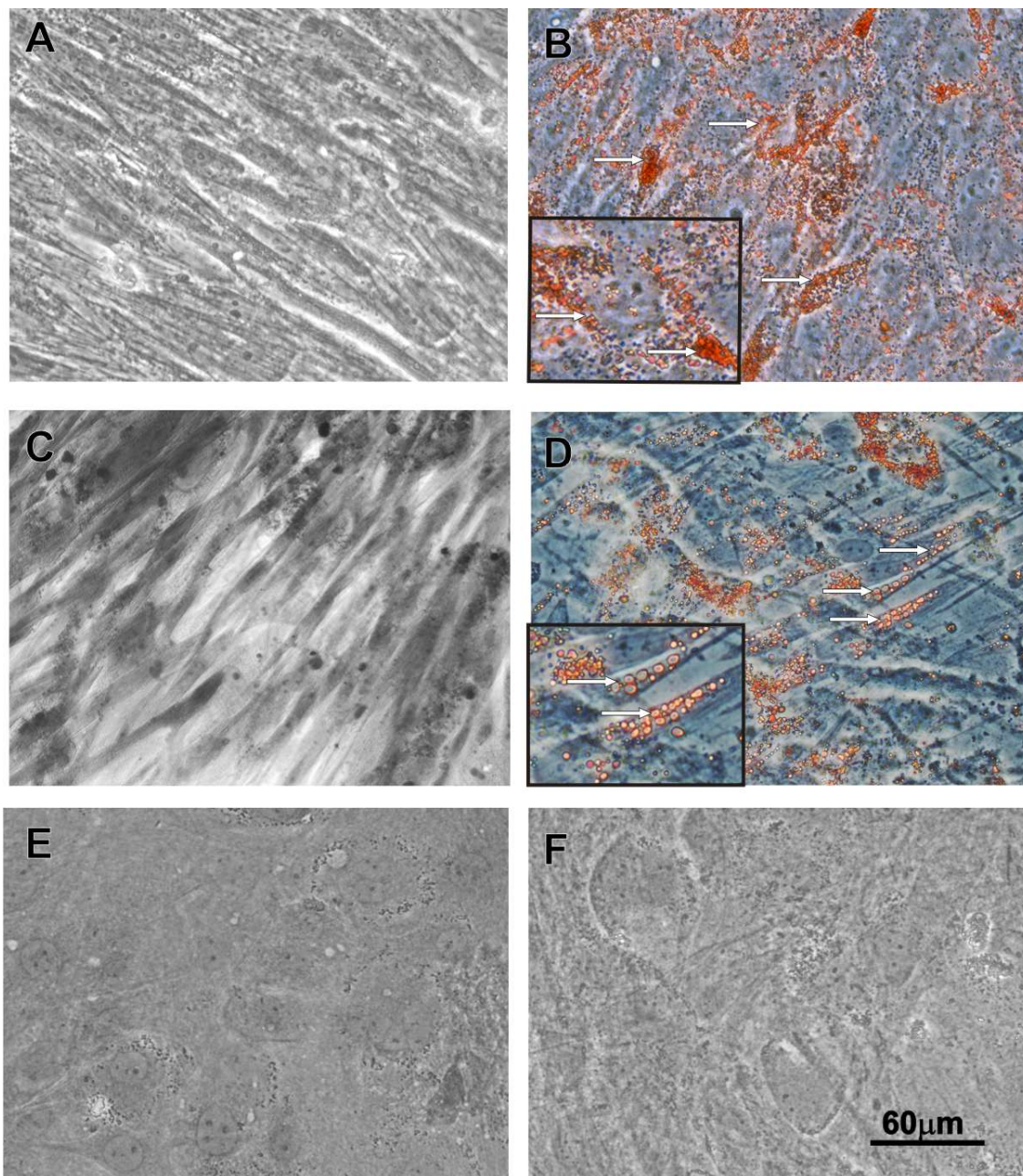


Fig. 17: Avaliação do potencial adipogênico (n=3). Células derivadas da placa coriônica (A), das vilosidades coriônicas (C) e fibroblastos cardíacos de ratos neonatos (E) mantidos em meio de cultura DMEM suplementado com SFB não armazenam lipídeos em vacúolos citoplasmáticos. Após cultivo em meio de indução adipogênico, células derivadas da placa coriônica (B) e das vilosidades coriônicas (D) passaram a acumular vacúolos de lipídeos (setas pretas), o que não foi observado na cultura de fibroblastos cardíacos submetida a mesma indução (F).

4.5 Imunofenotipagem das células a fresco

Com o objetivo de comparar se o perfil imunofenotípico das células derivadas da placa e vilosidade coriônica em terceira passagem foi influenciado pelo tempo de cultivo, foram feitas análises por citometria de fluxo das células recém isoladas, ou seja, antes de serem mantidas em cultura.

Com base na expressão dos antígenos CD45 e CD34, excluimos da nossa análise as células precursoras hematopoiéticas (CD45⁺CD34⁺), células hematopoiéticas maduras (CD45⁺CD34⁻) e células precursoras endoteliais (CD45⁻CD34⁺) e analisamos apenas as células CD45⁻CD34⁻. Observamos que $77,3 \pm 3,4\%$ e $49,6 \pm 1,5\%$ das células isoladas da placa coriônica (n=4) e vilosidades coriônicas (n=4), respectivamente, eram células CD45⁻CD34⁻, ou seja, células que poderiam ter um fenótipo semelhante aquele expresso pelas MSCs derivadas de medula óssea (PITTENGER *et al.*, 1999), e pelas células da cultura de terceira passagem estudada neste trabalho.

A expressão do CD105 foi observada em $10,3 \pm 4,7\%$ e $23,5 \pm 9,1\%$ das células CD45⁻CD34⁻ extraídas da placa e vilosidade coriônica, respectivamente. A Figura 18 mostra que, apesar da discrepância dos valores apresentados acima, quando analisamos a proporção relativa das células CD45⁻CD34⁻CD105⁺ em relação ao total de células a fresco obtidas, vemos que não existe diferença significativa entre a quantidade de células CD45⁻CD34⁻CD105⁺ presentes na fração a fresco derivada da placa coriônica e vilosidade coriônica ($13,5 \pm 6,6\%$ versus $11,6 \pm 4,7\%$, respectivamente; $p= 0,713$).

Seguindo o mesmo critério de avaliação utilizado para a caracterização das células presentes na cultura, analisamos o painel imunofenotípico expresso pela

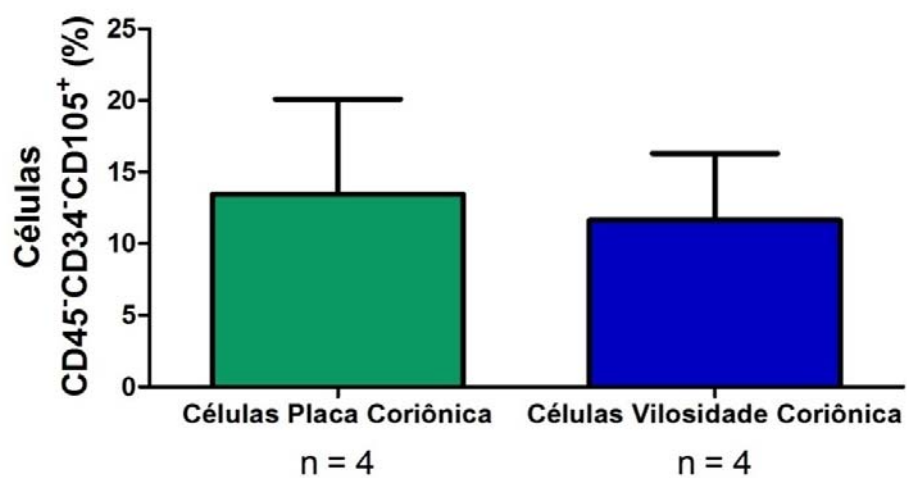


Figura 18: Proporção de células CD45⁺CD34⁺CD105⁺ em relação ao total de células a fresco extraídas da placa coriônica e vilosidades coriônicas placentárias ($p=0,713$).

Tabela 4: Análise da expressão dos antígenos estudados na população CD45⁺CD34⁻CD105⁺ presente na fração a fresco de células isoladas da placa coriônica de terceira passagem

	Células derivadas da placa coriônica a fresco		Células derivadas da vilosidade coriônica a fresco	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
CD105	98,83	0,76	98,17	1,27
CD90	59,00	2,83	9,80	3,61
CD73	36,45	3,34	10,13	3,32
CD54	70,79	6,18	4,40	1,48
CD166	2,01	1,78	9,93	2,90
HLA-DR	0,83	0,39	0,17	0,14
CD14	0,48	0,46	1,10	0,99
CD133	5,90	2,05	15,02	4,77

população CD45⁻CD34⁻CD105⁺ a fresco derivadas da placa coriônica (Apêndice1) e vilosidades coriônicas (Apêndice2). A Tabela 4 mostra a quantificação da expressão de cada antígeno nas células. Interessantemente, o perfil fenotípico das células a fresco mostrou-se diferente daquele expresso pelas células em cultura.

As células CD45⁻CD34⁻CD105⁺ a fresco extraídas da placa coriônica, assim como as células em cultura, não expressavam marcadores típicos da linhagem de monócitos e macrófagos como o CD14 e HLA-DR (GORDON, 1995). No entanto, havia uma quantidade significativamente menor de células a fresco expressando os marcadores CD90, CD73 e CD166 ($p < 0,0001$), e maior expressando os marcadores CD54 e CD133 ($p = 0,003$ e $p = 0,008$, respectivamente) (Figura 19 A). De maneira semelhante, as células CD45⁻CD34⁻CD105⁺ derivadas das vilosidades coriônicas a fresco também não expressavam CD14 e HLA-DR. Mas, em relação as células em cultura, a quantidade de células a fresco expressando CD90, CD73, CD54 e CD166 era menor ($p < 0,0001$), enquanto a expressão do CD133 não sofreu alteração estatisticamente significativa ($p = 0,03$) (Figura 19 B). A Figura 19 C compara a expressão dos marcadores estudados nas células a fresco derivadas da placa e vilosidade coriônica, e mostra que a quantidade de células expressando CD90, CD73 e CD54 é estatisticamente mais baixa nas células CD45⁻CD34⁻CD105⁺ a fresco derivada das vilosidades coriônicas ($p < 0,0001$). Em contrapartida, não houve diferença estatística em relação ao número de células expressando CD166, bem como CD14, CD133 e HLA-DR. A discrepância entre o perfil imunofenotípico das células a fresco e em cultura também é observada em MSCs derivadas da medula óssea humana, cuja fração a fresco, embora também seja negativa para marcadores hematopoiéticos como CD45, CD34 e CD14, expressa de maneira não homogênea os marcadores CD105, CD90 e CD73 (BOIRET *et al.*, 2005).

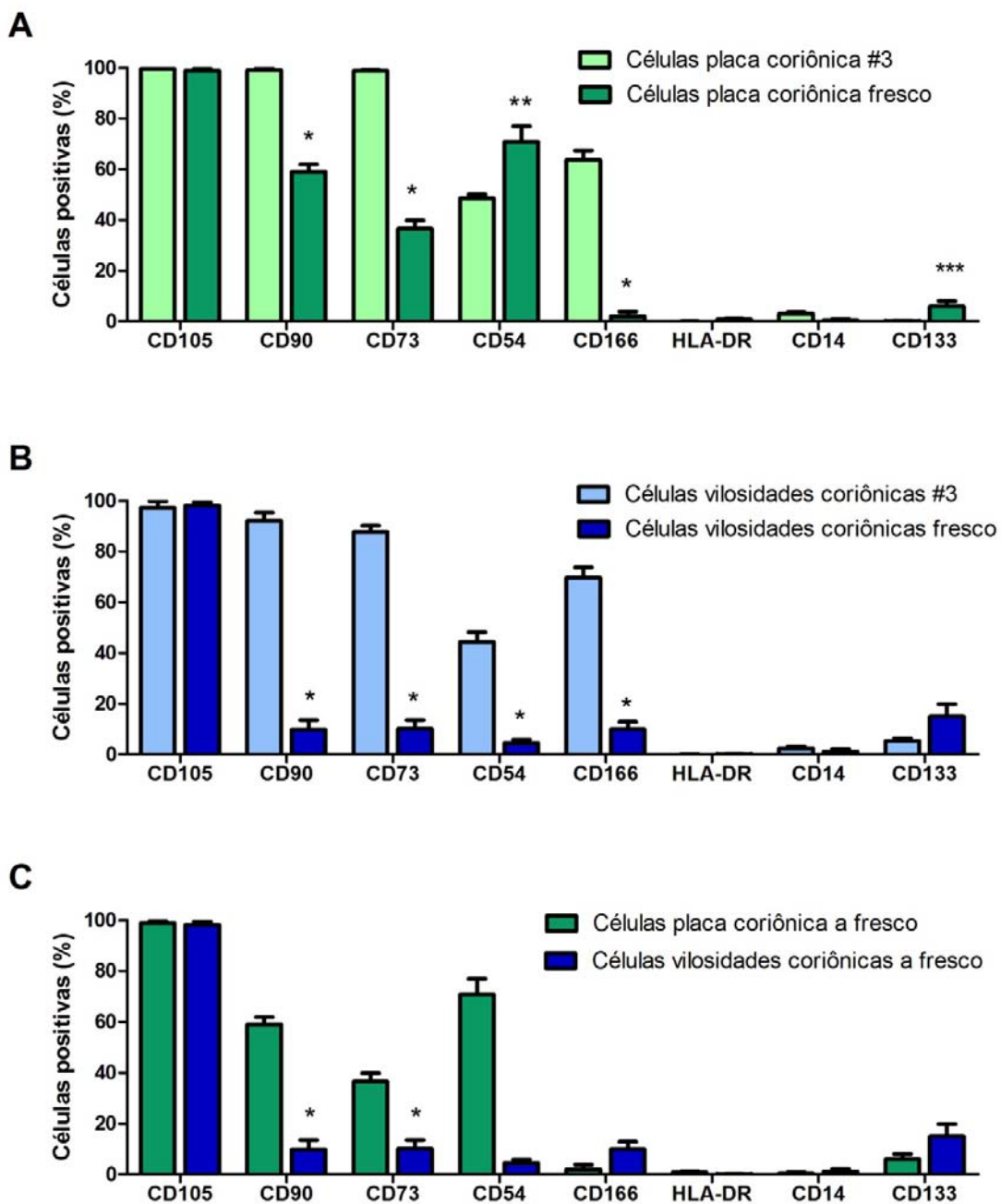


Fig. 19: Quantificação do perfil imunofenotípico das células $CD45^- CD34^- CD105^+$ em cultura e a fresco derivadas (A) da placa coriônica, (B) das vilosidades coriônicas e (C) comparação das células a fresco derivadas das duas regiões placentárias estudadas.

5. Discussão

O presente estudo tem por objetivo investigar se o mesoderma extra-embriônico que compõe a placa coriônica e as vilosidades coriônicas da placenta humana a termo pode ser utilizado como uma fonte alternativa de células mesenquimais estromais multipotentes (MSCs).

A aplicação de MSCs na medicina regenerativa é bastante promissora, por apresentarem um amplo potencial de diferenciação que abrange as linhagens de tecidos de origem mesodérmica, incluindo adipócitos, osteócitos e condrócitos (ZUK *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004; REYES *et al.*, 2001), manterem homeostase e apresentarem propriedades imunorregulatórias (RASMUSSEN, 2006; RINGDEN *et al.*, 2006). As MSCs podem ser obtidas através da punção da medula óssea, um processo rotineiramente executado em diversos hospitais, e a utilização em terapia celular de uma célula extraída do próprio paciente permitiria a realização de um transplante autólogo, eliminando a necessidade do paciente se submeter a terapia imunossupressora. No entanto, o uso das MSCs requer expansão *in vitro*, uma vez que se trata de uma população escassa, representando 0,01-0,0001% das células neste tecido.

Além disso, as desvantagens da utilização de MSCs derivadas da medula óssea em ensaios clínicos incluem o desconforto para o paciente e risco de infecção associado à aspiração da medula, e a redução da quantidade de MSCs presentes na medula óssea de pacientes idosos e pacientes que apresentam um quadro de doença. Desta maneira, a busca por fontes alternativas de MSCs é muito importante.

Em contrapartida, por ser descartada após o parto, a placenta é um órgão disponível em larga escala, cuja obtenção não está associada a riscos para a saúde

da mãe ou do feto. Como esse órgão tem origem fetal, acredita-se que apresente potencial de proliferação e diferenciação superior aquele das células adultas. Um estudo desenvolvido por Yen *et al.* (2005) mostrou que células mesenquimais multipotentes estão presentes nas vilosidades coriônicas placentária, e podem ser facilmente isoladas e expandidas *in vitro*. Essas células apresentavam um perfil muito semelhante aquele descrito para MSCs derivadas da medula óssea (PITTENGER *et al.*, 1999; DENNIS & CHARBORD, 2002): morfologia fibroblastóide, expressão de CD105, CD90, CD73, CD166, CD29 e CD44, ausência da expressão de CD14, CD117, CD45, CD34 e CD133, e capacidade de adquirir características típicas de células da linhagem mesodérmica, como adipócitos e osteócitos. Além disso, neste estudo, foi mostrada a capacidade destas células de adquirir características semelhantes a de neurônios, e a expressão de marcadores de superfície geralmente associados as células-tronco embrionárias (THOMSON *et al.*, 1998), como SSEA-4 (antígeno embrionário de estágio específico 4), TRA-1-60 e TRA-1-81 (antígenos relacionados a matriz proteoglicana pericelular de tetracarcinomas e células-tronco embrionárias).

Alguns estudos têm mostrado a formação de quimerismo em modelos animais neonatos transplantados com células indiferenciadas humanas (BILLINGHAM, BRENT & MEDAWAR, 1953; LIECHTY *et al.*, 2000). BAILO *et al.* (2004) detectaram a formação de microquimerismo humano na medula óssea, cérebro, pulmões, e timo em todos os ratos ou porcos neonatos que receberam injeção intraperitoneal ou via veia umbilical contendo células mesenquimais derivadas da membrana coriônica, mostrando que essas células são capazes de migrar e colonizar órgãos específicos, e não estimulam resposta linfocítica. Acredita-se que a ausência de expressão de complexo de histocompatibilidade de classe II e as propriedades imunoregulatórias

nas células derivadas das membranas fetais contribuem para que elas não sejam reconhecidas pelos linfócitos T do sistema imune do hospedeiro.

Como a maioria dos trabalhos encontrados na literatura estudam as células mesenquimais derivadas das vilosidades coriônicas (IGURA *et al.*, 2005; PORTMANN-LANZ *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006b) ou da membrana coriônica (BAILO *et al.*, 2004; BILIC *et al.*, 2004; SONCINI *et al.*, 2007), visamos analisar as características das células coriônicas presentes na placa coriônica da placenta a termo e compará-las com as características das células presentes nas vilosidades coriônicas. O presente estudo mostrou que foi possível extrair uma quantidade maior de células a partir da placa coriônica em relação a vilosidade coriônica (aproximadamente 20×10^5 versus 6×10^5 células/grama, respectivamente) (Figura 8). No entanto, é difícil fazer uma comparação com o rendimento obtido pelo protocolo estabelecido em nosso estudo com os protocolos descritos na literatura para extração de células da membrana ou vilosidades coriônicas, porque poucos artigos fornecem esse tipo de informação, e os que o fazem, estabelecem parâmetros diferentes daquele descrito neste trabalho. Soncini *et al.* (2007) descreve que a digestão de toda membrana coriônica com colagenase permite a obtenção de aproximadamente 20×10^6 células placentárias. No entanto, não podemos estimar quantos gramas de tecido estava sendo processada, impossibilitando a comparação com nossos resultados.

O isolamento de células da placa coriônica foi previamente descrito por Okamoto *et al.* (2007), no entanto, seu grupo utiliza o método de cultura por explante. Nosso protocolo de extração de células da placa coriônica baseia-se na digestão enzimática com colagenase, e mostrou-se mais eficaz, uma vez que em um período de aproximadamente 20 dias, já tínhamos culturas em terceira passagem

enzimática, ao passo que pelo método de explante, Okamoto relatou que eram necessários 20 dias para a realização da primeira passagem enzimática das células aderidas.

Essas células derivadas da placa coriônica e das vilosidades coriônicas, a partir do terceiro dia em cultura, adquiriram morfologia semelhante a de fibroblastos, que foi mantida até a terceira passagem (Figura 9), característica também descrita por diversos autores, dentre eles, Miao *et al.* (2006) e Okamoto *et al.* (2007), ao analisarem a morfologia das MSCs derivadas das vilosidades coriônicas submetidas a digestão enzimática com tripsina, e das MSCs que migravam de explantes de placa coriônica, respectivamente. Assim, podemos concluir que, independente do método de isolamento e origem anatômica, as células derivadas do córion apresentam uma morfologia fibroblastóide, muito semelhante aquela descrita para as MSCs derivadas da medula óssea (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974).

A análise por citometria de fluxo mostrou que as culturas de terceira passagem eram compostas por duas populações: CD45⁺ CD34⁻ e CD45⁻ CD34⁻. A população CD45⁻ CD34⁻ estava presente em maior proporção nas culturas de células derivadas da placa coriônica e vilosidades coriônicas, representando aproximadamente 90% e 80% do total, respectivamente. Além de não expressar estes dois marcadores, típicos de células hematopoiéticas, essa população não apresentava CD14 e HLA-DR, moléculas expressas em monócitos/macrófagos (Figura 11 e 13). Em paralelo, constatou-se que as células CD45⁻ CD34⁻ expressavam as moléculas CD105, CD90, CD73, CD166 e CD54 (Figura 10 e 12), descritas como componentes da superfície celular das MSCs derivadas da medula óssea (AZIZI *et al.*, 1998; PITTENGER *et al.*, 1999; DEANS & MOSELEY, 2000; MINGUELL *et al.*, 2001), embora nenhum destes marcadores seja exclusivo de

MSCs.

Observamos que, nas duas culturas estudadas, a população analisada era composta por células que expressavam os marcadores CD105, CD90 CD73 (Tabela 3), o que corrobora com dados previamente descritos por autores que analisaram o perfil imunofenotípico de MSCs derivadas do córion (FUKUCHI *et al.*, 2004; MIAO *et al.*, 2006; PORTMANN-LANZ *et al.*, 2006; CHIEN *et al.*, 2006). A expressão concomitante destes três antígenos está relacionada a um dos critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular para a identificação das células como MSCs (DOMINICI *et al.*, 2006).

Também fomos capazes de identificar a expressão de CD54 e CD166 nas células CD45⁻ CD34⁻ presentes na cultura de células derivadas da placa coriônica e vilosidade coriônica (Figura 11e 13), como descrito para MSCs derivadas da medula óssea (HAYNESWORTH *et al.*, 1992; CONGET & MINGUELL, 1999). Mas a expressão destas proteínas não ocorria de maneira homogênea na população (Tabela 3), estando presente em aproximadamente 45% e 65%, respectivamente, nas células derivadas da placa coriônica e vilosidades coriônicas. Bailo *et al.* (2004) apresentou resultados semelhantes ao analisar a expressão do CD54 em MSC derivadas da membrana coriônica, mostrando que aproximadamente 50% das células expressavam este antígeno. Da mesma maneira, em outro estudo, Yen *et al.* (2005) relatou que as MSCs derivadas das vilosidades coriônicas, apesar de expressarem CD166, não o faziam de maneira homogênea. A semelhança na expressão do CD54 e CD166 nas células derivadas da membrana, placa e vilosidade coriônica da placenta pode estar relacionada a origem do tecido. No entanto, não podemos afirmar a razão pela qual a expressão destas moléculas de adesão ocorre de maneira diferenciada em relação a expressão do CD105, CD73 e

CD90.

Assim, comparando o perfil imunofenotípico das células derivadas da placa e vilosidade coriônica, observamos que a expressão dos marcadores analisados dava-se de maneira similar, com excessão do CD133, proteína encontrada na superfície de células precursoras hematopoiéticas e endoteliais, cuja expressão era estatisticamente mais acentuada nas células derivadas das vilosidades coriônicas (Figura 14), embora presente em apenas aproximadamente 5% das células nesta população.

A segunda população encontrada era composta por células CD45⁺ CD34⁻ e representava aproximadamente 10% e 20% das células encontradas na cultura derivada da placa e vilosidade coriônica, respectivamente. Apesar de não termos estudado profundamente o perfil imunofenotípico desta população, identificamos a expressão de CD14, proteína que compõe o receptor LPS (lipopolissacarídeo) associado ao TLR-4 (receptor Toll-Like), característica típica de células da linhagem de monócitos-macrófagos (BERCLAZ *et al.*, 2007). Os macrófagos/monócitos são células muito importantes na defesa do organismo contra inflamações, sendo responsáveis pela produção de citocinas incluindo interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta e interferon gama (WERB *et al.*, 1986). Imunofenotipicamente, eles são caracterizados pela expressão de CD45, CD14 e expressão variada de HLA-DR (GORDON, 1995). Em humanos, os macrófagos são descritos como o tipo celular mais auto-fluorescente, característica associada à presença de flavinas e lipídeos celulares (AUBIN, 1979). A diversidade de subpopulações de macrófagos encontrados nos diferentes órgãos é complexa. O tecido mesodérmico da placenta é considerado um reservatório de macrófagos fetais (KIM *et al.*, 2008), que estão presentes também nas vilosidades coriônicas da placenta, denominados Células de

Hoffbauer, onde exercem um papel muito importante na regulação da morfogênese das ramificações destas vilosidades (ANTEBY *et al.*, 2005).

A contaminação da cultura de células mesenquimais derivadas da membrana coriônica por células CD14 positivas já foi descrita por Bailo *et al.* (2004) em um trabalho em que as células contaminantes puderam ser removidas com sucesso após incubação com “beads” imunomagnéticos adequados. No entanto, este procedimento não foi realizado em nosso estudo. Além disso, a importante função desempenhada pelas células Hoffbauer nas vilosidades coriônicas pode ser responsável pela maior quantidade de células contaminantes encontrada na cultura de células derivadas das vilosidades coriônicas.

Definido seu perfil imunofenotípico (CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ CD90⁺ CD73⁺ CD54⁺ CD166⁺ CD14⁻ CD133⁻ HLA-DR⁻), o próximo passo foi avaliar a multipotencialidade das células derivadas da placa coriônica e vilosidades coriônicas em terceira passagem. Assim, baseando-se no trabalho de Pittenger *et al.* (1999), as células derivadas da placa coriônica e vilosidades coriônicas foram submetidas a protocolos de indução adipogênica e osteogênica. A suplementação do meio de cultura completo com ácido ascórbico, dexametasona e β -glicerofosfato fez com que as células derivadas da placa e vilosidade coriônica, ao longo dos 21 dias de indução, apresentassem aglomerados de cristais de cálcio, corados em vermelho pelo corante Vermelho de Alizarina, indicativos da diferenciação osteogênica (Figura 15 B e 16 B). As mesmas células, quando mantidas apenas com meio de cultura suplementado com SFB, não passaram a expressar tais características (Figura 15 A e 16 A). O perfil estabelecido pelas células submetidas a indução osteogênica corrobora com resultados de trabalhos envolvendo MSCs derivadas do córion (YEN *et al.*, 2005, FUKUCHI *et al.*, 2004; PORTMANN-LANZ *et al.*, 2006; OKAMOTO *et*

al., 2007). Embora neste trabalho não tenhamos feito nenhum tipo de quantificação da marcação com vermelho de alizarina, o maior potencial osteogênico das células derivadas das vilosidades coriônicas é nítido.

Também foram obtidos resultados positivos em relação à indução adipogênica (Figura 17 A e B). Utilizamos um meio de cultura de indução diferente dos descritos na literatura, tanto para MSC derivadas da medula óssea (PITTINGER *et al.*, 1999), como para MSC derivadas do estroma viloso da placenta humana (FUKUCHI *et al.*, 2004; PORTMANN-LANZ *et al.*, 2006). O meio de indução utilizado neste estudo continha insulina humana, indometacina e dexametasona, enquanto, aos trabalhos previamente citados, ainda era acrescentado IBMX (1-metil-3-isobutilxantina). O IBMX é inibidor fosfodiesterase que impede a degradação de cAMP (3'5' monofosfato de adenosina cíclico). O cAMP é uma molécula de sinalização intracelular muito importante da ativação da proteína quinase A dependente de cAMP (PKA). Acredita-se que via cAMP/PKA seja importante no estímulo da adipogênese. No entanto, assim como descrito para MSCs de medula óssea (YANG *et al.*, 2008), a ausência do IBMX não impede a indução adipogênica. As células mantidas com meio de cultura controle não sofreram diferenciação adipogênica espontânea. No entanto, a influência do IBMX na adipogênese de células mesenquimais derivadas da placa e vilosidade coriônica deve ser estudada mais detalhadamente.

Os fibroblastos cardíacos de ratos neonatos são células mesenquimais adultas e foram utilizadas como controle negativo dos experimentos de indução osteogênica (Figuras 15 C e D, 16 C e D) e adipogênica (Figura 17 C e D). Quando submetidas aos mesmos protocolos descritos anteriormente, os fibroblastos cardíacos não apresentaram os sinais de adipogênese ou osteogênese encontrados

nas células de placenta. Pittenger *et al.* (1999) realizou um experimento semelhante, ao avaliar o potencial multipotente de fibroblastos epidérmicos humanos. Neste trabalho, a inabilidade dos fibroblastos de expressar indicação de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos reforça a existência de uma capacidade multipotente das MSCs de medula óssea. Assim, ao repetirmos os resultados descritos pelo autor, reforçamos a idéia de que as células derivadas da placa e vilosidade coriônica da placenta apresentam propriedade multipotentes.

Assim, baseando nos critérios mínimos sugeridos pela *Sociedade Internacional de Terapia Celular* (ISTC) (aderência ao frasco de cultura, expressão específica de antígenos de superfície, e potencial multipotente de diferenciação) (Dominici *et al.*, 2006), sugeridos para padronizar as características que definem as MSCs humanas, concluímos que as culturas de células derivadas da placa coriônica e vilosidades coriônicas são compostas predominantemente por células mesenquimais estromais multipotentes.

Embora os critérios que definem as MSCs expandidas *in vitro* estejam bem estabelecidos, poucos trabalhos relatam as características fenotípicas das MSCs a fresco ou antes da sua expansão. Por muito tempo, o único teste realizado para avaliar a presença de células progenitoras mesenquimais a fresco foi o ensaio de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F). No entanto, os resultados obtidos através deste ensaio eram influenciados por fatores como: a composição do meio de cultura utilizado (SORTIROPOULOU *et al.*, 2006), a densidade inicial de plaqueamento das células (COLTER *et al.*, 2001; SEKIYA *et al.*, 2001); e o método de contagem das colônias.

Com o desenvolvimento de técnicas como a citometria de fluxo, tornou-se possível a caracterização destas células antes de serem colocadas em cultura. O

trabalho desenvolvido por Boiret *et al.* (2005) mostrou que apenas 15% das células não hematopoiéticas (CD45⁻ CD34⁻) derivadas da medula óssea a fresco expressavam o CD105, enquanto apenas 5% expressavam CD90 ou CD73, sugerindo que o painel fenotípico que define MSCs expandidas em cultura não deve ser o mesmo para caracterizá-las a fresco.

Infelizmente, poucos trabalhos têm mostrado a caracterização das células derivadas da placenta a fresco. Bailo *et al.* (2004) identificou nas MSCs a fresco derivadas da membrana coriônica, por RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa), a presença de RNA mensageiros que codificavam os marcadores CD105, CD90 e CD73. No entanto, os níveis de mRNA e a expressão da proteína nem sempre estão correlacionados (FALINI & MASON, 2002).

No presente estudo, visamos avaliar a expressão fenotípica das células CD45⁻ CD34⁻ presentes na fração mononuclear de células derivadas da placa e vilosidade coriônica. A análise por citometria de fluxo revelou que as células CD45⁻ CD34⁻ representavam aproximadamente 80% e 50% das células a fresco derivadas da placa e vilosidade coriônica, respectivamente, sendo o restante composto por células hematopoiéticas maduras (CD45⁺ CD34⁻), precursoras hematopoiéticas (CD45⁺ CD34⁺) e precursoras endoteliais (CD45⁻ CD34⁺), em proporções não quantificadas.

Aproximadamente 10% das células a fresco derivadas da placa e vilosidade coriônica analisadas eram CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ (Apêndice 1 e Apêndice 2, respectivamente). Nesta população, marcadores da linhagem hematopoiética, como CD14, HLA-DR, CD133 eram expressos em níveis negligenciáveis. E, ao contrário do observado nas células em cultura, a quantidade de células CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ expressando CD90 e CD73 era menor, representando aproximadamente 50% em

células derivadas da placa coriônica e 10% em células derivadas das vilosidades coriônicas (Figura 19 A e B). A baixa incidência de células a fresco derivadas da vilosidades coriônicas cujo fenótipo era CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ CD90⁺ e CD73⁺ pode explicar os resultados descritos por Chien *et al.* (2006), que relatou a ausência de CD90 e CD105 nas células a fresco avaliadas em seu estudo. De maneira geral, observou-se uma redução na quantidade de células CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ que coexpressavam CD90, CD73, CD166 e CD54, sendo a única exceção, as células derivadas da placa coriônica que tiveram um aumento da expressão de CD54 (Figura 19 C).

Propomos que o método de cultura por aderência ao frasco de cultura foi eficiente na seleção de MSCs, mas não podemos descartar a hipótese que o imunofenótipo das células a fresco não corresponde aquele expresso pelas células após expansão *in vitro*.

Yen e colaboradores (2005) relatam que é possível haver contaminação por células endoteliais em culturas de células mesenquimais derivadas de vilosidades coriônicas, resultantes da dissociação de vasos presentes no tecido. Assim, como no mesoderma da placa coriônica são originados vasos sanguíneos que se ramificam em capilares presentes nas vilosidades coriônicas, acreditamos que essas células CD34⁺ encontradas possam realmente ser fruto da digestão enzimática de vasos fetais. Embora houvesse células hematopoiéticas na fração celular a fresco, acreditamos que as células com características mesenquimais encontradas em cultura não sejam provenientes do sangue fetal. A presença de MSC no sangue fetal ainda é bastante discutida (WEXLER *et al.*, 2003; MARESCHI *et al.*, 2001) e estudos relatando seu isolamento revelam limitações como a baixa frequência celular, e grandes variações entre indivíduos (ERICES, CONGET & MINGUELL, 2000). Devido

às dificuldades no isolamento de células mesenquimais derivadas do sangue fetal, é pouco provável que elas tenham sido recuperadas e mantidas em cultura, juntamente com as células derivadas da placa coriônica e vilosidades coriônicas.

6. Conclusões

Com isso, concluímos a extração de células derivadas da placa e vilosidade coriônica da placenta humana a termo é exequível e reproduzível. A placa coriônica é uma fonte mais abundante de células placentárias, mas quando colocadas em cultura, as células derivadas de ambas regiões podem ser caracterizadas como células mesenquimais estromais multipotentes, pois preenchem os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (DOMINICI *et al.*, 2006). No entanto, os padrões que definem essas células *in vitro* podem não ser os mesmos para caracterizá-las *a fresco* e estudos mais aprofundados devem ser feitos para a caracterização das células recém isoladas.

Assim, associada a sua disponibilidade em larga escala, fácil obtenção e quantidade celular abundante, placenta pode ser uma fonte alternativa atrativa de células progenitoras para utilização em pesquisa básica e aplicações clínicas.

7. Referências Bibliográficas

- AKASHI, K.; KONDO, M.; CHESHIER, S.; SHIZURU, J.; GANDY, K.; DOMEN, J.; MEBIUS, R.; TRAVER, D. & WEISSMAN, I. L. 'Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors.', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**, 1-12; 1999.
- AKLE, C. A.; ADINOLFI, M.; WELSH, K. I.; LEIBOWITZ, S. & MCCOLL, I. 'Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers.', *Lancet* **2** (8254), 1003-1005; 1981.
- ANTEBY, E. Y.; NATANSON-YARON, S.; GREENFIELD, C.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAIMOV-KOCHMAN, R.; HOLZER, H. & YAGEL, S. 'Human placental Hofbauer cells express sprouty proteins: a possible modulating mechanism of villous branching.', *Placenta* **26**(6), 476-483; 2005.
- AUBIN, J. E. 'Autofluorescence of viable cultured mammalian cells.', *J Histochem Cytochem* **27** (1), 36-43; 1979.
- AZIZI, S. A.; STOKES, D.; AUGELLI, B. J.; DIGIROLAMO, C. & PROCKOP, D. J. 'Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7), 3908-3913; 1998.
- BADDOO, M.; HILL, K.; WILKINSON, R.; GAUPP, D.; HUGHES, C.; KOPEN, G. C. & PHINNEY, D. G. 'Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection.', *J Cell Biochem* **89**(6), 1235-1249; 2003.
- BAERGEN, R. N. 'Macroscopic examination of the placenta immediately following birth.', *J Nurse Midwifery* **42**(5), 393-402; 1997.
- BAILO, M.; SONCINI, M.; VERTUA, E.; SIGNORONI, P. B.; SANZONE, S.; LOMBARDI, G.; ARIENTI, D.; CALAMANI, F.; ZATTI, D.; PAUL, P.; ALBERTINI, A.; ZORZI, F.; CAVAGNINI, A.; CANDOTTI, F.; WENGLER, G. S. & PAROLINI, O. 'Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta.', *Transplantation* **78**(10), 1439-1448; 2004.
- BARBARA, N. P.; WRANA, J. L. & LETARTE, M. 'Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily.', *J Biol Chem* **274**(2), 584-594; 1999.
- BARI, C. D.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P. & LUYTEN, F. P. 'Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane.', *Arthritis Rheum* **44**(8), 1928-1942; 2001.
- BARKER, T. H.; GRENETT, H. E.; MACEWEN, M. W.; TILDEN, S. G.; FULLER, G. M.; SETTLEMAN, J.; WOODS, A.; MURPHY-ULLRICH, J. & HAGOOD, J. S. 'Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity.', *Exp Cell Res* **295**(2), 488-496; 2004.

BARRY, F.; BOYNTON, R.; MURPHY, M.; HAYNESWORTH, S. & ZAIA, J. 'The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells.', *Biochem Biophys Res Commun* **289**(2), 519-524; 2001.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M.; ENGLISH, K. & MAHON, B. P. 'Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft.', *Stem Cells Dev* **14**(3), 252-265; 2005.

BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; FERRER, K.; MCINTOSH, K.; PATIL, S.; HARDY, W.; DEVINE, S.; UCKER, D.; DEANS, R.; MOSELEY, A. & HOFFMAN, R. 'Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.', *Exp Hematol* **30**(1), 42-48; 2002.

BATTULA, V. L.; BAREISS, P. M.; TREML, S.; CONRAD, S.; ALBERT, I.; HOJAK, S.; ABELE, H.; SCHEWE, B.; JUST, L.; SKUTELLA, T. & BÜHRING, H. 'Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation.', *Differentiation* **75**(4), 279-291; 2007.

BAUM, C. M.; WEISSMAN, I. L.; TSUKAMOTO, A. S.; BUCKLE, A. M. & PEULT, B. 'Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7), 2804-2808; 1992.

BERCLAZ, P.; CAREY, B.; FILLIPI, M.; WERNKE-DOLLRIES, K.; GERACI, N.; CUSH, S.; RICHARDSON, T.; KITZMILLER, J.; O'CONNOR, M.; HERMOYIAN, C.; KORFHAGEN, T.; WHITSETT, J. A. & TRAPNELL, B. C. 'GM-CSF regulates a PU.1-dependent transcriptional program determining the pulmonary response to LPS.', *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**(1), 114-121; 2007.

BERNIRSCHKE & KAUFMAN, Verlag, ed., *Pathology of Human Placenta*, 2000.

BIANCHI, D. W.; WILKINS-HAUG, L. E.; ENDERS, A. C. & HAY, E. D. 'Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans.', *Am J Med Genet* **46**(5), 542-550; 1993.

BILIC, G.; OCHSENBEIN-KÖLBLE, N.; HALL, H.; HUCH, R. & ZIMMERMANN, R. 'In vitro lesion repair by human amnion epithelial and mesenchymal cells.', *Am J Obstet Gynecol* **190**(1), 87-92; 2004.

BILLINGHAM, R. E.; BRENT, L. & MEDAWAR, P. B. 'Actively acquired tolerance of foreign cells.', *Nature* **172**(4379), 603-606; 1953.

BOIRET, N.; RAPATEL, C.; VEYRAT-MASSON, R.; GUILLOUARD, L.; GUÉRIN, J.; PIGEON, P.; DESCAMPS, S.; BOISGARD, S. & BERGER, M. G. 'Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow.', *Exp Hematol* **33**(2), 219-225; 2005.

BROOKE, G.; TONG, H.; LEVESQUE, J. & ATKINSON, K. 'Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone

marrow and placenta.', *Stem Cells Dev.* ahead of print; 2008.

BRUDER, S. P.; RICALTON, N. S.; BOYNTON, R. E.; CONNOLLY, T. J.; JAISWAL, N.; ZAIA, J. & BARRY, F. P. 'Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation.', *J Bone Miner Res* **13**(4), 655-663; 1998.

BÜHRING, H.; KUÇI, S.; CONZE, T.; RATHKE, G.; BARTOLOVI?, K.; GRÜNEBACH, F.; SCHERL-MOSTAGEER, M.; BRÜMMENDORF, T. H.; SCHWEIFER, N. & LAMMERS, R. 'CD133 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin.', *Stem Cells* **22**(3), 334-343; 2004.

BÜHRING, H. J.; MÜLLER, C. A.; LETARTE, M.; GOUGOS, A.; SAALMÜLLER, A.; VAN AGTHOVEN, A. J. & BUSCH, F. W. 'Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow.', *Leukemia* **5**(10), 841-847; 1991.

CAMPISI, J. 'Replicative senescence: an old lives' tale?', *Cell* **84**(4), 497-500; 1996.

CASTELLUCCI, M.; KOSANKE, G.; VERDENELLI, F.; HUPPERTZ, B. & KAUFMANN, P. 'Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development.', *Hum Reprod Update* **6**(5), 485-494; 2000.

CERASOLI, D. M.; KELSOE, G. & SARZOTTI, M. 'CD4+Thy1- thymocytes with a Th-type 2 cytokine response.', *Int Immunol* **13**(1), 75-83; 2001.

CHEIFETZ, S.; BELLÓN, T.; CALÉS, C.; VERA, S.; BERNABEU, C.; MASSAGUÉ, J. & LETARTE, M. 'Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells.', *J Biol Chem* **267**(27), 19027-19030; 1992.

CHIEN, C.; YEN, B. L.; LEE, F.; LAI, T.; CHEN, Y.; CHAN, S. & HUANG, H. 'In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells.', *Stem Cells* **24**(7), 1759-1768; 2006.

COHNHEIM, J. 'Über Entzündung und Eiterung.' *Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med.* **40**, 1-79, 1867.

COLTER, D. C.; SEKIYA, I. & PROCKOP, D. J. 'Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(14), 7841-7845; 2001.

CONGET, P. A. & MINGUELL, J. J. 'Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells.', *J Cell Physiol* **181**(1), 67-73; 1999.

COVAS, D. T.; SIUFI, J. L. C.; SILVA, A. R. L. & ORELLANA, M. D. 'Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells.', *Braz J Med Biol Res* **36**(9), 1179-1183; 2003.

CRAIG, W.; KAY, R.; CUTLER, R. L. & LANSDORP, P. M. 'Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells.', *J Exp Med* **177**(5), 1331-1342; 1993.

D'IPPOLITO, G.; SCHILLER, P. C.; RICORDI, C.; ROOS, B. A. & HOWARD, G. A. 'Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow.', *J Bone Miner Res* **14**(7), 1115-1122; 1999.

DAHLKE, M. H.; LARSEN, S. R.; RASKO, J. E. J. & SCHLITT, H. J. 'The biology of CD45 and its use as a therapeutic target.', *Leuk Lymphoma* **45**(2), 229-236; 2004.

DAVIS, J 'Skin transplantation with a review of 550 cases at Johns Hopkins Hospital', *Johns Hopkins Med J.* **15**, 307-96; 1910.

DAZZI, F.; RAMASAMY, R.; GLENNIE, S.; JONES, S. P. & ROBERTS, I. 'The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis.', *Blood Rev* **20**(3), 161-171; 2006.

DEANS, R. J. & MOSELEY, A. B. 'Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses.', *Exp Hematol* **28**(8), 875-884; 2000.

DENNIS, J. E. & CHARBORD, P. 'Origin and differentiation of human and murine stroma.', *Stem Cells* **20**(3), 205-214; 2002.

DOMINICI, M.; BLANC, K. L.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.', *Cytotherapy* **8**(4), 315-317; 2006.

ELTZSCHIG, H. K.; IBLA, J. C.; FURUTA, G. T.; LEONARD, M. O.; JACOBSON, K. A.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S. C. & COLGAN, S. P. 'Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors.', *J Exp Med* **198**(5), 783-796; 2003.

ENDERS, A. C. & KING, B. F. 'Formation and differentiation of extraembryonic mesoderm in the rhesus monkey.', *Am J Anat* **181**(4), 327-340; 1988.

ERICES, A.; CONGET, P. & MINGUELL, J. J. 'Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.', *Br J Haematol* **109**(1), 235-242; 2000.

EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. 'Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.', *Nature* **292**(5819), 154-156; 1981.

FALINI, B. & MASON, D. Y. 'Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry.', *Blood* **99**(2), 409-426; 2002.

FAULK, W. P.; MATTHEWS, R.; STEVENS, P. J.; BENNETT, J. P.; BURGOS, H. & HSI, B. L. 'Human amnion as an adjunct in wound healing.', *Lancet* **1**(8179), 1156-1158; 1980.

FONSATTI, E.; VECCHIO, L. D.; ALTOMONTE, M.; SIGALOTTI, L.; NICOTRA, M.

R.; CORAL, S.; NATALI, P. G. & MAIO, M. 'Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies.', *J Cell Physiol* **188**(1), 1-7; 2001.

FRANK, H. G.; MORRISH, D. W.; PÖTGENS, A.; GENBACEV, O.; KUMPEL, B. & CANIGGIA, I. 'Cell culture models of human trophoblast: primary culture of trophoblast--a workshop report.', *Placenta* **22 Suppl A**, S107-S109; 2001.

FRIEDENSTEIN, A. J.; DERIGLASOVA, U. F.; KULAGINA, N. N.; PANASUK, A. F.; RUDAKOWA, S. F.; LURIÁ, E. A. & RUADKOW, I. A. 'Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method.', *Exp Hematol* **2**(2), 83-92; 1974.

FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T. & TSUJI, K. 'Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential.', *Stem Cells* **22**(5), 649-658; 2004.

GEORGIADES, P.; WATKINS, M.; BURTON, G. J. & FERGUSON-SMITH, A. C. 'Roles for genomic imprinting and the zygotic genome in placental development.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8), 4522-4527; 2001.

GERSON, S. L. 'Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens.', *Nat Med* **5**(3), 262-264; 1999.

GOMES, J. A. P.; ROMANO, A.; SANTOS, M. S. & DUA, H. S. 'Amniotic membrane use in ophthalmology.', *Curr Opin Ophthalmol* **16**(4), 233-240; 2005.

GORDON, S. 'The macrophage.', *Bioessays* **17**(11), 977-986; 1995.

GOUGOS, A.; JACQUES, S. S.; GREAVES, A.; O'CONNELL, P. J.; D'APICE, A. J.; BÜHRING, H. J.; BERNABEU, C.; VAN MOURIK, J. A. & LETARTE, M. 'Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts.', *Int Immunol* **4**(1), 83-92; 1992.

GOUGOS, A. & LETARTE, M. 'Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells.', *J Biol Chem* **265**(15), 8361-8364; 1990.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G. & SHI, S. 'Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25), 13625-13630; 2000.

GRUSS, J. S. & JIRSCH, D. W. 'Human amniotic membrane: a versatile wound dressing.', *Can Med Assoc J* **118**(10), 1237-1246; 1978.

HAERYFAR, S. M. M. & HOSKIN, D. W. 'Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker.', *J Immunol* **173**(6), 3581-3588; 2004.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B. & GREIDER, C. W. 'Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.', *Nature* **345**(6274), 458-460; 1990.

HAYNESWORTH, S. E.; BABER, M. A. & CAPLAN, A. I. 'Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies.', *Bone* **13**(1), 69-80; 1992.

HE, H. T.; NAQUET, P.; CAILLOL, D. & PIERRES, M. 'Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial cells through a Ca²⁺(+)-independent mechanism.', *J Exp Med* **173**(2), 515-518; 1991.

HEFFRON, D. S. & GOLDEN, J. A. 'DM-GRASP is necessary for nonradial cell migration during chick diencephalic development.', *J Neurosci* **20**(6), 2287-2294; 2000.

HOFSTETTER, C. P.; SCHWARZ, E. J.; HESS, D.; WIDENFALK, J.; MANIRA, A. E.; PROCKOP, D. J. & OLSON, L. 'Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4), 2199-2204; 2002.

HOLTZER *Stem cells and tissue homeostasis*, chapter: Cell lineages, stem cells and the quantal cell cycle concept, pp. 1228; 1978.

HORWITZ, E. M.; BLANC, K. L.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A. & THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY 'Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement.', *Cytotherapy* **7**(5), 393-395; 2005.

HOYES, A. D. 'Structure and function of the amnion.', *Obstet Gynecol Annu* **4**, 1-38; 1975.

HRISTOV, M.; ERL, W. & WEBER, P. C. 'Endothelial progenitor cells: isolation and characterization.', *Trends Cardiovasc Med* **13**(5), 201-206; 2003.

HUEBER, A. O.; RAPOSO, G.; PIERRES, M. & HE, H. T. 'Thy-1 triggers mouse thymocyte apoptosis through a bcl-2-resistant mechanism.', *J Exp Med* **179**(3), 785-796; 1994.

HUPPETZ, B., 'The anatomy of the normal placenta.', *J Clin Pathol*. 2008 (ahead of print)

IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K.; MITSURU, A.; YAMAGUCHI, S. & TAKASHI, T. A. 'Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta.', *Cytotherapy* **6**(6), 543-553; 2004.

JAVAZON, E. H.; BEGGS, K. J. & FLAKE, A. W. 'Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging.', *Exp Hematol* **32**(5), 414-425; 2004.

JIANG, Y.; VAESSEN, B.; LENVIK, T.; BLACKSTAD, M.; REYES, M. & VERFAILLIE, C. M. 'Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain.', *Exp Hematol* **30**(8), 896-904; 2002.

- JONES, B. J.; BROOKE, G.; ATKINSON, K. & MCTAGGART, S. J. 'Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells.', *Placenta* **28**(11-12), 1174-1181; 2007.
- KARAHUSEYINOGLU, S.; CINAR, O.; KILIC, E.; KARA, F.; AKAY, G. G.; DEMIRALP, D. O.; TUKUN, A.; UCKAN, D. & CAN, A. 'Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys.', *Stem Cells* **25**(2), 319-331; 2007.
- KATZ, F. E.; TINDLE, R.; SUTHERLAND, D. R. & GREAVES, M. F. 'Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells.', *Leuk Res* **9**(2), 191-198; 1985.
- KIM, J. S.; KIM, J. C.; NA, B. K.; JEONG, J. M. & SONG, C. Y. 'Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn.', *Exp Eye Res* **70**(3), 329-337; 2000.
- KIM, J. W.; KIM, S. Y.; PARK, S. Y.; KIM, Y. M.; KIM, J. M.; LEE, M. H. & RYU, H. M. 'Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord.', *Ann Hematol* **83**(12), 733-738; 2004.
- KIM, S.; ROMERO, R.; KIM, J.; ABBAS, A.; ESPINOZA, J.; KUSANOVIC, J. P.; HASSAN, S.; YOON, B. H. & KIM, C. J. 'Coexpression of myofibroblast and macrophage markers: novel evidence for an in vivo plasticity of chorioamniotic mesodermal cells of the human placenta.', *Lab Invest* **88**(4), 365-374; 2008.
- KLUG, M. G.; SOONPAA, M. H.; KOH, G. Y. & FIELD, L. J. 'Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts.', *J Clin Invest* **98**(1), 216-224; 1996.
- KUBO, M.; SONODA, Y.; MURAMATSU, R. & USUI, M. 'Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation.', *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(7), 1539-1546; 2001.
- KUZNETSOV, S. A.; KREBSBACH, P. H.; SATOMURA, K.; KERR, J.; RIMINUCCI, M.; BENAYAHU, D. & ROBEY, P. G. 'Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo.', *J Bone Miner Res* **12**(9), 1335-1347; 1997.
- LASTRES, P.; BELLON, T.; CABAÑAS, C.; SANCHEZ-MADRID, F.; ACEVEDO, A.; GOUGOS, A.; LETARTE, M. & BERNABEU, C. 'Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen.', *Eur J Immunol* **22**(2), 393-397; 1992.
- LEBLOND, C. P. 'Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior.', *Natl Cancer Inst Monogr* **14**, 119-150; 1964.
- LEDOUX, S.; RUNEMBERT, I.; KOUMANOV, K.; MICHEL, J. B.; TRUGNAN, G. & FRIEDLANDER, G. 'Hypoxia enhances Ecto-5'-Nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: role of membrane lipids.', *Circ Res* **92**(8), 848-855;

2003.

LENNON, P. F.; TAYLOR, C. T.; STAHL, G. L. & COLGAN, S. P. 'Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation.', *J Exp Med* **188**(8), 1433-1443; 1998.

LEVESQUE, M. C.; HEINLY, C. S.; WHICHARD, L. P. & PATEL, D. D. 'Cytokine-regulated expression of activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166) on monocyte-lineage cells and in rheumatoid arthritis synovium.', *Arthritis Rheum* **41**(12), 2221-2229; 1998.

LI, C. D.; ZHANG, W. Y.; LI, H. L.; JIANG, X. X.; ZHANG, Y.; TANG, P. H. & MAO, N. 'Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation.', *Cell Res* **15**(7), 539-547; 2005.

LIECHTY, K. W.; MACKENZIE, T. C.; SHAABAN, A. F.; RADU, A.; MOSELEY, A. M.; DEANS, R.; MARSHAK, D. R. & FLAKE, A. W. 'Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep.', *Nat Med* **6**(11), 1282-1286; 2000.

LINDENBERG, S.; HYTTEL, P.; SJØGREN, A. & GREVE, T. 'A comparative study of attachment of human, bovine and mouse blastocysts to uterine epithelial monolayer.', *Hum Reprod* **4**(4), 446-456; 1989.

LODIE, T. A.; BLICKARZ, C. E.; DEVARAKONDA, T. J.; HE, C.; DASH, A. B.; CLARKE, J.; GLENECK, K.; SHIHABUDDIN, L. & TUBO, R. 'Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction.', *Tissue Eng* **8**(5), 739-751; 2002.

MAGATTI, M.; MUNARI, S. D.; VERTUA, E.; GIBELLI, L.; WENGLER, G. S. & PAROLINI, O. 'Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities.', *Stem Cells* **26**(1), 182-192; 2008.

MARCUS, A. J. & WOODBURY, D. 'Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard.', *J Cell Mol Med* **12**(3), 730-742; 2008.

MARESCHI, K.; BIASIN, E.; PIACIBELLO, W.; AGLIETTA, M.; MADON, E. & FAGIOLI, F. 'Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood.', *Haematologica* **86**(10), 1099-1100; 2001.

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 U S A* **78**(12), 7634-7638; 1981.

MATSUMOTO, A.; MITCHELL, A.; KURATA, H.; PYLE, L.; KONDO, K.; ITAKURA, H. & FIDGE, N. 'Cloning and characterization of HB2, a candidate high density lipoprotein receptor. Sequence homology with members of the immunoglobulin superfamily of membrane proteins.', *J Biol Chem* **272**(27), 16778-16782; 1997.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H. & ZHANG, X. 'Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells.', *Cell Biol Int* **30**(9), 681-687; 2006.

MIKI, T. & STROM, S. C. 'Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells.', *Stem Cell Rev* **2**(2), 133-142; 2006.

MINGUELL, J. J.; ERICES, A. & CONGET, P. 'Mesenchymal stem cells.', *Exp Biol Med (Maywood)* **226**(6), 507-520; 2001.

MOORE & PERSAUD Saunders, ed. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, 2003.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). Disponível em www.nih.gov Acessado em março de 2008.

NAPIERALSKI, R.; KEMPKES, B. & GUTENSOHN, W. 'Evidence for coordinated induction and repression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) and the A2a adenosine receptor in a human B cell line.', *Biol Chem* **384**(3), 483-487; 2003.

NISHISHITA, T.; OUCHI, K.; ZHANG, X.; INOUE, M.; INAZAWA, T.; YOSHIURA, K.; KUWABARA, K.; NAKAOKA, T.; WATANABE, N.; IGURA, K.; TAKAHASHI, T. A. & YAMASHITA, N. 'A potential pro-angiogenic cell therapy with human placenta-derived mesenchymal cells.', *Biochem Biophys Res Commun* **325**(1), 24-31; 2004.

OKAMOTO, K.; MIYOSHI, S.; TOYODA, M.; HIDA, N.; IKEGAMI, Y.; MAKINO, H.; NISHIYAMA, N.; TSUJI, H.; CUI, C.; SEGAWA, K.; UYAMA, T.; KAMI, D.; MIYADO, K.; ASADA, H.; MATSUMOTO, K.; SAITO, H.; YOSHIMURA, Y.; OGAWA, S.; AEBA, R.; YOZU, R. & UMEZAWA, A. 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells.', *Exp Cell Res* **313**(12), 2550-2562; 2007.

PASQUINELLI, G.; TAZZARI, P.; RICCI, F.; VASELLI, C.; BUZZI, M.; CONTE, R.; ORRICO, C.; FORONI, L.; STELLA, A.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P. & LUCARELLI, E. 'Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta.', *Ultrastruct Pathol* **31**(1), 23-31; 2007.

PATEL, D. D.; WEE, S. F.; WHICHARD, L. P.; BOWEN, M. A.; PESANDO, J. M.; ARUFFO, A. & HAYNES, B. F. 'Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells.', *J Exp Med* **181**(4), 1563-1568; 1995.

PIERELLI, L.; BONANNO, G.; RUTELLA, S.; MARONE, M.; SCAMBIA, G. & LEONE, G. 'CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells.', *Leuk Lymphoma* **42**(6), 1195-1206; 2001.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S. & MARSHAK, D. R. 'Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.', *Science* **284**(5411), 143-147; 1999.

PORTMANN-LANZ, C. B.; SCHOEBERLEIN, A.; HUBER, A.; SAGER, R.; MALEK, A.; HOLZGREVE, W. & SURBEK, D. V. 'Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration.', *Am J Obstet Gynecol* **194**(3), 664-673; 2006.

PRESNELL, S. C.; PETERSEN, B. & HEIDARAN, M. 'Stem cells in adult tissues.', *Semin Cell Dev Biol* **13**(5), 369-376; 2002.

RAMIREZ, R. D.; MORALES, C. P.; HERBERT, B. S.; ROHDE, J. M.; PASSONS, C.; SHAY, J. W. & WRIGHT, W. E. 'Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions.', *Genes Dev* **15**(4), 398-403; 2001.

RAO, M. S. & MATTSON, M. P. 'Stem cells and aging: expanding the possibilities.', *Mech Ageing Dev* **122**(7), 713-734; 2001.

RASMUSSEN, I. 'Immune modulation by mesenchymal stem cells.', *Exp Cell Res* **312**(12), 2169-2179; 2006.

REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L. & VERFAILLIE, C. M. 'Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells.', *Blood* **98**(9), 2615-2625; 2001.

RINGDÉN, O.; UZUNEL, M.; RASMUSSEN, I.; REMBERGER, M.; SUNDBERG, B.; LÖNNIES, H.; MARSCHALL, H.; DLUGOSZ, A.; SZAKOS, A.; HASSAN, Z.; OMAZIC, B.; ASCHAN, J.; BARKHOLT, L. & BLANC, K. L. 'Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease.', *Transplantation* **81**(10), 1390-1397; 2006.

ROBERTSON, J. A. 'Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues.', *Nat Rev Genet* **2**(1), 74-78; 2001.

SAALBACH, A.; HAUSTEIN, U. F. & ANDEREGG, U. 'A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts.', *J Invest Dermatol* **115**(5), 882-888; 2000.

SAALBACH, A.; KRAFT, R.; HERRMANN, K.; HAUSTEIN, U. F. & ANDEREGG, U. 'The monoclonal antibody AS02 recognizes a protein on human fibroblasts being highly homologous to Thy-1.', *Arch Dermatol Res* **290**(7), 360-366; 1998.

SAALBACH, A.; WETZIG, T.; HAUSTEIN, U. F. & ANDEREGG, U. 'Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA. Fibroblasts and activated endothelial cells are a possible source of soluble Thy-1 in serum.', *Cell Tissue Res* **298**(2), 307-315; 1999.

SADLER, T. W., Lippincott Williams & Wilkins ed. *Langman's Medical Embryology*, 2006.

SEKINE-AIZAWA, Y.; OMORI, A. & FUJITA, S. C. 'MuSC, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is expressed in neurons of a subset of cranial sensory ganglia in the mouse embryo.', *Eur J Neurosci* **10**(9), 2810-2824; 1998.

SEKIYA, I.; LARSON, B. L.; SMITH, J. R.; POCHAMPALLY, R.; CUI, J. & PROCKOP, D. J. 'Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality.', *Stem Cells* **20**(6), 530-541; 2002.

SMITH, A. 'A glossary for stem cell biology', *Nature* **441**, 1060-1068; 2006.

SMITH, A. G.; HEATH, J. K.; DONALDSON, D. D.; WONG, G. G.; MOREAU, J.; STAHL, M. & ROGERS, D. 'Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides.', *Nature* **336**(6200), 688-690; 1988.

SOLOMON, A.; ESPANA, E. M. & TSENG, S. C. G. 'Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the conjunctival fornices.', *Ophthalmology* **110**(1), 93-100; 2003.

SONCINI, M.; VERTUA, E.; GIBELLI, L.; ZORZI, F.; DENEGRI, M.; ALBERTINI, A.; WENGLER, G. S. & PAROLINI, O. 'Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes.', *J Tissue Eng Regen Med* **1**(4), 296-305; 2007.

SPRADLING, A.; DRUMMOND-BARBOSA, D. & KAI, T. 'Stem cells find their niche.', *Nature* **414**(6859), 98-104; 2001.

VAN DE STOLPE, A. & VAN DER SAAG, P. T. 'Intercellular adhesion molecule-1.', *J Mol Med* **74**(1), 13-33; 1996.

STROHMEIER, G. R.; LENCER, W. I.; PATAPOFF, T. W.; THOMPSON, L. F.; CARLSON, S. L.; MOE, S. J.; CARNES, D. K.; MRSNY, R. J. & MADARA, J. L. 'Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia.', *J Clin Invest* **99**(11), 2588-2601; 1997.

SUBRAHMANYAM, M. 'Amniotic membrane as a cover for microskin grafts.', *Br J Plast Surg* **48**(7), 477-478; 1995.

SWART, G. W. M. 'Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration.', *Eur J Cell Biol* **81**(6), 313-321; 2002.

SYNNESTVEDT, K.; FURUTA, G. T.; COMERFORD, K. M.; LOUIS, N.; KARHAUSEN, J.; ELTZSCHIG, H. K.; HANSEN, K. R.; THOMPSON, L. F. & COLGAN, S. P. 'Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia.', *J Clin Invest* **110**(7), 993-1002; 2002.

TANKER, P. S. I.; SCHERJON, S. A.; DER KEUR, C. K.; DE GROOT-SWINGS, G. M. J. S.; CLAAS, F. H. J.; FIBBE, W. E. & KANHAI, H. H. H., 'Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta.', *Stem Cells*

22(7), 1338-1345, 2004.

TALMI, Y. P.; SIGLER, L.; INGE, E.; FINKELSTEIN, Y. & ZOHAR, Y. 'Antibacterial properties of human amniotic membranes.', *Placenta* **12**(3), 285-288, 1991.

THOMAS, E. D.; LOCHTE, H. L.; LU, W. C. & FERREBEE, J. W. 'Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy.', *N Engl J Med* **257**(11), 491-496; 1957.

THOMPSON, L. F.; RUEDI, J. M.; LOW, M. G. & CLEMENT, L. T. 'Distribution of ecto-5'-nucleotidase on subsets of human T and B lymphocytes as detected by indirect immunofluorescence using goat antibodies.', *J Immunol* **139**(12), 4042—4048; 1987.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S. & JONES, J. M. 'Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.', *Science* **282**(5391), 1145-1147; 1998.

TILL, J. E. & McCULLOCH, E. A. 'A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.', *Radiat Res* **14**, 213-222; 1961.

TIVERON, M. C.; BARBONI, E.; RIVERO, F. B. P.; GORMLEY, A. M.; SEELEY, P. J.; GROSVELD, F. & MORRIS, R. 'Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein.', *Nature* **355**(6362), 745-748; 1992.

TSENG, S. C.; PRABHASAWAT, P.; BARTON, K.; GRAY, T. & MELLER, D. 'Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency.', *Arch Ophthalmol* **116**(4), 431-441; 1998.

UCHIDA, N.; YANG, Z.; COMBS, J.; POURQUIÉ, O.; NGUYEN, M.; RAMANATHAN, R.; FU, J.; WELPLY, A.; CHEN, S.; WEDDELL, G.; SHARMA, A. K.; LEIBY, K. R.; KARAGOGEOS, D.; HILL, B.; HUMEAU, L.; STALLCUP, W. B.; HOFFMAN, R.; TSUKAMOTO, A. S.; GEARING, D. P. & PÉAULT, B. 'The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells.', *Blood* **89**(8), 2706-2716; 1997.

UETA, M.; KWEON, M.; SANO, Y.; SOTOZONO, C.; YAMADA, J.; KOIZUMI, N.; KIYONO, H. & KINOSHITA, S. 'Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction.', *Clin Exp Immunol* **129**(3), 464-470; 2002.

WAKITANI, S.; SAITO, T. & CAPLAN, A. I. 'Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine.', *Muscle Nerve* **18**(12), 1417-1426; 1995.

WARD, D. J.; BENNETT, J. P.; BURGOS, H. & FABRE, J. 'The healing of chronic venous leg ulcers with prepared human amnion.', *Br J Plast Surg* **42**(4), 463-467; 1989.

WERB, Z.; CHIN, J. R.; TAKEMURA, R.; OROPEZA, R. L.; BAINTON, D. F.; STENBERG, P.; TAYLOR, J. M. & REARDON, C. 'The cell and molecular biology of

apolipoprotein E synthesis by macrophages.', *Ciba Found Symp* **118**, 155-171; 1986.

WEXLER, S. A.; DONALDSON, C.; DENNING-KENDALL, P.; RICE, C.; BRADLEY, B. & HOWS, J. M. 'Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not.', *Br J Haematol* **121**(2), 368-374; 2003.

WILLIAMS, J. T.; SOUTHERLAND, S. S.; SOUZA, J.; CALCUTT, A. F. & CARTLEDGE, R. G. 'Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes.', *Am Surg* **65**(1), 22-26; 1999.

WILLIAMS, R. L.; HILTON, D. J.; PEASE, S.; WILLSON, T. A.; STEWART, C. L.; GEARING, D. P.; WAGNER, E. F.; METCALF, D.; NICOLA, N. A. & GOUGH, N. M. 'Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.', *Nature* **336**(6200), 684-687; 1988.

WOODBURY, D.; SCHWARZ, E. J.; PROCKOP, D. J. & BLACK, I. B. 'Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.', *J Neurosci Res* **61**(4), 364-370; 2000.

XU, C.; INOKUMA, M. S.; DENHAM, J.; GOLDS, K.; KUNDU, P.; GOLD, J. D. & CARPENTER, M. K. 'Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells.', *Nat Biotechnol* **19**(10), 971-974; 2001.

YANG, D.; TSAY, H.; LIN, S.; CHIOU, S.; LI, M.; CHANG, T. & HUNG, S. 'cAMP/PKA regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of RANKL/OPG mRNA expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin.', *PLoS ONE* **3**(2), e1540; 2008.

YEN, B. L.; HUANG, H.; CHIEN, C.; JUI, H.; KO, B.; YAO, M.; SHUN, C.; YEN, M.; LEE, M. & CHEN, Y. 'Isolation of multipotent cells from human term placenta.', *Stem Cells* **23**(1), 3-9; 2005.

YOUNG, H. E.; MANCINI, M. L.; WRIGHT, R. P.; SMITH, J. C.; BLACK, A. C.; REAGAN, C. R. & LUCAS, P. A. 'Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs.', *Dev Dyn* **202**(2), 137-144; 1995.

ZHANG, X.; MITSURU, A.; IGURA, K.; TAKAHASHI, K.; ICHINOSE, S.; YAMAGUCHI, S. & TAKAHASHI, T. A. 'Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering.', *Biochem Biophys Res Commun* **340**(3), 944-952; 2006.

ZHANG, X.; SODA, Y.; TAKAHASHI, K.; BAI, Y.; MITSURU, A.; IGURA, K.; SATOH, H.; YAMAGUCHI, S.; TANI, K.; TOJO, A. & TAKAHASHI, T. A. 'Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells.', *Biochem Biophys Res Commun* **351**(4), 853-859; 2006.

ZIMMERMANN, H. '5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects.', *Biochem J* **285** (Pt 2), 345-365; 1992.

ZUCKERMAN, L. A.; PULLEN, L. & MILLER, J. 'Functional consequences of costimulation by ICAM-1 on IL-2 gene expression and T cell activation.', *J Immunol* **160**(7), 3259-3268; 1998.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; UGARTE, D. A. D.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P. & HEDRICK, M. H. 'Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.', *Mol Biol Cell* **13**(12), 4279-4295; 2002.

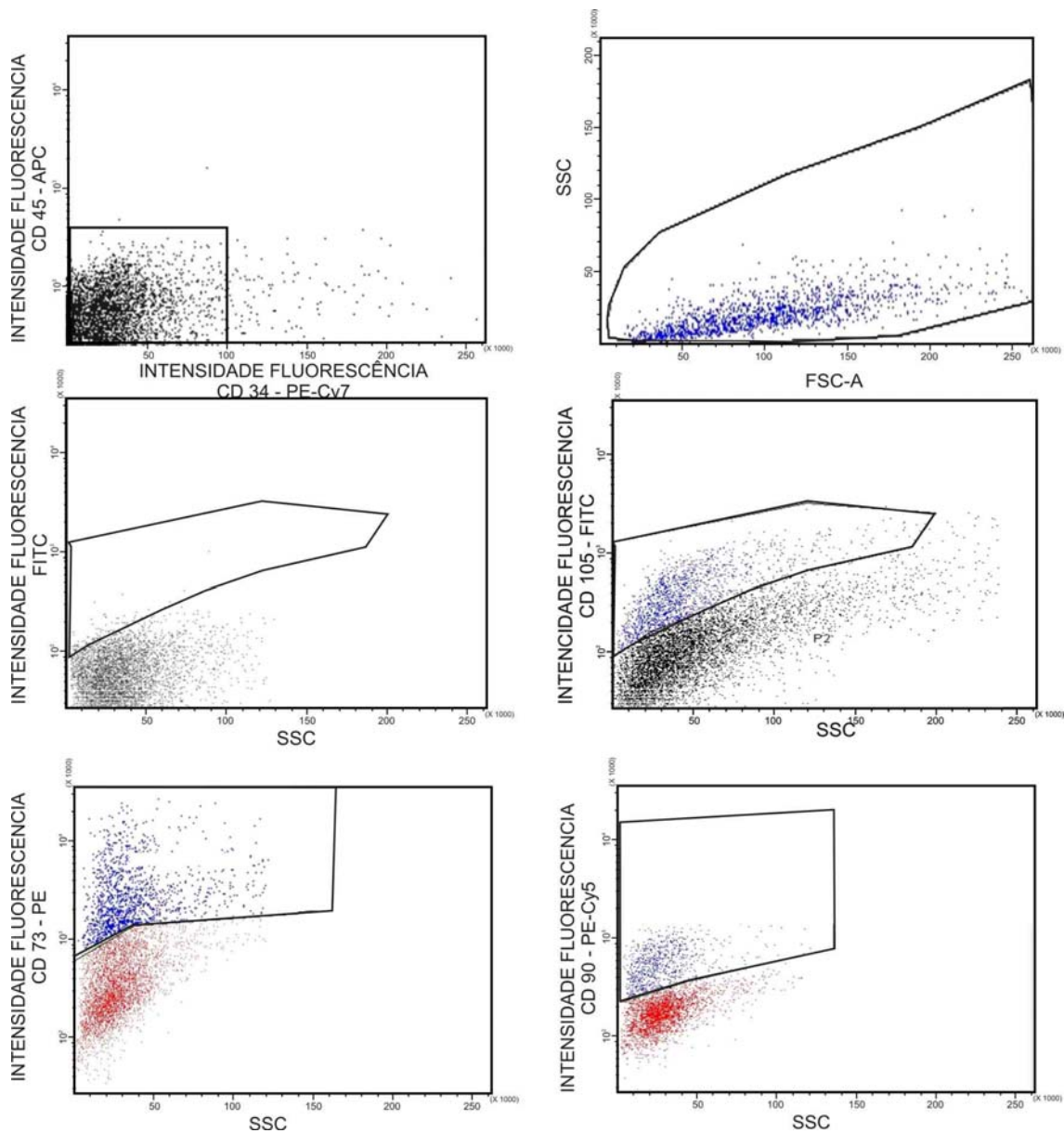
ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P. & HEDRICK, M. H. 'Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.', *Tissue Eng* **7**(2), 211-228; 2001.

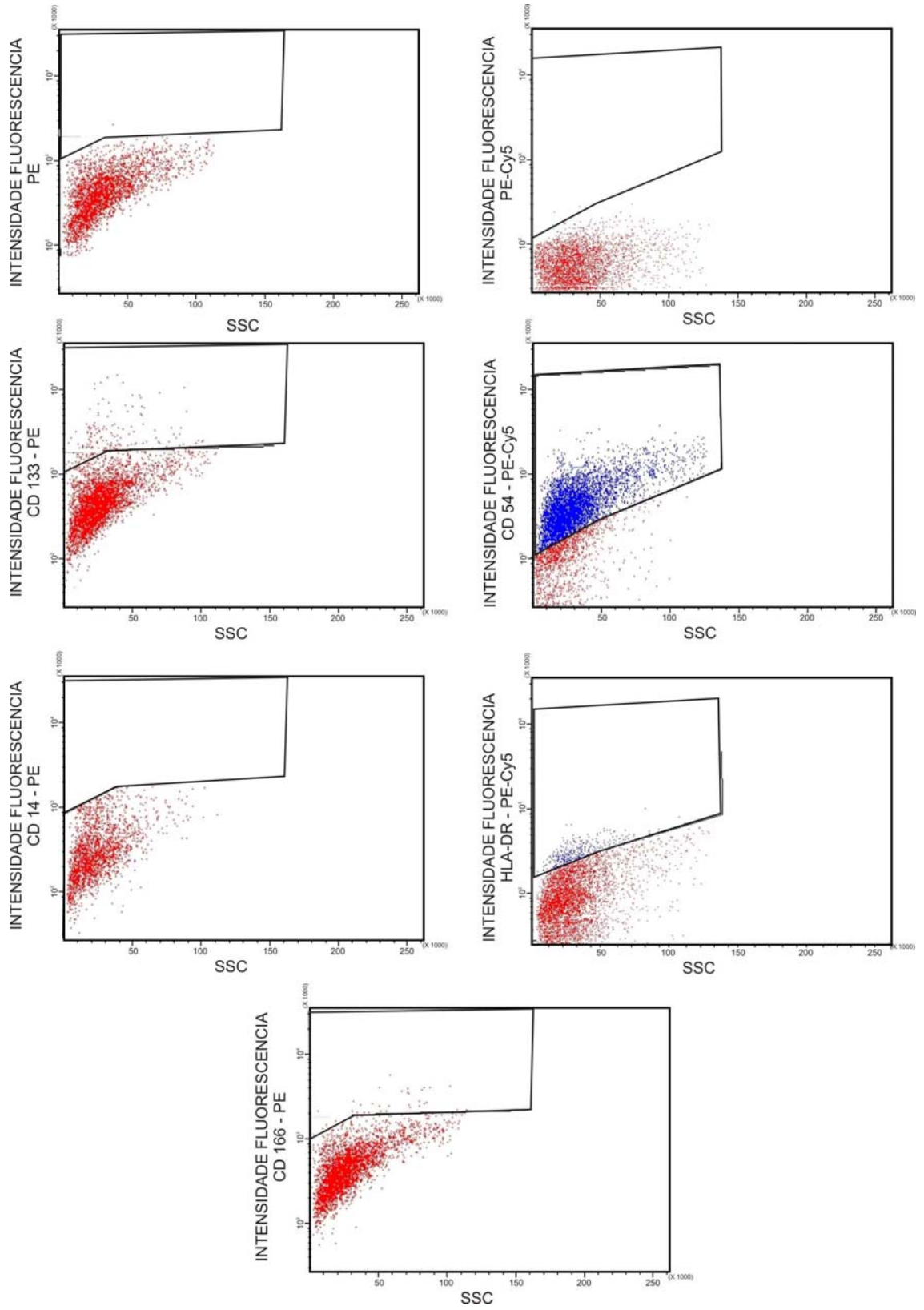
ZVAIFLER, N. J.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; ADAMS, G.; EDWARDS, C. J.; MOSS, J.; BURGER, J. A. & MAINI, R. N. 'Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals.', *Arthritis Res* **2**(6), 477-488; 2000.

APÊNDICES

Apêndice 1

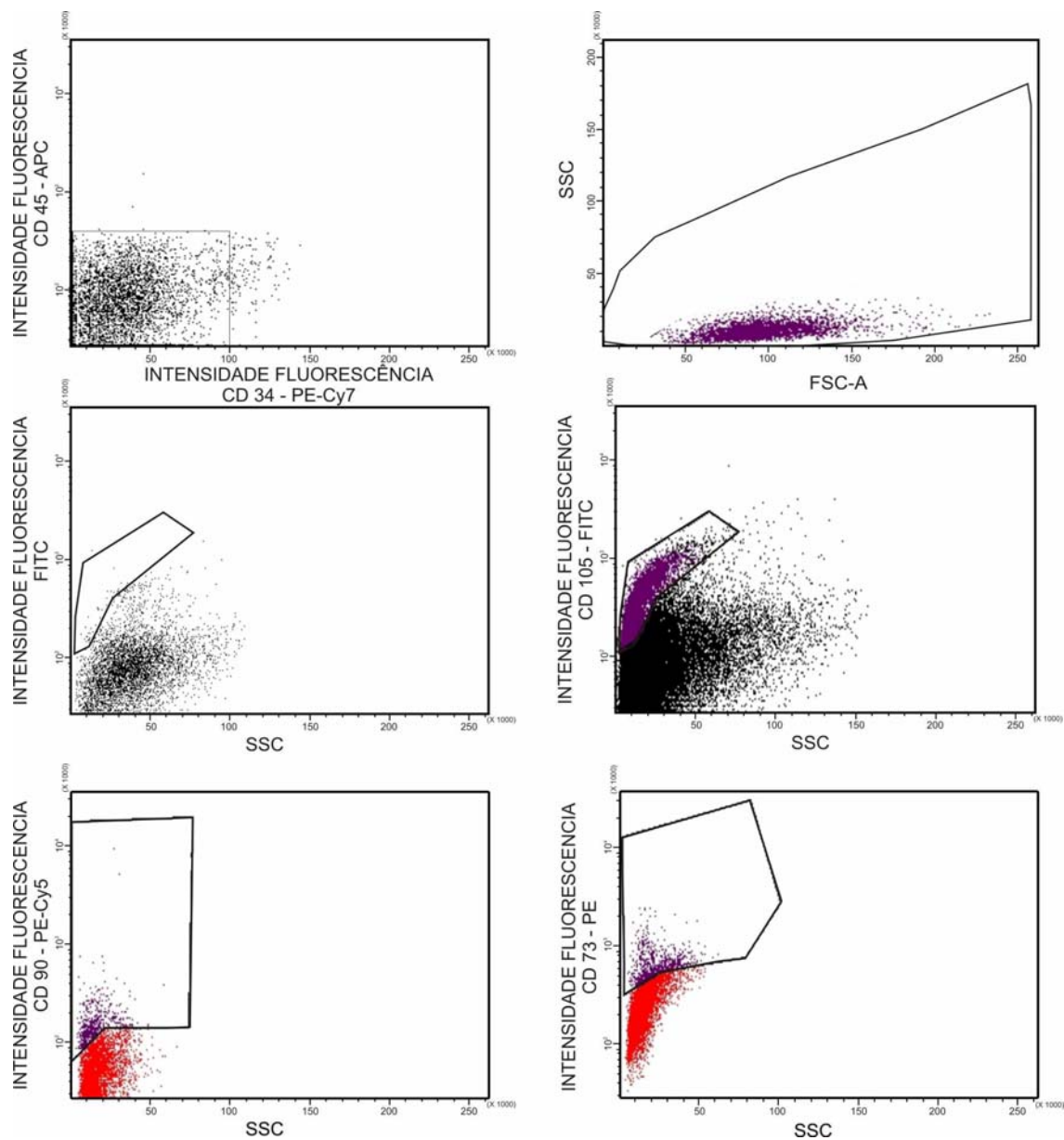
Análise por citometria de fluxo das células CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ a fresco
derivadas da placa coriônica da placenta humana a termo

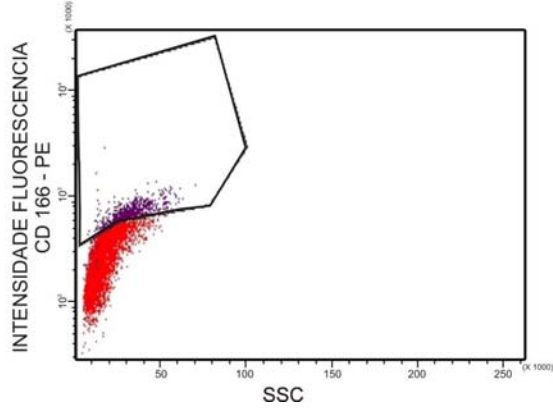
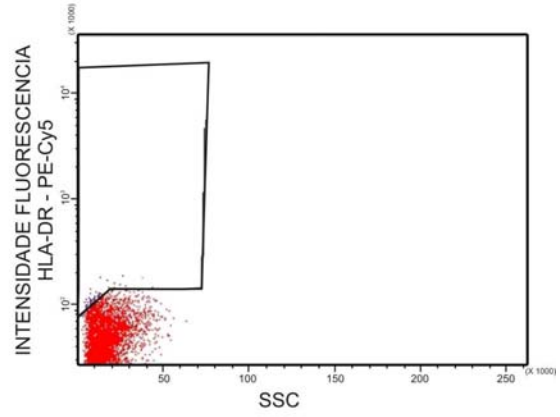
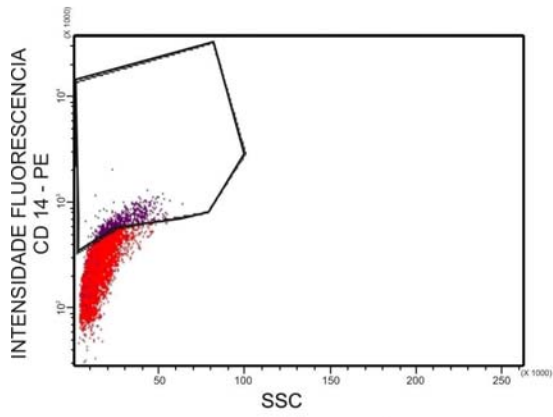
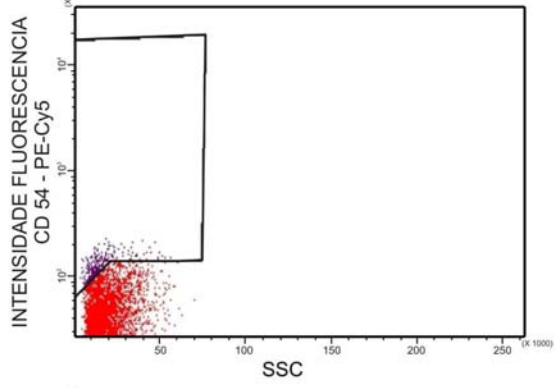
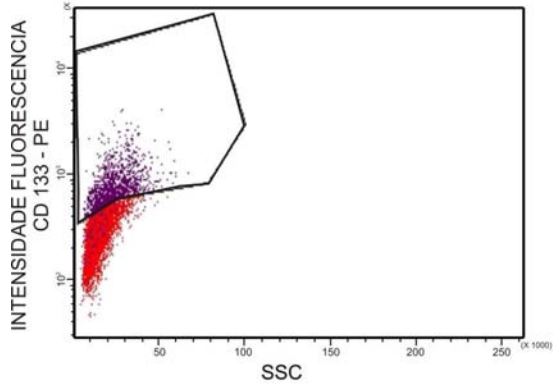
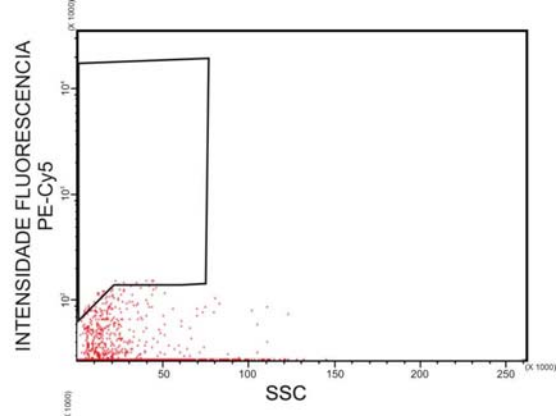
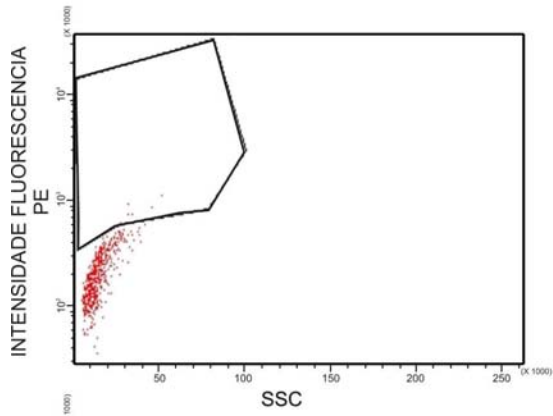




Apêndice 2

Análise por citometria de fluxo das células CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ a fresco derivadas das vilosidades coriônicas da placenta humana a termo





Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)