



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

Fernanda Cristina Paccola Mesquita

**Estudo comparativo das células-tronco
derivadas de diferentes regiões do cordão
umbilical humano**

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Fernanda Cristina Paccola Mesquita

Estudo comparativo das células-tronco derivadas de diferentes regiões do cordão umbilical humano

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

Orientadores:

Prof. Dr. Antonio Carlos Campos de Carvalho

Prof. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Rio de Janeiro
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Mesquita, Fernanda Cristina Paccola

Estudo comparativo das células derivadas de diferentes regiões do cordão umbilical humano– Rio de Janeiro, 2010.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia)
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, 2009

Orientadores: Antonio Carlos Campos de Carvalho e Regina Coeli dos
Santos Goldenberg

1. Cordão Umbilical; 2. Artéria umbilical; 3. Veia Umbilical; 4. Geléia de Wharton; 5. Célula-tronco; 6. Célula-tronco mesenquimal

Este trabalho foi desenvolvido no LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR do INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO do Centro de Ciências da Saúde da UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO e no LABORATÓRIO DE ENGENHARIA TECIDUAL do INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA com auxílio das entidades: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Biologia Estrutural e Bioimagem e Decit/Ministério da Saúde.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDA CRISTINA PACCOLA MESQUITA

Estudo comparativo das células-tronco derivadas de diferentes regiões do cordão umbilical humano

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro, 12 de março de 2010

Prof. Dr. Júlio César Voltarelli – Membro da Banca Examinadora

Coordenador da Divisão de Imunologia Clínica, do Laboratório de Imunogenética (HLA) e da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

Prof. Dr. Fernando Costa e Silva Filho – Membro da Banca Examinadora

Laboratório de Biologia da Superfície Celular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Profa. Dra. Rosalia Mendez Otero – Membro da Banca Examinadora

Laboratório de Neurologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dra. Adriana Bastos Carvalho – Revisor

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marcelo Einicker Lamas – Suplente Interno

Laboratório de Físico-Química Biológica Aida Hassón Voloch do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Cristiane del Corosso – Suplente Externa

Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Prof. Antonio Paes de Carvalho do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Antonio e Profa. Regina por me aceitarem, incentivarem, e acreditarem em mim, mesmo nos momentos em que menos acreditei.

Aos meus pais, Antonio e Suzana, por me trilharem pelo caminho certo, pelas palavras de apoio, incentivo, carinho e amor incondicional que me ajudam a encarar todos os obstáculos desta vida, além de me financiarem nesta jornada na cidade Maravilhosa.

A minha irmã Renata, por me ter como uma vencedora, mesmo nos momentos em que não me sentia assim, pelas visitas, passeios no bondinho de Santa Tereza, pelos Jogos Panamericanos e pelo simples fato de ser minha irmã, meu orgulho incondicional.

Aos meus avós, Antonio e Edy, pelo amor e por diariamente me enviarem mensagens incentivadoras, alegres, que me inspiram na luta do dia-a-dia. Meus “velhinhos” amo muito vocês.

A Luiza, mãe do Lucas, grande amiga. Por me ensinar que dentro de uma cidade pode existir um pedágio e que um dia somos pessoas incompletas e no dia seguinte podemos encontrar a felicidade plena. Obrigada por tudo.

A todos que trabalharam direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Andreza, ciumenta e possessiva, pessoa que mais gosta de fazer disciplina, nos vemos na bandeira do Brasil! Taís, por todos os momentos no citômetro e sala de cultura, rindo, falando sério ou mesmo analisando e processando os resultados... Leandro, por me ajudar a desvendar os mistérios e

os botões daquela nave espacial que é o microscópio Apotome e por todos os momentos de descontração dentro e fora do LCCM.

Aos colegas que fazem a nossa jornada no laboratório mais prazerosa Débora, Ju Silva, Adriana, Danúbia, Bia, Karina, Guilherme, Gil, noBru, LF, Esporcatte, Marcinha, Ju P, Grazy, Vanessa, Camila, Suzana, Lanuza, Isa, Cris Emiliano, Deivid, dona Conceição, Seu Zé, Thiago, e ao pessoal do INC Virgínia, Raiana, Bernardo, Lu, Fabi, Paty, Nena, Graubi, vovó Georgina e Net... Pessoas completamente diferentes, mas quando estamos juntos, me levam a acreditar que tudo se torna mais fácil, não sei se pelo motivo de várias cabeças pensarem mais do que uma ou apenas por saber que posso contar com vocês a qualquer momento desta jornada.

A Maite e Monique, que em 15 dias conquistaram o meu carinho, amizade e respeito. No momento em que éramos concorrentes, nos tornamos amigas e batalhamos juntas, cada uma em sua área de pesquisa, na busca do tão desejado título de mestre.

Como já dizia Oscar Wilde, “a vida é muito importante para ser levada tão a sério”, por isso, obrigada aos amigos por todas “terças em dobro”, “partiu para o outback, só para um chopp humilde”, arraiás, congressos, festas de finais de ano...

“A vida dá tantas voltas e é tão paradoxal no seu decorrer que tanto o mau pode vir a ser bom, como o bom pode vir a ser mau.”

Provérbio Chinês

RESUMO

MESQUITA, Fernanda Cristina Paccola, **Estudo comparativo das células-tronco derivadas de diferentes regiões do cordão umbilical**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) - Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O cordão umbilical é um órgão temporário responsável pela sobrevivência do embrião no útero materno, frequentemente descartado após o nascimento, do qual podem ser isolados dois principais tipos de células-tronco: células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical e células estromais do cordão umbilical (CCUm). As CCUm são usualmente isoladas da geléia de Wharton, um tecido conjuntivo que protege os vasos do cordão umbilical. Neste trabalho, relatamos que as CCUm podem também ser isoladas desses vasos (duas artérias e uma veia) e que, dependendo da região da qual são isoladas, as células exibem diferentes propriedades. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e comparar as células-tronco obtidas da geléia de Wharton (GW), das artérias umbilicais (AU) e da veia umbilical (VU). Todos os tipos celulares isolados aderiram ao frasco de cultura e apresentavam morfologia fibroblástica. Adicionalmente, sob estímulo apropriado, todos os tipos celulares originaram osteócitos e adipócitos, indicando que estas células são multipotentes. Entretanto, quando analisado o tempo que estas células levam para dobrar seu número original (PDT), observamos que as células da VU (PDT 1.96 ± 0.02 dias) proliferaram mais rápido do que as da GW (PDT 2.66 ± 0.16 dias) e da AU (PDT 2.78 ± 0.15 dias). Antígenos de superfícies foram analisados por citometria de fluxo. Observou-se que todos os tipos celulares expressaram antígenos de células mesenquimais (CD90 e CD73), mas foram negativos para CD105. Além disso, todas as células foram negativas para antígenos hematopoiéticos (CD34, CD45 e HLA-DR), para antígenos endoteliais (CD31 e CD133) e para o receptor do fator de células tronco (SCF, do inglês stem cell factor) c-Kit. Os três tipos celulares expressaram moléculas de adesão (CD54, CD44 e CD166). Observou-se que as células da AU não expressaram os seguintes genes relacionados à pluripotência Rex, Sox2, Dnmt3b, Dppa4, Nodal e Tdgf apenas expressando Klf4; enquanto as células da VU expressaram Rex, Tdgf e Klf4 e as células da GW expressaram Oct4, Dnmt3b e Klf4. Os três tipos celulares expressaram SSEA-4 e Oct4, mas apenas as células da GW foram positivas para a isoforma A de Oct4. Ao nível protéico, todos os tipos celulares expressaram vimentina, fator de von Willebrand e α -actina de músculo liso e foram negativas para tropomiosina e troponina I. Em conclusão, as células estromais do cordão umbilical são células multipotentes, facilmente obtidas, mas que apresentam propriedades diferentes, dependendo do local de onde são isoladas. As células derivadas da VU crescem mais rapidamente em cultura, enquanto as células da GW expressam os principais marcadores de pluripotência.

Palavras-chaves: Cordão umbilical, célula-tronco mesenquimal, caracterização

ABSTRACT

MESQUITA, Fernanda Cristina Paccola, **Comparative analysis of stem cells derived from different regions of the umbilical Cord**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) - Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

The umbilical cord is a temporary organ, frequently discarded after birth, from which two major stem cell types can be isolated: cord blood hematopoietic stem cells and stromal umbilical cord cells (SUCC). SUCCs are usually isolated from Wharton's Jelly, a connective tissue matrix that protects the umbilical cord vessels. Here, we report that SUCCs can also be isolated from these vessels (two arteries and one vein) and that, depending on the isolation site, cells exhibit different properties. Thus, the objective of this work was to isolate, characterize and compare cells obtained from Wharton's Jelly (UCWJ), umbilical cord arteries (UCA) and the umbilical cord vein (UCV). All cell types were adherent to plastic and had a fibroblast-like morphology. Additionally, upon proper stimulation, all cell types gave rise to osteocytes and adipocytes, indicating that these cells were multipotent. However, when analyzing population-doubling time (PDT), we observed that UCVs (PDT 1.96 ± 0.02 days) proliferated more than UCWJ (PDT 2.66 ± 0.16 days) and UCAs (PDT 2.78 ± 0.15 days). Cell-surface markers were analyzed by flow cytometry. We observed that all cell types expressed the mesenchymal stromal cell markers CD90, CD73, but were negative for CD105. Additionally, all cells were negative for the hematopoietic markers (CD34, CD45 and HLA-DR) and for the endothelial cell markers (CD31 and CD133). All cell types express the adhesion molecules (CD54, CD44 and CD166). Pluripotency markers expression was analyzed by RT-PCR. We observed that UCAs did not express any of the following pluripotency related genes Rex, Sox2, Dnmt3b, Dppa4, Nodal, Tdgf, expressing only Klf4; while UCVs expressed Rex, Tdgf and Klf4; and UCWJ expressed Oct4, Dnmt3b and Klf4. Importantly, all cells were positive for the pluripotency markers SSEA-4 and Oct4, but only UCWJs were positive for Oct4 isoform A. At the protein level, all cell types stained positive for vimentin, von Willebrand Factor and α -smooth muscle actin; and were negative for tropomyosin and troponin I. In conclusion, umbilical cord cells are readily available multipotent cells but present different properties depending on the isolation site. Cells derived from the umbilical vein grew faster in culture, while cells derived from Wharton's Jelly expressed the most important pluripotency markers.

Keywords: Umbilical Cord, mesenchymal stem cells, characterization.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desenho ilustrando a formação do cordão umbilical	2
Figura 2. Modelos propostos para a divisão das células-tronco	5
Figura 3. Hierarquia quanto à plasticidade de células-tronco	7
Figura 4. Fontes de Células-tronco fetais	16
Figura 5. Cordões umbilicais processados	39
Figura 6. Cultivo de CTM de AU, VU e GW	40
Figura 7. Ensaio de diferenciação osteogênico	41
Figura 8. Ensaio de diferenciação adipogênico	42
Figura 9. Morfologia das células do CUM	43
Figura 10. Quantificação da expressão de moléculas presentes em AU, VU e GW	46
Figura 11. Perfil do crescimento das células de CUM em dias	48
Figura 12. Crescimento das células do CUM em escala semilogarítmica	49
Figura 13. Tempo para dobrar a população	50
Figura 14. RT-PCR	52
Figura 15. Imunofluorescência para Oct4 e SSEA-4	54
Figura 16. Imunofluorescência para Fator de Von Willebrand	55
Figura 17. Imunofluorescência para vimentina e α-actina de músculo liso ..	57
Figura 18. Imunofluorescência para Troponina I e Tropomiosina	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Número de artigos publicados com o termo célula-tronco no período de 10 anos	9
Tabela 2. Anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica das células do CUm	29
Tabela 3. Sequência de primers utilizados.....	33
Tabela 4. Anticorpos utilizados em ensaios de imunocitoquímica nas células do CUm.	36
Tabela 5. Perfil imunofenotípico das células do CUm em cultura.....	45
Tabela 6. Resultados comparativos entre AU, VU e GW.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA	alfa-actina de músculo liso (do inglês <i>alpha-smooth muscle actin</i>)
ALCAM	Molécula de adesão leucócito ativado (do inglês <i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i>)
AU	Artéria Umbilical
β -FGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos (do inglês <i>Basic Fibroblast growth factor</i>)
β_1 -TGF	Fator de crescimento β_1 transformador (do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>)
BSCUP	Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco adulta
CTE	Célula-tronco embrionária
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CUm	Cordão Umbilical
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenilindol (do inglês 4'-6- <i>Diamidino-2-phenylindole</i>)
DEVH	Doença enxerto versus hospedeiro
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado (do inglês <i>triphosphate deoxyribonucleotide</i>)
DPPA4	Desenvolvimento de pluripotencialidade associada 4 (do inglês <i>developmental pluripotency associated 4</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidermal (do inglês <i>Epidermal growth factor</i>)
FSC	Dispersão frontal (do inglês <i>forward scatter</i>)

fvW	Fator de von Willebrand
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase (do inglês <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GW	Geléia de Wharton
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês <i>International Society for Cellular Therapy</i>)
Klf	Fator do tipo Kruppel (do inglês <i>Kruppel-like factor</i>)
MCI	Massa celular interna
Oct-4	Octâmero-4 (do inglês <i>Octamer-4</i>)
P0	Passagem 0
P3	Passagem 3
PBS	Salina tampão fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PDT	Tempo para duplicar a população (do inglês <i>population doubling time</i>)
PECAM-1	Molécula-1 de adesão celular endotelial a plaqueta (do inglês <i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia da transcriptase reversa (do inglês <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SCUP	Sangue de cordão umbilical e Placentário
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Dispersão lateral (do inglês <i>Side scatter</i>)
SSEA-4	Antígeno embrionário estágio específico 4 (do inglês <i>Stage-specific embryonic antigen 4</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VU	Veia umbilical

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Cordão Umbilical: Ontogenia e Organogênese	1
1.2. Células-Tronco	4
1.2.1. Conceito	4
1.2.2. Caracterização	5
1.2.3. Célula-tronco Adulta	8
1.2.4. Células-tronco hematopoiéticas	11
1.2.5. Células-tronco mesenquimais	13
1.2.6. Células-tronco Fetais	15
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. <i>Obtenção do cordão umbilical</i>	27
3.2. <i>Isolamento das Células obtidas do Cordão umbilical</i>	27
3.3. <i>Caracterização por Citometria de Fluxo</i>	28
3.4. <i>Ensaio de diferenciação</i>	30
3.4. <i>Estudo de proliferação celular - Population Doubling Time (PDT)</i>	32
3.5. <i>Caracterização por RT-PCR</i>	32
3.6. <i>Imunofluorescência</i>	35
3.7. <i>Análises estatísticas</i>	37
4. RESULTADOS	38

4.1. <i>Cultivo das células do cordão umbilical (CUM)</i>	38
4.2. <i>Ensaio de Diferenciação</i>	41
4.3. <i>Citometria de Fluxo</i>	42
4.4. <i>Estudo de proliferação celular - Population Doubling Time (PDT)</i>	47
4.5. <i>Caracterização por RT-PCR</i>	50
4.6. <i>Caracterização por imunofluorescência</i>	53
4.7. <i>Comparação entre as três fontes do CUM</i>	59
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS	77
Anexo I – Principais características das Moléculas CD	91
Anexo II – Histogramas de citometria de fluxo	92
Anexo III – Histogramas de citometria de fluxo de CD105 nas CTM de medula óssea	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cordão Umbilical: Ontogenia e Organogênese

O cordão umbilical (CUm) constitui, juntamente com a placenta, um órgão temporário responsável pela sobrevivência do embrião no útero materno. Esses órgãos estão presentes na maioria dos mamíferos, sendo responsáveis pela comunicação entre o embrião e a mãe, ou seja, deste com o meio externo. Inicialmente, toda a região âmnio-embrionária está presa ao córion (membrana que reveste o embrião formada por duas camadas: o trofoblasto e o mesoderma extra-embrionário) por uma ponte de mesoderma extra-embrionário denominado pedículo de ligação ou pedículo embrionário. O pedículo de ligação se origina do mesoderma extra-embrionário que não foi delaminado e conecta o embrião com a parede da vesícula coriônica. Este constituirá o futuro estroma do cordão umbilical (Figura 1) (Moore & Persaud, 2008).

O CUm, em humanos, começa a se formar entre a quarta e oitava semana do desenvolvimento embrionário (Larsen, 2001). Ao longo do desenvolvimento, o pedículo de ligação, e o ducto onfaloentérico, conexão tubular entre o saco vitelino e o intestino primitivo, são envolvidos pelo âmnio, constituindo, assim o CUm, no qual os vasos umbilicais, derivados dos vasos alantoidianos, se desenvolvem envolvidos por um tecido conjuntivo, a geléia de Wharton. (O'Rahilly & Muller, 2005).

No fim do 3º mês de gestação, a parede abdominal está totalmente fechada pela fusão da somatopleura, exceto no anel umbilical por onde passa o CUm (Moore & Persaud, 2008) (Figura 1).

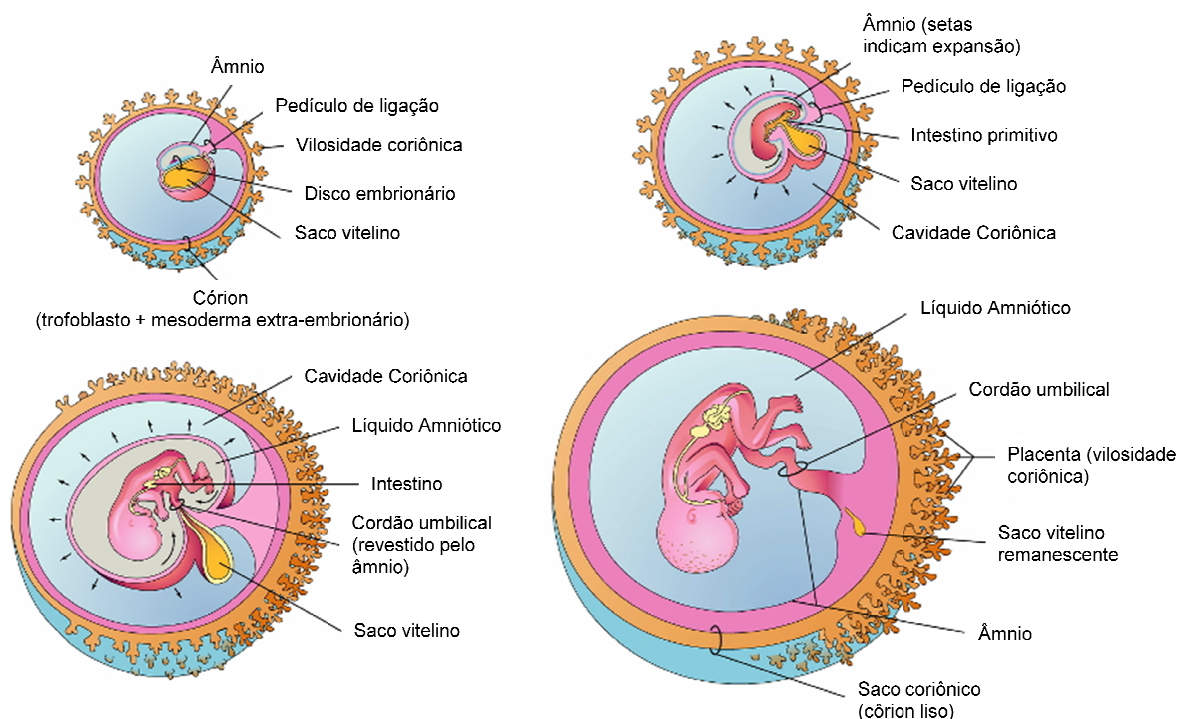


Figura 1. Desenho ilustrando a formação do cordão umbilical e o crescimento do âmnio que passa a envolver o cordão umbilical e a parte fetal da placenta (Adaptado de Moore, KL; Persaud, TVN Embriologia Clínica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 114-45.)

O CUM possui duas artérias e uma veia. A veia umbilical (VU), no início do desenvolvimento embrionário, se bifurca logo antes de penetrar no embrião, e se dirige para a circulação hepática. Com 10 semanas de desenvolvimento, uma das bifurcações involui enquanto a outra se mantém permeável até o período perinatal, quando se oclui e origina o ligamento redondo do fígado. A veia transporta sangue com maior teor de oxigênio e as artérias, sangue com maior teor de gás carbônico.

Como os vasos são mais compridos do que o cordão, é comum a torção e a formação de alças, produzindo os falsos nós. Acredita-se que a disposição helicoidal dos vasos minimize o risco de obstrução, ou seja, a formação dos nós verdadeiros, os quais poderiam causar a morte fetal por anóxia (O’Rahilly &

Müller, 2005). A presença de apenas uma artéria umbilical pode estar associada a uma maior incidência de malformações congênitas internas, como defeitos renais e vertebrais (Martínez-Frias, *et al.*, 2007).

A geléia de Wharton (GW), primeiramente descrita pelo anatomista Thomas Wharton em 1656, é um tecido conjuntivo especializado derivado do mesoderma extra-embrionário, onde estão imersos os vasos umbilicais (Lu, *et al.*, 2006), composto por células estromais do tipo fibroblastóide, fibras de colágeno e proteoglicanas (Kobayashi, *et al.*, 1998). A principal função da GW é prevenir a compressão e dobramento dos vasos inclusos. Esses vasos são os que promovem um fluxo sanguíneo bidirecional entre circulação fetal e materna (Can & Karahuseyinoglu, 2007).

A circulação uteroplacentária consiste na saída de sangue com baixo teor de oxigênio (venoso) do feto pelas artérias umbilicais até a placenta. Ali, o sangue segue pelos vasos coriônicos, transforma-se em sangue com maior teor de oxigênio (arterial) nos capilares das vilosidades e, saindo da placenta, retorna ao feto pela veia umbilical. Normalmente, não ocorre mistura de sangue materno e fetal (Dumm, 2006). Contudo, já foi constatada a migração celular transplacentária (Ichinohe, *et al.*, 2002).

A facilidade na obtenção de CUm possibilitou que todos os seus constituintes fossem utilizados em diversos estudos: o sangue do cordão umbilical e placentário (Charbord, *et al.*, 1996); a GW (Lu, *et al.*, 2006) e os endotélios tanto da veia (Kadivar, *et al.*, 2006) como das artérias umbilicais (Ishige, *et al.*, 2009).

1.2. Células-Tronco

1.2.1. Conceito

Todo organismo pluricelular é composto por diferentes tipos celulares. Entre os 75 trilhões de células existentes em um indivíduo adulto, são encontrados cerca de 200 tipos celulares distintos. Todos eles são derivados de células precursoras, denominadas “células-tronco” (CT) (Alberts, *et al.*, 2004).

O fascínio por estas células foi despertado inicialmente pelo alemão Theodor Schwann (1810-1882) que lançou, em 1839, as bases da teoria celular e formulou os princípios básicos da embriologia (Alberts, *et al.*, 2004). Os estudos sobre CTs se iniciaram na década de 1960. Elas foram definidas como células indiferenciadas (que não apresentavam nem especialização funcional nem marcadores de diferenciação tecido-específico); com capacidade de proliferação, auto-renovação e plasticidade (capacidade de se diferenciar em diferentes tecidos) (Marcus & Woodbury, 2008).

As CTs podem seguir dois diferentes modelos de divisão celular: o determinístico, no qual a divisão gera sempre uma CT idêntica e uma célula progenitora já comprometida com alguma linhagem específica; ou o aleatório (ou estocástico), onde algumas CTs geram somente novas CTs e outras geram apenas células progenitoras já comprometidas (Alberts, *et al.*, 2004; Knoblich, 2008) (Figura 2).

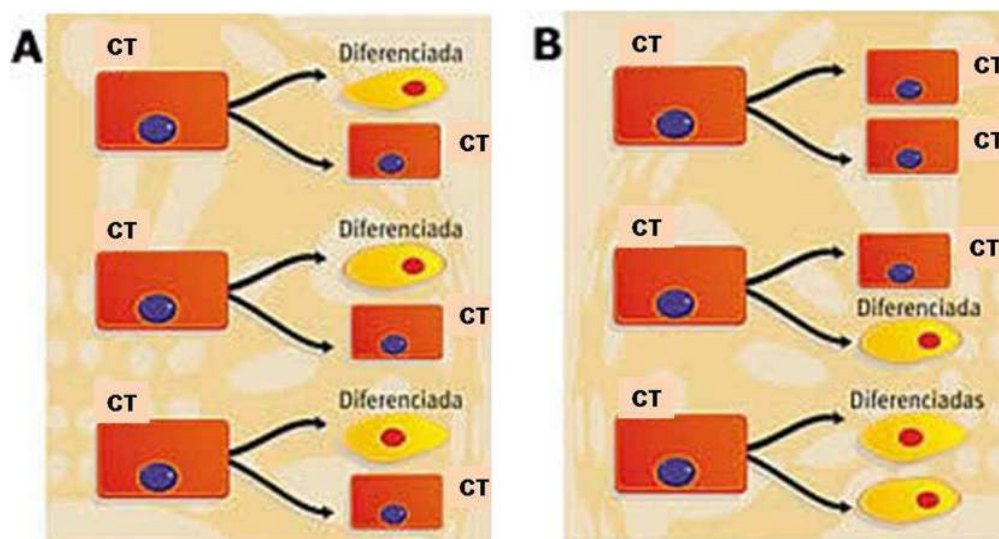


Figura 2. Modelos propostos para a divisão das células-tronco: o determinístico (A), que gera sempre uma célula-tronco e uma célula diferenciada, e o aleatório (B) em que podem ser geradas diversas combinações de células. CT: célula-tronco. Adaptado de <http://www.educacaopublica.rj.gov.br>

1.2.2. Caracterização

As CTs podem ser caracterizadas tanto em relação à plasticidade quanto à origem.

Quanto à plasticidade, a CT mais primitiva é o zigoto, formada após a fecundação do oócito e denominada de **CT totipotente**, pois é capaz de gerar tanto o embrião como os tecidos extra-embriônicos (Dawn & Bolli, 2005).

Após quatro dias, estas células totipotentes começam a se especializar formando uma massa de células esférica chamada blastocisto, que contém a massa celular interna (MCI), a partir da qual o embrião se desenvolve. A MCI do blastocisto é formada por **CTs pluripotentes**, que se diferenciam nos três folhetos embrionários: endoderma, que origina o trato gastrointestinal e os pulmões; mesoderma, que origina os músculos, ossos, sangue e sistema urogenital; e

ectoderma, que origina os tecidos epidermais e sistema nervoso. As CTs pluripotentes não são capazes de originar a placenta e os tecidos que sustentam a gestação (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981).

A maioria dos tecidos do organismo adulto possui **CTs multipotentes**, ou seja, capazes de produzir uma limitada variedade de linhagens celulares diferenciadas de acordo com a sua localização (Alison, *et al.*, 2002; Lovell & Mathur, 2004). Estão distribuídas pelo organismo em nichos e acredita-se que atuem nos mecanismos de reparo do tecido onde estão localizadas (Alberts, *et al.*, 2004). Suas principais funções são manter a homeostase do tecido e substituir, seguindo os limites de regeneração de cada tecido, as células especializadas mortas por envelhecimento, lesão ou doença (Leblond, 1964).

Por último, na hierarquia da plasticidade de CTs temos as chamadas **células unipotentes** (ou progenitoras comprometidas), capazes de originar um único tipo celular específico como, por exemplo, as CTs constituintes da camada basal da epiderme, que originam somente as células escamosas queratinizadas da pele (Lovell & Mathur, 2004). Estas progenitoras comprometidas originam células com capacidade de auto-renovação limitada e com elevada taxa de proliferação. Estas células se dividem originando células diferenciadas, que perdem a sua capacidade de proliferação e mais tarde evoluem para um processo de morte celular programada (Alison, *et al.*, 2002) (Figura 3).

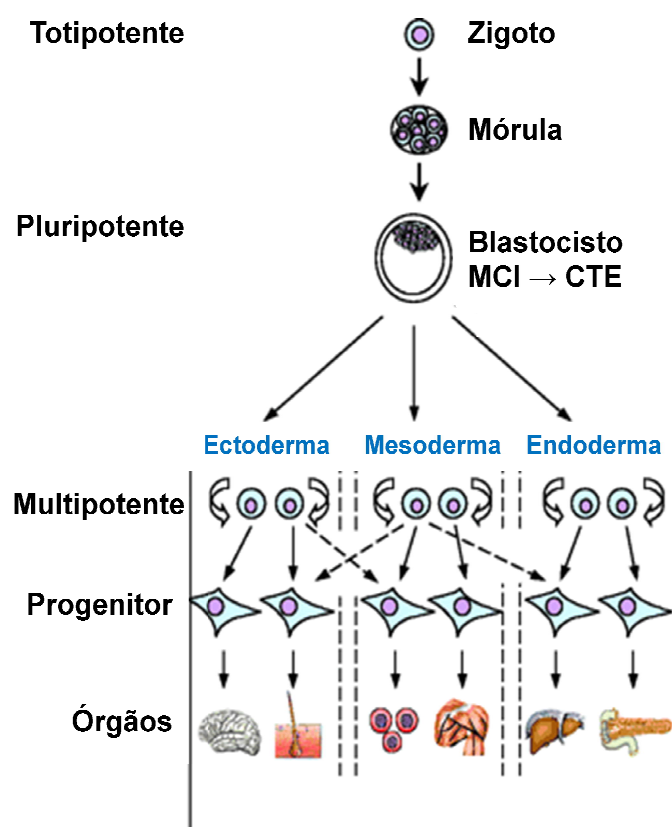


Figura 3. Hierarquia quanto à plasticidade de células-tronco (Adaptado de Boheler, *et al.*, 2002).

Com relação à origem, as células-tronco podem ser divididas em células-tronco embrionárias (CTEs), células-tronco adultas (CTAs) e células-tronco fetais (CTF)

As células-tronco embrionárias são células derivadas da massa celular interna do blastocisto de mamíferos, que podem proliferar indefinidamente e são capazes de preservar, também *in vitro*, sua pluripotencialidade (Junying & Thomson, 2008).

A primeira CTE foi isolada na década de 1980, a partir de embriões de camundongos (Evans & Kaufman, 1981). Em meados de 1990, linhagens de CTEs foram obtidas de dois primatas não humanos: o macaco Rhesus e o Sagui

(Thomson, *et al.*, 1995, 1996). E em 1998, Thomson *et al* imortalizaram a primeira linhagem de CTE humana.

No Brasil, o uso do embrião humano foi regulamentado pela Lei de Biossegurança (Lei 11.105) de 24 de março de 2005. A primeira linhagem de CTEs humanas brasileira foi derivada pelo grupo de Pereira (comunicação oral no III Simpósio Internacional de Terapias Avançadas, Curitiba-PR, 2008).

As CTAs são células encontradas em nichos de vários tecidos do organismo adulto com a função de manter e reparar o tecido do qual elas se encontram. Alguns grupos usam o termo células-tronco somáticas em vez de CTA referindo-se ao fato de que são células do corpo do organismo.

1.2.3. Célula-tronco Adulta

Pesquisas em busca de fontes de produção de CTAs começaram há aproximadamente 50 anos. Pesquisadores encontraram na medula óssea pelo menos dois tipos de CTs. Uma população, denominada CT hematopoiéticas (CTH), formadora de todas as células sanguíneas circulantes do corpo, e uma segunda população, denominada CT mesenquimal (CTM) ou CT estromal de medula óssea (Friedenstein *et al.*, 1976).

As CTAs já foram identificadas em diversos órgãos e tecidos, incluindo, medula óssea, sangue periférico, músculo esquelético, pele, dente, intestino, fígado, epitélio do ovário e testículos, entre outros (Chuliá & Noda, 2009).

Nos últimos anos houve um aumento exponencial no número de trabalhos publicados sobre CTs. Este crescimento contou com o auxílio, em especial, das

CTEs particularmente após os trabalhos de Thomson *et al* (1998) que derivaram a primeira linhagem de CTEs humanas. No entanto, as CTAs também contribuíram para este crescimento, pois as mesmas têm sido o foco da maioria das pesquisas com CTs na última década (Tabela 2) (Meirelles, *et al.*, 2008).

Ano	CT	CTE	CTH	CTM
1997	1990	193	407	16
1998	2164	213	412	23
1999	2486	210	487	40
2000	2905	254	591	60
2001	3417	336	680	79
2002	4156	438	945	148
2003	4715	505	1027	270
2004	5605	736	1082	411
2005	6803	950	1330	697
2006	7676	1210	1332	890

Tabela 1. Número de artigos publicados com o termo célula-tronco no período de 10 anos (1997-2006). CT, célula-tronco, CTE, célula-tronco embrionária, CTH, célula-tronco hematopoiética, CTM, célula-tronco mesenquimal. (Adaptado de Meirelles, *et al.*, 2008)

Pesquisas com CTAs têm despertado grande interesse no meio científico, pois elas foram encontradas em tecidos que, pelos conceitos anteriormente postulados, não as deveriam possuir, tais como os tecidos cardíaco e nervoso. (Joggerst & Hatzopoulos, 2009; Kosztowski, *et al.*, 2009).

Diante dessas perspectivas, algumas CTAs já vêm sendo utilizadas em ensaios clínicos como, por exemplo, as células-tronco presentes na medula óssea, no sangue de cordão umbilical e no tecido adiposo (www.nih.gov).

O maior número de artigos publicados, no período de 1997 a 2006, com o termo célula-tronco refere-se às CTAs, principalmente as CTH que apresentam um crescimento linear possivelmente pelo fato de este tipo de CT ser o mais bem

estudado até o momento. As CTM, em função de suas características peculiares apresentam-se em destaque, com um crescimento exponencial que será mantido até que essas características sejam completamente elucidadas (Tabela 1) (Meirelles, *et al.*, 2008)

A origem das CTAs em alguns tecidos maduros e as suas funções ainda estão sob investigação (www.nih.gov), além de sua plasticidade não ser um consenso entre os pesquisadores. Bjornson *et al.* (1999) propuseram que as CTAs não são multipotentes, mas sim pluripotentes, como as embrionárias. Essa hipótese prevaleceu até 2002 quando Wagers *et al.* (2002), usando CTAs hematopoiéticas, comprovaram a multipotencialidade dessas células.

As CTAs são, hoje, consideradas células multipotentes com diferenciação restrita ou dirigida e uma menor capacidade de proliferação quando comparadas às embrionárias, o que torna remota a possibilidade de formação de tumores quando infundidas em pacientes.

Atualmente, a principal fonte de CTA, tanto para CTHs como para CTMs é a medula óssea.

A medula óssea é um órgão difuso, mas volumoso e muito ativo, localizado no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos. É a fonte de todas as células sanguíneas circulantes do organismo. Durante o desenvolvimento fetal, a geração de todas as células sanguíneas ocorre inicialmente em ilhotas sanguíneas do saco vitelino e do mesênquima paraaórtico e depois no fígado e posteriormente no baço, medula óssea e linfonodos (Moore & Persaud, 2008). Um indivíduo adulto normal produz aproximadamente 2,5 bilhões de eritrócitos, 2,5 bilhões de plaquetas e 1,0 bilhão de granulócitos por

quilograma de seu peso corporal por dia. Esta produção é ajustada com grande precisão às necessidades do organismo (Junqueira & Carneiro 2004).

Como todo tecido hematopoiético, a medula óssea é constituída por células reticulares esponjosas, associadas a fibras reticulares e percorrida por inúmeros capilares sinusóides. Entre as células reticulares há um número variável de células: macrófagos, células adiposas, fibroblastos do estroma, células precursoras dos eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e células-tronco indiferenciadas (Junqueira & Carneiro, 2004).

A primeira e mais bem caracterizada população de células-tronco encontrada na medula compreende as células-tronco hematopoiéticas (CTH), responsáveis pela produção de todas as células sanguíneas. A segunda população, chamada de células-tronco mesenquimais (CTM), são células estromais não hematopoiéticas, extremamente raras em condições fisiológicas, na medula óssea (constituem 0,001 – 0,01% do total da população celular) (Sordi, *et al.*, 2005).

1.2.4. Células-tronco hematopoiéticas

As CTAs que originam as células do sangue são denominadas células-tronco hematopoiéticas (CTHs), e podem ser isoladas da medula óssea, do sangue periférico ou ainda do sangue de cordão umbilical e placentário (Parody, *et al.*, 2006).

As CTHs são células com grande capacidade de autorenovação e potencial proliferativo, possibilitando a diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens sanguíneas e a reconstituição da população hematopoiética a partir de

uma única célula. Podem ser mobilizadas da medula para a circulação periférica mediante estímulos específicos e ainda controlam mecanismos de apoptose, mantendo, desta forma, um equilíbrio entre geração e morte destas células. Constituem de 0,05% a 0,1% da população celular presente na medula óssea humana e nas células hematopoiéticas circulantes (Moore & Quesenberry, 2003).

McCulloch e Till (1960) realizaram o primeiro estudo quantitativo *in vivo* e demonstraram que um único precursor celular existente na medula óssea de um animal adulto era capaz de se autorenovar e de se diferenciar em múltiplas linhagens.

As CTH podem ser caracterizadas pelo seu fenótipo que inclui: a expressão dos antígenos CD34 e CD90 e ausência de CD38. O antígeno CD34 funciona como uma molécula de adesão das células hematopoiéticas ao microambiente da medula e o CD90 ou Thy-1 parece estar envolvido na sinalização da transdução gênica (Humeau *et al.*, 1996).

Apesar de ser a fonte de CT mais utilizada atualmente, a CTH de medula óssea apresenta algumas limitações. O aspirado medular é obtido por método invasivo, e apresenta problemas relacionados à compatibilidade de doadores (Sivaprakasam *et al.*, 2007). O processo de encontrar doadores que tenham antígenos de histocompatibilidade compatíveis com pacientes que precisam de transplante de medula é frequentemente um desafio de magnitude significativa. Além disso, a doença enxerto versus hospedeiro (DEVH) é a principal causa de morbi-mortalidade pós-transplante. A DEVH ocorre como uma rejeição inversa: células imunocompetentes presentes no enxerto reconhecem imunologicamente moléculas do hospedeiro como estranhas, em seus diferentes órgãos e tecidos, e deflagram uma resposta citotóxica contra os mesmos (Cohen & Nagler, 2004).

Devido a estes fatores, buscou-se uma nova fonte de CT onde as células fossem enriquecidas com elementos mais primitivos do que as CTH de medula óssea, apresentando um fenótipo imune imaturo e levando a uma menor frequência da DEVH.

1.2.5. Células-tronco mesenquimais

A presença de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea foi observada há cerca de 130 anos pelo patologista alemão Julius Friedrich Cohnheim. Em seu trabalho ele sugeriu que a medula óssea poderia ser fonte de fibroblastos que depositam fibras colágenas como parte do processo normal de cicatrização (Wohlgemuth & Borte, 1989).

As CTMs foram descritas primeiramente por Friedenstein *et al.* (1976), como células não-hematopoiéticas obtidas da medula óssea. Javazon *et al.* (2001), trabalhando com células estromais da medula óssea de ratos e constataram que as CTMs eram aderentes a placas de cultura, se assemelhavam a fibroblastos “*in vitro*” e formavam colônias. São classificadas como CTs multipotentes, podem ser encontradas em diversos órgãos e tecidos, como medula óssea, tecido adiposo, dente, cordão umbilical, cérebro, músculo esquelético, coração, intestino, vasos sanguíneos e pele, entre outros. Apresentam grande plasticidade podendo se diferenciar tanto em células de origem mesodermal, como adipócitos, condrócitos ou osteócitos, e supostamente também, *in vitro*, em células de origem não-mesodermal, como neurônios e astrócitos (Goodwin *et al.*, 2001; Kern *et al.*, 2006; De Coppi *et al.*, 2007; Karahuseyinoglu *et al.*, 2007; Meirelles & Nardi 2009).

As CTMs encontradas no ambiente medular, em condições fisiológicas, são raras, constituindo cerca de 0,001 a 0,01% do total da população celular. As CTMs são células-tronco não hematopoiéticas, multipotentes que aderem às placas de cultura (Hung *et al.*, 2002). Possuem a capacidade de se renovar e de se diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo e estroma medular (Campagnoli *et al.*, 2001).

Objetivando uniformizar os achados científicos relacionados às células estromais aderentes derivadas de medula óssea, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT do inglês *International Society for Cellular Therapy*) classifica tais células como CTMs quando atendidos os seguintes critérios (Dominici *et al.*, 2006):

1. Aderência às placas de cultura *in vitro*, quando cultivadas em condições adequadas;
2. Expressão de antígenos específicos em sua superfície, apresentando expressão de CD105, CD73 e CD90 mensurados por citometria de fluxo e ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (menor ou igual a 2%).
3. Diferenciação *in vitro* em osteoblasto, adipócito e condroblasto.

Apesar de a medula óssea ser, atualmente, a principal fonte de CTMs (Deans & Mosely, 2000), sua obtenção apresenta algumas limitações, dentre elas, o método de coleta, o qual é doloroso e invasivo. Além disso, a quantidade, a capacidade proliferativa e a capacidade regenerativa das células da medula óssea

decrecem com a idade do doador e/ou com a presença de doenças crônicas associadas (Rao & Mattson, 2001).

Diversos resultados obtidos com a utilização das CTMs de medula óssea para a terapia celular ainda são controversos. Olivares *et al.* (2004) demonstraram que animais tratados com CTMs, 4 semanas após serem submetidos ao infarto agudo do miocárdio, obtiveram uma melhora funcional significativa em relação àqueles tratados apenas com o veículo. Em contrapartida, Carvalho *et al.* (2008) não observaram melhora significativa nos ensaios *in vivo* utilizando CTMs para o tratamento de animais com lesão hepática crônica. Estes resultados divergentes indicam a necessidade de se realizar mais estudos para justificar o uso das CTMs de medula óssea na prática clínica.

Desta forma, a busca por fontes alternativas de CTMs é promissora no campo científico, principalmente, a busca por tecidos que contenham células com alto potencial proliferativo, capacidade de se diferenciar em diversas linhagens e baixo risco de contaminação viral.

1.2.6. Células-tronco Fetais

As células-tronco obtidas do líquido amniótico, placenta, membrana amniótica, cordão umbilical e sangue de cordão umbilical e placentário, denominadas células-tronco fetais (CTF), ainda não apresentam uma classificação definida quanto à plasticidade. Elas apresentam características intermediárias entre as células multipotentes e pluripotentes e compreendem uma ampla e nova classe de células-tronco (Pappa & Anagnou, 2009).

A primeira CTF isolada foi a CTH do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) na década de 1980. Entretanto, apenas na última década foram encontradas CTFs no líquido amniótico (Prusa *et al.*, 2003), membrana amniótica (Miki *et al.*, 2005), placenta (Fukuchi *et al.*, 2004) e cordão umbilical (Romanov *et al.*, 2003) (Figura 4).

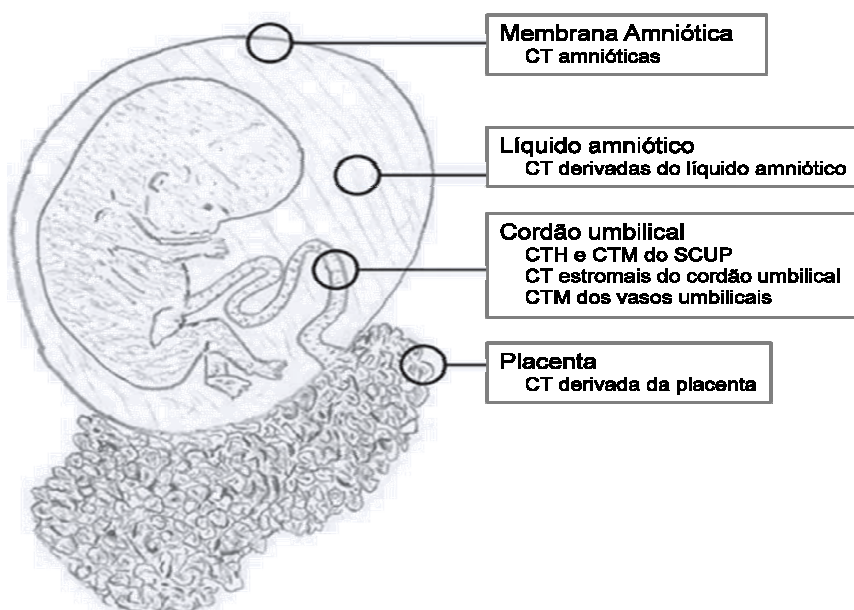


Figura 4. Fontes de Células-tronco fetais. As células-tronco foram isoladas dos tecidos extra-embrionários, incluindo membrana amniótica, líquido amniótico, cordão umbilical e placenta. CT (célula-tronco), CTH (célula-tronco hematopoiética), CTM (célula-tronco mesenquimal), SCUP (Sangue de cordão umbilical e placentário). (Adaptado de Marcus & Woodbury, 2008)

Os tecidos extra-embrionários são de fácil acesso, descartados após o parto e não necessitam de técnicas invasivas para a obtenção das CTF. Estas CT exibem morfologia similar às CTM, alto potencial proliferativo, se diferenciam em diversos tipos celulares, apresentam expressão de fatores de transcrição encontrados em CTEs e, além disso, não são capazes de gerar teratomas (Pappa & Anagnou, 2009).

As CTF do líquido amniótico foram primeiramente isoladas de uma pequena amostra de líquido proveniente de amniocentese, procedimento diagnóstico pré-natal para detectar distúrbios genéticos. A população presente no líquido amniótico é heterogênea, derivada dos 3 folhetos embrionários. As células aderentes ao frasco de cultura expressam antígenos de superfície como CD90, CD105, CD73, CD29 e CD166 e são capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos, características estas presentes em CTM (Prusa *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2004; Perin *et al.*, 2008). Além disso, diversos grupos de pesquisa demonstraram a expressão de marcadores de pluripotencialidade principalmente Oct-4 e SSEA-4 nas CT derivadas do líquido amniótico (Prusa *et al.*, 2003).

A membrana amniótica ou âmnion reveste todo o saco gestacional (Figura 4). É derivada do epiblasto do embrião e é uma estrutura avascular formada por 3 camadas celulares (Miki *et al.*, 2003). Nela são encontradas as CT epiteliais amnióticas, da camada mais interna, que apresentam morfologia epitelial *in vitro*, e as CT estromais amnióticas, da camada mais externa e, *in vitro*, apresentam morfologia fibroblastóide e capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (Tamagawa *et al.*, 2007; Marcus *et al.*, 2008). Estes dois tipos celulares expressam antígenos de superfície presentes em CTM e nas CT epiteliais amnióticas foi descrita a expressão de moléculas encontradas em células pluripotentes (SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-80, Nanog, Sox2, Oct-4 e Rex1) (Miki *et al.*, 2005)

A placenta é um órgão fetomaterno, constituído por uma porção fetal (originada do saco coriônico) e uma porção materna (derivada do endométrio) e juntamente com o cordão umbilical funciona como um sistema de transporte entre a mãe e o feto (Moore & Persaud, 2008). As CT derivadas da placenta

apresentam morfologia fibroblastóide, possuem alta capacidade proliferativa, expressam diversos antígenos de superfície (CD90, CD73, CD105, CD29, CD44) e são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares, características estas, de células multipotentes (Yen *et al.*, 2005; Chien *et al.*, 2006). Além disso, expressam SSEA-4, Oct-4, Stro-1, TRA-1-80 e Rex1, fatores de transcrição presentes em células pluripotentes (Battula *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

Sangue de Cordão Umbilical e Placentário:

O Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (SCUP) não recebeu atenção suficiente até as décadas de 70 e 80, provavelmente por se tratar de material desprezado, juntamente com o cordão umbilical e a placenta, descartados após o nascimento.

Nakahata e Ogawa (1982) foram os primeiros a relatarem a presença de progenitores hematopoiéticos no SCUP. Os autores constataram a capacidade destas células de formarem colônias após 25 dias em meio de cultura apropriado e com habilidade de gerar colônias secundárias (Nakahata & Ogawa, 1982).

Broxmeyer *et al.* (1989; 1990) sugeriram a utilização do SCUP como fonte alternativa para uso clínico no transplante de células-tronco e progenitoras hematopoiéticas. Inicialmente foram realizados transplantes entre pessoas da mesma família, normalmente entre irmãos (Gluckman *et al.*, 1989). Wagner *et al.* (1992) relataram a utilização de SCUP como fonte de CTH no tratamento de leucemia.

Reconhecidamente, o uso do SCUP cresceu dramaticamente em transplantes alogênicos, suprimindo a carência de doadores de CTH para pacientes

que não encontram parentes compatíveis imunogeneticamente. Para tanto, foi de fundamental importância o estabelecimento de Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP). O primeiro banco, e com maior acervo, é o BSCUP de Nova Iorque (Rubinstein *et al.*, 1993). A partir dele, vários programas semelhantes se desenvolveram, tanto na América do Norte quanto na Europa (EUROCORD) (Gluckman & Rocha 2004; 2005), inclusive com a criação de redes internacionais de cooperação, contribuindo para a normatização de procedimentos e a uniformização de resultados (NETCORD) (Hakenberg *et al.*, 1998).

No Brasil, em 2000, o Ministério da Saúde, através da Portaria nº 903/GM criou, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), BSCUP, inaugurado em 2001 no Instituto Nacional do Câncer (INCA). Este tipo de banco é o primeiro no Brasil, público e universal, com o intuito de aumentar as chances de localização de doadores para pacientes que necessitam de transplante de medula óssea. Em 2004, também o Ministério da Saúde criou a Rede Nacional de Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BrasilCord) para Transplantes de Células-Tronco Hematopoiéticas sob a coordenação do INCA (INCA 2008). Neste mesmo ano, o primeiro transplante de células-tronco hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical, utilizando células do BrasilCord, foi realizado em uma criança com leucemia linfoblástica aguda (INCA 2008).

Apesar do sucesso dos transplantes de CTHs, tanto de medula óssea como de SCUP para o tratamento de diversas doenças como leucemia e linfoma, desordens sanguíneas hereditárias, recuperação da medula pós quimioterapia, e DEVH, os estudos para o tratamento de outras doenças de caráter não imune e/ou hematológico ainda são controversos.

Além do notório uso do SCUP como fonte de CTH, muitos estudos trabalham com a hipótese do SCUP ser também uma fonte de CTMs. Essa afirmação ainda é bastante controversa, pois enquanto para alguns pesquisadores é grande a dificuldade de isolar as células mesenquimais (Mareschi *et al.*, 2001; Wexler *et al.*, 2003), outros obtiveram sucesso neste procedimento (Erices *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2001; Kogler *et al.*, 2004, 2006).

Uma pequena população de células mononucleares derivadas do SCUP exibe fenótipo do tipo mesenquimal, com morfologia fibroblastóide e expressa antígenos específicos, similarmente às CTM de medula óssea (Erices *et al.* 2000). Apesar de circularem no sangue fetal simultaneamente com os precursores hematopoiéticos (Campagnoli *et al.*, 2001), as CTMs de SCUP são mais difíceis de serem isoladas e cultivadas (Mareschi *et al.*, 2001).

Células mononucleares derivadas do SCUP quando cultivadas e selecionadas pela adesão ao plástico exibem fenótipo mesenquimal e, quando mantidas em cultura, apresentam morfologia fibroblastóide e expressa um fenótipo específico com CD45-, CD34-, CD133-, CD117-, CD14-, CD31-, CD13+, CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD9+, CD49e+ e, CD54+, sugerindo serem ricas em progenitores mesenquimais (Erices *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007; van de Ven *et al.*, 2007). Estas células possuem a capacidade de se diferenciarem em osteócitos, adipócitos e condrócitos (Lee, *et al.*, 2004) e supostamente em neurônios (Hou, *et al.*, 2003), hepatócitos (Kang, *et al.*, 2006), células musculares (Jazedje, *et al.*, 2009) e cardiomiócitos (Ma, *et al.*, 2006).

Algumas terapias com células do SCUP estão sendo testadas tanto em modelos animais quanto humanos. Kim *et al.* (2005), trabalhando com porcos

submetidos ao infarto agudo do miocárdio, demonstraram melhora na função cardíaca e diminuição do tamanho do infarto um mês após o tratamento com células mesenquimais do SCUP humano. Os autores encontraram as CTMs humanas no miocárdio dos animais infartados e observaram que estas células expressavam proteínas específicas de cardiomiócitos, como troponina I e miosina de cadeia pesada. Estes dados sugerem que o transplante das células mesenquimais do SCUP pode ser eficaz no processo de cardiomioplastia celular (Kim *et al.*, 2005).

Recentemente, Pimentel-Coelho *et al.* (2009) demonstraram que células mononucleares do SCUP humanas, quando injetadas após 3 horas de injúria, melhoraram a performance em dois reflexos motores que haviam sido prejudicados por isquemia hipóxica cerebral. Apesar deste resultado, poucas células do SCUP humano foram encontradas no cérebro dos animais tratados.

Por outro lado, dados do nosso laboratório demonstraram que as células mononucleares do SCUP humano congeladas ou não congeladas, foram incapazes de prevenir o remodelamento cardíaco ou de melhorar a função cardiovascular de ratos em um modelo de infarto do miocárdio (Pinho-Ribeiro, *et al.*, 2010).

Um ensaio clínico randomizado utilizando células mesenquimais de SCUP está em andamento com o objetivo de avaliar a segurança e a eficácia das CTMs do SCUP na prevenção da rejeição ao enxerto e da DEVH após o transplante de CTHs em crianças e adolescentes com leucemia aguda (Clinical Trials, NIH, 2009).

Apesar das CTMs do SCUP serem clinicamente viáveis, há algumas limitações: o baixo número de células para transplante (Gluckman & Rocha, 2006), dificuldades na obtenção e no isolamento (Mareschi, *et al.*, 2001; Wexler, *et al.*, 2003), e a sua redução ao longo da gestação (Campagnoli, *et al.*, 2001).

Dessa forma, constata-se que as pesquisas com CTM de sangue de cordão umbilical e seu potencial terapêutico ainda são controversas e é grande a busca de outras fontes de CTMs.

Cordão Umbilical:

A presença de células mesenquimais no CUM não era consensual. Kadner *et al.* (2002) e Romanov *et al.* (2003) identificaram células mesenquimais utilizando a geléia de Wharton e a região subendotelial dos vasos do cordão umbilical isolando daí células fibroblastóides, com características similares à CTMs.

As células obtidas a partir da GW, denominadas por alguns autores como células estromais (Can & Karahuseyinoglu, 2007) e a partir dos vasos umbilicais, apresentam características imunofenotípicas semelhantes às CTMs (CD105+, CD73+, CD90+ CD13+, CD29+, CD44+, CD106+, CD166+, CD45-, CD34-, HLA-DR- CD14-, CD38-, e CD31-), com morfologia fibroblastóide e capacidade de autorenovação (Covas *et al.*, 2003; Lu *et al.* 2006; Qiao *et al.* 2007; Karahuseyinoglu *et al.*, 2007). Podem se diferenciar em condrócitos, osteócitos, adipócitos (Sarugaser *et al.*, 2005; Karahuseyinoglu *et al.*, 2007), e supostamente em cardiomiócitos (Wang *et al.*, 2004; Kadivar *et al.*, 2006), neurônios e glia (Mitchell *et al.*, 2003).

Além disso, as células do CUM são capazes de produzir citocinas similares às CT de medula óssea, fatores estimuladores de colônias de granulócitos e de macrófagos (Lu, *et al.*, 2006) e maior número de passagens para alcançar senescência (Kim, *et al.*, 2005; Baksh, *et al.*, 2007; Karahuseyinoglu, *et al.*, 2007; Troyer & Weiss 2008).

Kadner *et al.* (2002), investigaram o uso de células do CUM, particularmente da GW, como uma fonte alternativa para engenharia tecidual cardiovascular. Os autores observaram que as células isoladas apresentaram morfologia fibroblastóide, crescimento celular maior quando comparadas com células miofibroblásticas vasculares e expressaram alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina, concluindo que a GW constituía uma possível e promissora fonte alternativa para a engenharia tecidual cardiovascular.

Romanov *et al.* (2003), utilizando células dos vasos do CUM observaram que esta possível nova fonte de CTMs apresentava elementos formadores de colônias fibroblastóides, eram facilmente expandidas em cultura, expressavam alfa-actina de músculo liso e vários marcadores de células mesenquimais, além de serem capazes de se diferenciar em linhagens adipogênicas e osteogênicas.

Estas células além de apresentarem características de CTM, também são capazes de expressar fatores transcricionais presentes em CTEs, como OCT-4, Nanog, Sox2 e TRA-1-60 (Carlin *et al.*, 2006; Hoynowski *et al.*, 2007; Jomura, 2007).

Experimentos com modelos animais de doença de Parkinson apresentaram melhora após transplante de CTMs indiferenciadas da GW (Weiss *et al.*, 2006). A administração de células da GW nos olhos de animais com doenças na retina,

resultaram, por meio de análise morfológica, em melhora na recuperação de fotoreceptores e aumento na produção de fatores neurotróficos derivados do cérebro e fatores de crescimento de fibroblastos (Lund *et al.*, 2007).

CTs derivadas da GW atuaram na melhora da função cardíaca em modelos de infarto em ratos, com melhora na densidade arteriolar e capilar, secreção de fatores angiogênicos e prevenção da apoptose (Wu *et al.*, 2007).

Estes resultados promissores na medicina regenerativa demonstram que estas células podem ser usadas no futuro como uma fonte alternativa de CTMs, tanto para transplantes autólogos quanto alogênicos. Além da fácil obtenção, estas células parecem ser eficientes para os propósitos terapêuticos.

Uma das grandes vantagens do uso do CUm como um todo (segmento e sangue) é o fato de ser um material que será descartado após o nascimento, não causa risco ao doador, não envolve questões éticas e, principalmente, para sua obtenção, não é necessário uma metodologia invasiva (Murohara *et al.*, 2000; Romanov *et al.*, 2003; Panepucci *et al.*, 2004; Can & Karahuseyinoglu, 2007).

Por todas estas características o CUm apresenta-se como uma promissora fonte de células-tronco apesar de serem necessários, ainda, estudos que caracterizem melhor este tipo celular proveniente tanto dos vasos umbilicais quanto da geléia de Wharton.

Apesar do SCUP ser, atualmente, uma das fontes mais utilizadas para obtenção de células-tronco no tratamento de doenças hematológicas em crianças e adultos, o uso de células-tronco derivadas do cordão umbilical em outras doenças é ainda bastante limitado. Dessa forma, este estudo tentará identificar

nos componentes do cordão umbilical, vasos e geléia de Wharton, fontes alternativas de CTMs que possam vir a ser utilizadas em terapias específicas.

2. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de busca por novas fontes de CTMs e que o cordão umbilical é uma fonte alternativa de fácil obtenção de CTM, temos como objetivo geral estudar as células obtidas a partir da digestão enzimática da artéria umbilical (AU), veia umbilical (VU) e geléia de Wharton (GW).

Os objetivos específicos são:

- Isolar as células das três fontes do cordão umbilical;
- Caracterizar por meio de citometria de fluxo as células em cultura de AU, VU e GW;
- Caracterizar por RT-PCR, a presença de transcritos para genes de pluripotência;
- Avaliar por imunofluorescência a expressão de proteínas tecido-específicas;
- Avaliar a capacidade de diferenciação das células de AU, VU e GW *in vitro*;
- Analisar a proliferação celular em AU, VU e GW;
- Comparar as células obtidas das três regiões do CUm.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Obtenção do cordão umbilical*

Os CUMs (n=42) foram coletados após o parto, na Clínica Perinatal de Laranjeiras juntamente com a placenta e processados, em ambiente estéril, entre 1-12 horas após o parto. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Clínica Perinatal Laranjeiras e todas as doadoras assinaram termo de consentimento.

3.2. *Isolamento das Células obtidas do Cordão umbilical*

Para a obtenção das CTM do endotélio dos vasos do CUM utilizamos a separação das 3 partes do cordão umbilical (veia + artérias + geléia de Wharton), método modificado de Sarugaser *et al.* (2005), conforme descrição abaixo:

O CUM foi separado da placenta, em fluxo laminar, com auxílio de tesoura, lavado em solução de salina tampão fosfato (PBS) para retirada de sangue, fracionado em pedaços de aproximadamente 5cm de comprimento, lavado novamente em PBS. Em placa de Petri grande (150x20mm), com o auxílio das pinças dente de rato foram separadas a veia umbilical (VU), as 2 artérias umbilicais (AU) e a GW. Cada parte foi lavada em PBS novamente e colocada em placas de Petri pequenas (60x15mm).

Após dissecação a VU, AU e GW, foram fracionadas em pequenos pedaços, de aproximadamente 2mm com auxílio de bisturi e colocadas em Erlenmeyers, com tampa, previamente identificados. Em cada frasco foi adicionado PBS

contendo Colagenase tipo II (200U/mL) (Worthington), solução final de 0,4% e acrescentado, em seguida, penicilina e estreptomicina (0,5%) (Sigma Aldrich).

Os Erlenmeyers foram deixados sob agitação gentil, durante a noite, a 37°C, em incubadora de bancada, para digestão enzimática.

No dia seguinte, o material, completamente digerido, foi transferido para tubos cônicos de 50mL, respeitando a proporção de 20mL de material digerido e 20mL de PBS. O material foi centrifugado a 1500xg por 15 minutos, descartado o sobrenadante, o precipitado obtido foi ressuspensionado em 50mL de PBS e centrifugado novamente a 540xg por 15 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi ressuspensionado em meio de cultura DMEM-Low Glicose (LGC Biotecnologia), acrescido de 15% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma Aldrich), 10ng/mL de β -FGF (Peprotech) e 61,47g/L de Glutathione (Sigma Aldrich).

O precipitado foi plaqueado em frascos de cultura de 25 cm² previamente identificados, contendo 5mL de meio de cultura e mantido em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂.

Após 7 dias o sobrenadante foi retirado, as células aderidas foram lavadas com PBS, para remoção de debris celulares e colocado meio novo.

Ao atingirem 80-90% de confluência, as células foram retiradas do frasco de cultura por digestão enzimática com Tripsina 0,25% EDTA e expandidas até atingirem a terceira passagem, quando os experimentos foram realizados.

3.3. Caracterização por Citometria de Fluxo

Após atingirem aproximadamente 90% de confluência em terceira passagem, as células da AU, VU e da GW foram removidas do frasco de cultura por digestão enzimática (tripsina 0,25% EDTA). Foi adicionado às células aproximadamente 5mL de meio para recuperação dos epítomos celulares possivelmente destruídos pela ação da tripsina. As células foram lavadas três vezes a 400xg por 3 minutos com 5 mL de PBS por lavagem.

O precipitado formado foi ressuspendido, após a terceira lavagem, em 600 µl de PBS e dividido em 5 tubos (100µL em cada um). As células foram marcados com as seguintes combinações de anticorpos (3µL de cada monoclonal) CD45-APC, CD105-FITC, CD31-FITC, CD44-FITC, CD73-PE, CD166-PE, CD133-PE, CD90-PE-CY5, CD54-PercP-CY5.5, CD117-PerCP-Cy5.5, HLA-DR-PE-CY5, CD34-PE-CY7 por 20 minutos, ao abrigo de luz, em temperatura ambiente (Tabela 2).

Tubos	FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	APC	PE-Cy7	Objetivo
1	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Ajuste de voltagem
2	CD105	CD73	—	CD117	CD45	CD34	CTM/CTH
3	CD31	CD133	—	—	CD45	CD34	Progenitor endotelial/CTH
4	CD44	CD166	—	CD54		CD34	Adesão celular
5	CD105	—	CD90	—		CD34	CTM
6	—	—	—	HLA-DR	CD45		Macrófago/célula B

Tabela 2. Anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica das células do CUM.

Após a incubação com os anticorpos monoclonais, as células foram lavadas e centrifugadas com 5 mL de PBS a 400xg por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescido 500µL de PBS em cada tubo. A aquisição das imagens foi realizada no equipamento FACSCanto (BD Biosciences) e analisadas pelo software BD FACS DIVA v.6.1.1 (BD Biosciences).

Para ajustar as voltagens do equipamento para células em cultura foi necessário realizar a aquisição de células não marcadas com anticorpos monoclonais. Este passo nos permitiu retirar o brilho proporcionado pela autofluorescência das células em cultura e ajustar a sensibilidade do equipamento para cada fotomultiplicador.

Em seguida, procedeu-se as aquisições dos tubos marcados com os anticorpos monoclonais identificando o percentual de expressão das proteínas analisadas em cada amostra.

Foram observados aspectos morfológicos (*side scatter* – SSC-A, *forward scatter* – FSC-A) e a expressão dos anticorpos para a completa caracterização das amostras.

3.4. Ensaios de diferenciação

As células das três fontes do CUM (AU, VU e GW), em segunda passagem, ao atingirem a confluência de 80-90%, foram tripsinizadas e plaqueadas com uma densidade 5×10^4 células/cm² em placa de 6 poços para os ensaios de diferenciação.

Adipogênico:

Para indução da adipogênese, as células foram cultivadas em DMEM-Low glucose suplementado com 15% SFB, 50 U/mL penicilina, 50 mg/mL estreptomicina, 5×10^{-4} M de indometacina, 10 µg/mL de insulina humana, e 10^{-7} M de dexametasona (Sigma-Aldrich).

Após 30 dias de cultivo em meio de indução, as células foram lavadas em PBS 3 vezes, fixadas em tampão fosfato e paraformaldeído 2% por 15 minutos a 37°C e tampão fosfato e paraformaldeído 4% por 20 minutos a 37°C. O fixador foi retirado e as células foram deixadas em temperatura ambiente para secar. Depois de seca, foi adicionado à placa de cultura o corante Óleo Vermelho O 0,2% (Sigma-Aldrich), capaz de corar vacúolos citoplasmáticos de lipídios, por aproximadamente 20 minutos.

O excesso de corante foi retirado e as células visualizadas em microscópio óptico.

Osteogênico

Para indução da osteogênese, as células foram cultivadas em DMEM-Low glucose suplementado com 15% SFB, 50 U/mL penicilina, 50 mg/mL estreptomicina, 10^{-6} M de dexametasona, 10^{-3} M de β -glicerofosfato e 5×10^{-7} M de ácido ascórbico (reagentes Sigma-Aldrich).

Após 21 dias de cultivo em meio de indução, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 15 minutos a 37°C e paraformaldeído 4% por 20 minutos a 37°C. O fixador foi retirado e as células foram lavadas com água destilada. Depois

de seco, foi adicionado à placa de cultura o corante Vermelho de alizarina 1% (Sigma-Aldrich) capaz de corar depósitos de cálcio.

3.4. *Estudo de proliferação celular - Population Doubling Time (PDT)*

As células de AU, VU e GW após atingirem 80-90% de confluência em segunda passagem foram removidas do frasco de cultura por digestão enzimática com Tripsina EDTA (0,25%) e 1×10^3 células foram colocadas em placas de 35 mm² contendo grades que delimitavam uma área de 4 mm² (Nalge Nunc International).

Diariamente, eram contados quatro quadrados (4mm²) aleatórios, visualizados em microscópio óptico. Após aproximadamente 6 a 10 dias quando as células atingiam a confluência máxima e era impossível distinguir as células isoladamente o experimento foi encerrado.

A partir da média do número de células contadas nos quatro quadrados diariamente foi obtido o número de células por mm² e, com isso, foi construído uma curva exponencial de crescimento celular com células/mm² no eixo das ordenadas e dias no eixo das abscissas. Essa curva exponencial foi convertida em uma reta calculando o $\log_2$ (células/mm²) e o tempo que a população leva para dobrar de tamanho (PDT) foi calculado a partir do inverso do coeficiente angular da reta obtida.

3.5. *Caracterização por RT-PCR*

Células de AU, VU e GW em terceira passagem foram analisadas quanto à expressão de genes marcadores típicos de células pluripotentes.

As seqüências dos *primers* utilizados são apresentadas na Tabela 3.

Gene	Sequência de <i>primer sense</i> Sequência de <i>primer anti-sense</i>	Pb	Principais/Possíveis funções
Oct4	AGC GAA CCA GTA TCG AGA AC TTA CAG AAC CAC ACT CGG AC	140	Mantém a pluripotência das CTE.
Sox2	AGC TAC AGC ATG ATG CAG GA GGT CAT GGA GTT GTA CTG CA	90	Mantém a auto-renovação das CTE no estágio indiferenciado
KLF4	TCT CAA GGC ACA CCT GCG AA TAG TGC CTG GTC AGT TCA TC	105	Mantém a célula em estágio de proliferação celular, formação de vasos em vertebrados
NANOG	CAG CCC CGA TTC TTC CAC CAG TCC C CGG AAG ATT CCC AGT CGG GTT CAC C	390	Auto-renovação das CTE e manutenção da pluripotência.
Dnmt3b	CAG ATC CTA AAC AGC TCG CAG AAT GCG TAC GCA AAT TAA AGT CCA GA	240	Metilação do DNA e dos promotores de Oct4
DPPA4	GGA GCC GCC TGC CCT GGA AAA TTC TTT TTC CTG ATA TTC TAT TCC CAT	400	Mantém a pluripotência das células
NODAL	GGG CAA GAG GCA CCG TCG ACA TCA GGG ACT CGG TGG GGC TGG TAA CGT TTC	235	Formação do mesoderma e da conformação axial durante desenvolvimento embrionário
TDGF	CTG CTG CCT GAA TGG GGG AAC CTG C GCC ACG AGG TGC TCA TCC ATC ACA AGG	260	Formação das células do epiblasto (mesoderma)
Rex1	CAG ATC CTA AAC AGC TCG CAG AAT GCG TAC GCA AAT TAA AGT CCA GA	300	Manutenção das células em estágios indiferenciados

Tabela 3. Sequência de primers utilizados.

Extração do RNA total

O RNA (ácido ribonucléico) total das células de UA, UV e UGW foi extraído utilizando o kit RNASpin Mini (GE) seguindo as recomendações do fabricante.

Resumidamente, 2×10^6 células de AU, VU e GW foram lisadas e homogeneizadas em tampão desnaturante e o lisado foi filtrado, centrifugado e aplicado em uma microcoluna contendo uma membrana de sílica. A coluna foi lavada 3 vezes e o RNA eluído com água RNase-free foi armazenado a -80°C .

Reação da Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa consiste na síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de um molde de RNA por uma DNA-polimerase-RNA-dependente: a transcriptase reversa.

O cDNA foi sintetizado a partir de $1\mu\text{g}$ de RNA total por reação de transcrição reversa (*High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems*), de acordo com as instruções do fabricante.

Como controle positivo, $1\mu\text{g}$ do RNA total da linhagem de células-tronco embrionária H9 gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Stevens Rehen, do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, foi reversamente transcrito nas mesmas condições. Além disso, uma amostra correspondente sem a enzima transcriptase reversa foi incluída para verificar eventuais contaminações de DNA genômico.

Ao final da reação, o cDNA foi estocado em freezer -20°C .

Reação em Cadeia da Polimerase

Dois microlitros de cada cDNA foram amplificados no termociclador Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research) em $50\mu\text{L}$ de solução contendo 1x PCR Buffer (Invitrogen), $2,5\text{ mM}$ MgCl_2 , $0,2\text{ mM}$ de trifosfato de deoxinucleosídeos (dNTP), $0,2\mu\text{M}$ do primer senso e antissenso da Tabela 3 e 1U de Platinum Taq Polimerase (Invitrogen). O programa de RT-PCR consistiu na desnaturação a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a

56°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de RT-PCR foram separados e analisados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídeo.

3.6. *Imunofluorescência*

As células, em segunda passagem, ao atingirem confluência de 80%, foram tripsinizadas, plaqueadas em lamínulas de vidro e mantidas por aproximadamente 2 dias em estufa em meio de cultura contendo meio DMEM-Low Glicose (LGC Biotecnologia), 15% de SFB (Gibco), 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma Aldrich) e 61,47g/L de Glutathione (Sigma Aldrich).

Após aproximadamente 2 dias, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se uma solução composta por PBS e paraformaldeído 4%. As placas de cultura com a solução foram mantidas a 37°C por 15 minutos para a fixação das células. Após 15 minutos, foi retirado todo o paraformaldeído e as células fixadas foram lavadas três vezes com PBS e deixadas em geladeira com 500µL de PBS em cada poço até que fosse realizada a imunofluorescência.

Para todas as proteínas avaliadas foi feito controle negativo para cada anticorpo secundário onde as células passaram por todas as etapas do protocolo, mas não foram incubadas com o anticorpo primário.

Os anticorpos primários utilizados estão listados na Tabela 4.

Anticorpo primário anti:	Feito em	Diluição
Vimentina	Camundongo	1:300
SSEA-4	Camundongo	1:100
Oct-3/4	Coelho	1:200
Troponina I cardíaca	Camundongo	1:100
Tropomiosina	Camundongo	1:200
α-actina de músculo liso	Camundongo	1:200
Fator de Von Willebrant	Coelho	1:400
PECAM-1	Camundongo	1:300

Tabela 4. Anticorpos utilizados em ensaios de imunofluorescência nas células do CUM.

Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-camundongo conjugado a Cy3 (Jackson ImmunoResearch) na diluição de 1:1000, anti-camundongo e anti-coelho conjugados a Alexa 488 (Invitrogen A-11001 e A-11008) na diluição de 1:400.

As células fixadas foram permeabilizadas com o detergente TRITON X-100 0,3%. Essa permeabilização foi realizada lavando as células três vezes por dez minutos nessa solução. Esse procedimento abre poros na membrana plasmática, facilitando o acesso do anticorpo a proteínas intracelulares. Após a permeabilização, as células foram incubadas por trinta minutos em uma solução de PBS contendo soro de burro 2%, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida foram incubadas com os anticorpos primários durante a noite à temperatura de 4°C. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de PBS contendo BSA 0,1%.

No dia seguinte as células foram lavadas três vezes com PBS por dez minutos cada, para depois serem incubadas com o anticorpo secundário correspondente por uma hora em temperatura ambiente. O anticorpo secundário também foi diluído em uma solução de PBS contendo 0,1% de BSA. A próxima etapa foi novamente uma série de três lavagens de dez minutos cada com PBS. O PBS foi retirado das lamínulas e estas foram incubadas por cinco minutos em 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), que é um corante nuclear. Antes de colar as lamínulas nas lâminas, foi colocado *Vectashield*, para reduzir o decaimento da fluorescência.

As lâminas montadas foram levadas ao microscópio de fluorescência invertido Axiovert 130 (Zeiss) acoplado a um sistema de captura de fotomicrografias digital Axiovision. O sistema estava ligado a um *software* (Axiovision 4.7) que processa as imagens obtidas.

3.7. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando-se um programa de análise estatística GraphPad Prism (versão 5.0). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($M \pm DP$). Para análise de crescimento celular foi realizada uma regressão linear. Todos os outros experimentos foram analisados pelo teste análise de variância (ANOVA) de uma via e os dados foram submetidos ao pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas significativas diferenças para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. *Cultivo das células do cordão umbilical (CUM)*

Para estabelecer o protocolo inicial do isolamento de células do CUM foram utilizados 9 cordões de um total de 42 coletados após o parto, na Clínica Perinatal de Laranjeiras, Rio de Janeiro. Os 33 cordões restantes foram usados para os experimentos descritos a seguir.

As células utilizadas neste estudo foram obtidas de três regiões do CUM: das artérias (AU), da veia (VU) e da geléia de Wharton (GW).

Após o isolamento, digestão e lavagem destas regiões do CUM obtivemos um precipitado que foi plaqueado em meio de cultura e mantido em estufa de CO₂. Para observação de possível contaminação por bactérias e/ou fungos, as culturas foram monitoradas por 24 horas. Decorrido este prazo e, não havendo contaminação, o material foi deixado em estufa de CO₂ por 7 dias para que ocorresse a aderência das células no fundo do frasco de cultura. Caso não houvesse aderência, após este período, o material era descartado. Para o início dos experimentos, no entanto, era necessário que as células apresentassem, em até 20 dias em estufa de CO₂, confluência de 80-90%. Caso contrário, também seriam descartadas.

Após estabelecimento do protocolo com os 9 cordões iniciais, processamos mais 33 CUM. Destes, 4 foram descartados após 24 horas do início do processamento, por apresentarem contaminação, 7 não aderiram e/ou atingiram a

confluência após 20 dias em estufa de CO₂ e 22 foram utilizados para os experimentos. (Figura 5).

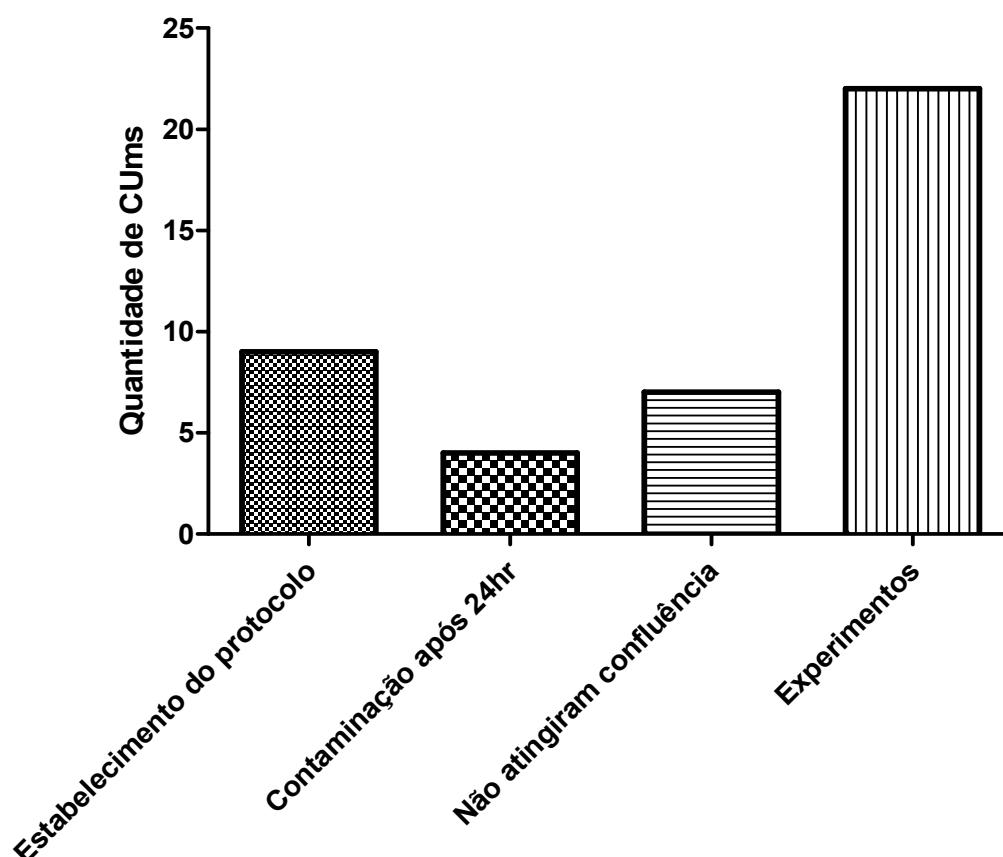


Figura 5. Cordões umbilicais processados (n=42). Nove CUMs foram utilizados para estabelecer protocolo, 4 contaminaram após 24h, 7 não atingiram confluência após 20 dias em cultura e 22 foram utilizados para realização dos experimentos.

As células das três regiões (AU, VU e GW) aderentes ao fundo da garrafa de cultura apresentaram morfologia fibroblastóide, formando morros e vales, com formato estromal (*stromal-like*), caracterizado pela morfologia alongada, semelhantes às células mesenquimais de medula óssea.

Na figura 5 podemos observar células de AU, VU e GW no 10^o dia de cultivo, aderentes ao fundo da garrafa de cultura, em passagem 0 (P0) indicadas pelas setas azuis e no 30^o dia, apresentando morfologia fibroblastóide, em passagem 3 (P3). Aderidas à superfície das células em P0, (Figura 6 A-C), podemos observar *debris* celulares, que são fragmentos de material resultante da digestão enzimática da collagenase, removidos ao longo das lavagens com PBS e das passagens, indicados pelas setas vermelhas. As células em P3 (Figura 6 D-F) não apresentavam mais esses *debris* e por isso, puderam ser utilizadas para a caracterização por citometria de fluxo, RT-PCR e imunofluorescência, assim como para os ensaios de diferenciação e crescimento celular.

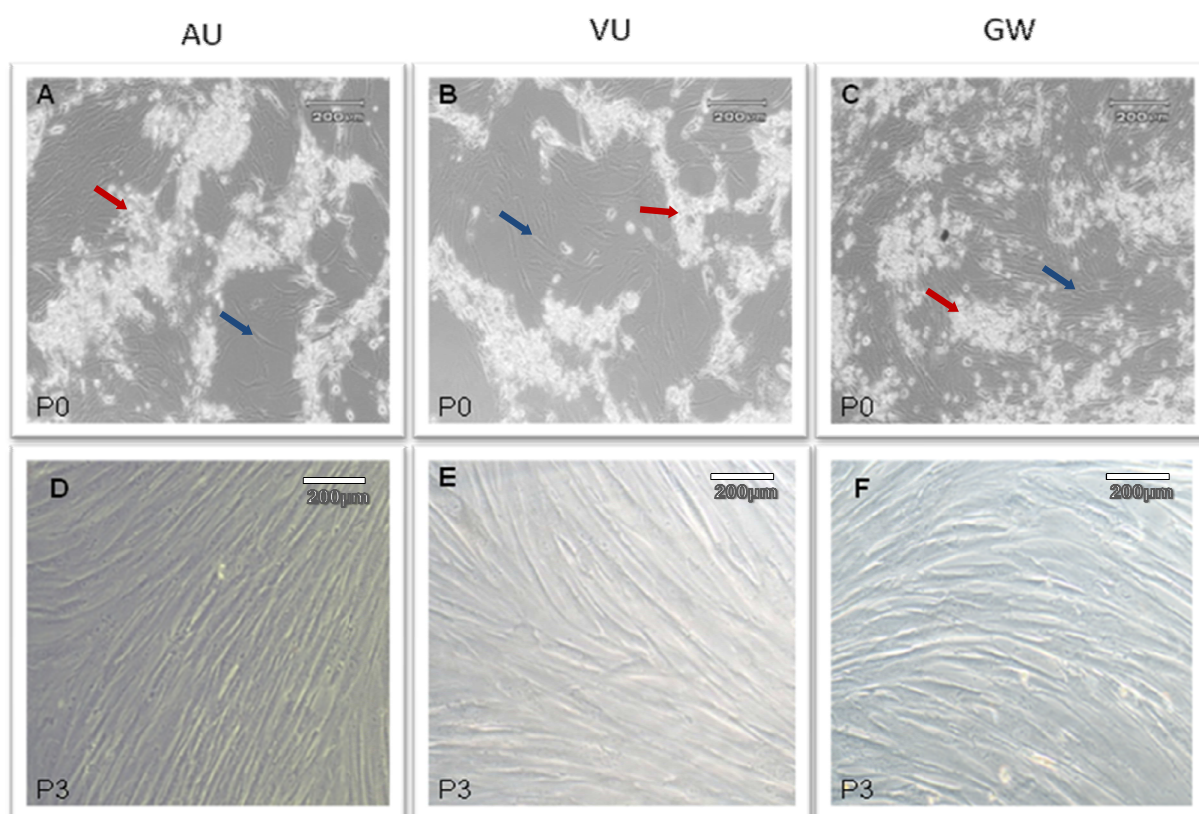


Figura 6. Cultivo de CTM de AU, VU e GW (A-C) Células aderidas à placa de cultura após 10 dias de plaqueamento indicadas pelas setas azuis. Setas vermelhas indicam *debris* celulares. (D-F) Células em terceira passagem, confluentes após 30 dias.

4.2. Ensaios de Diferenciação

A capacidade de diferenciação das células de AU, VU e GW foi avaliada segundo os critérios de classificação de uma célula-tronco mesenquimal de medula óssea humana, definidos pela ISCT.

Para isso, três amostras de cada região do cordão umbilical (AU, VU e GW) foram submetidas a indução adipogênica e osteogênica. Após 30 dias de indução adipogênica e 21 dias de indução osteogênica, todas as culturas apresentaram vacúolos de gordura no citoplasma e deposição de cálcio, respectivamente.

A Figura 7 ilustra as imagens representativas dos experimentos de diferenciação osteogênica. As células cultivadas durante 21 dias em meio de cultivo basal (controle) estão representadas na Figura 7 (linha A) enquanto a Figura 7 (linha B) e Figura 6C ilustram células coradas com vermelho de alizarina. Este corante tem afinidade por cálcio, sugerindo que tais células, assim como os osteócitos, possuem maior capacidade em depositar cálcio.

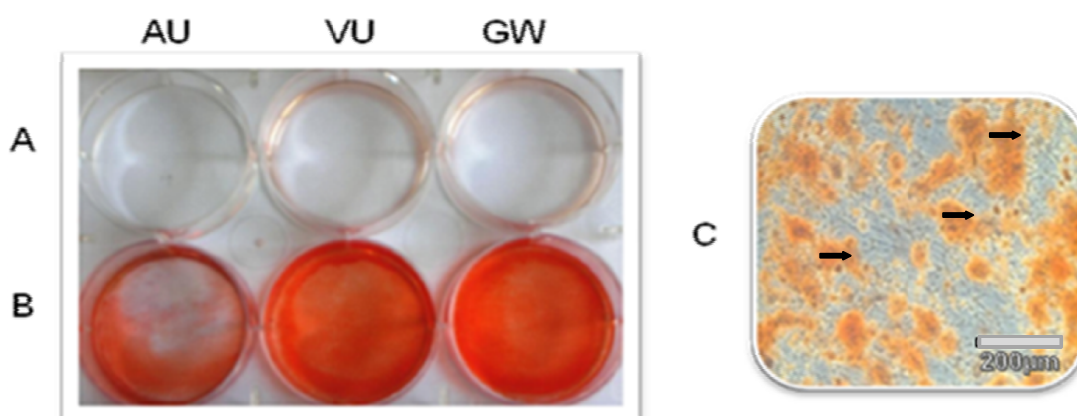


Figura 7. Ensaio de diferenciação osteogênica. (A) Macroscopia do controle negativo, células que não receberam meio de indução osteogênica. (B) Macroscopia de 21 dias após indução osteogênica. (C) Microscopia de células provenientes da VU, representando as três fontes do CUM, setas representam depósitos de cálcio.

Os experimentos de diferenciação adipogênica estão ilustrados na Figura 8. As Figuras 8(A-C) mostram as células 30 dias após o cultivo com meio específico para diferenciação, com os vacúolos lipídicos corados em vermelho (pelo corante “oil red”) em seu citoplasma, característica também observada em adipócitos.

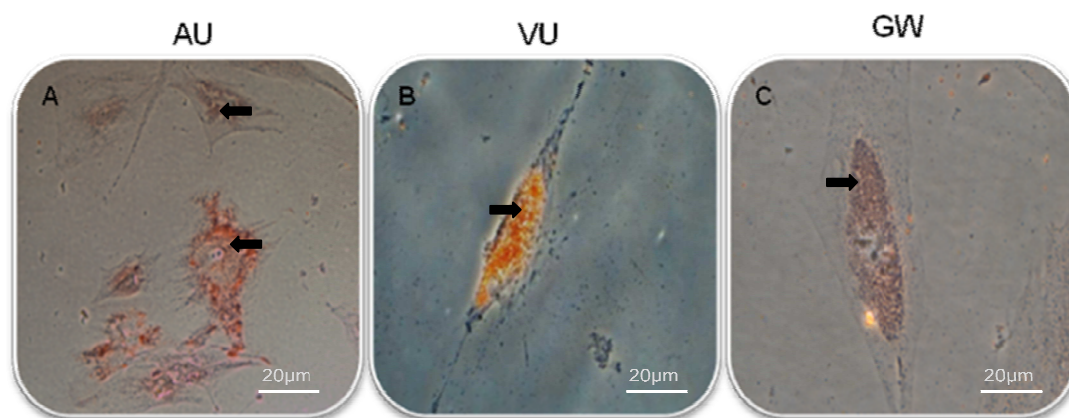


Figura 8. Ensaio de diferenciação adipogênico. (A-C) Células após 30 dias tratadas com meio de diferenciação adipogênico. Setas indicam vacúolos lipídicos no citoplasma das células.

Assim, as três fontes do CUM, AU, VU e GW, apresentaram potencial de diferenciação em linhagens osteogênica e adipogênica, seguindo os critérios da ISCT para caracterizá-las como CTMs.

4.3. Citometria de Fluxo

As células de AU (n=5), VU (n=6) e GW (n=5) em P3 foram caracterizadas por citometria de fluxo para observação e quantificação da expressão de antígenos de superfície. Este conjunto de informações nos permitiu estabelecer a expressão fenotípica destas frações celulares em cultura.

A Figura 9 mostra a morfologia das células do CUM por meio dos histogramas representativos da granulosidade ou complexidade (SSC) e o tamanho das células na amostra (FSC) de cada grupo de células estudado.

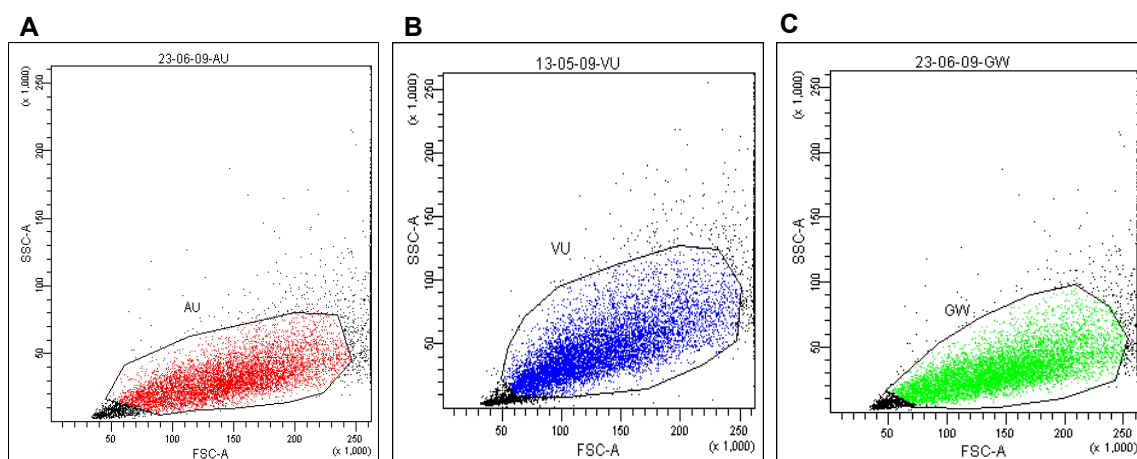


Figura 9. Caracterização morfológica das células do CUM. (A) AU, (B) VU e (C) GW, no eixo X observamos o tamanho das células (FSC) e no eixo Y a granulosidade (SSC).

Seguindo os critérios da ISCT para medula óssea humana, a expressão de CD90, CD73 e CD105 foi analisada. As três fontes de células do CUM expressavam CD90 (AU=91,57±6,73%; VU=92,58±10,73%; GW=92,56±10,40%) e CD73 (AU=79,93±14,75%; VU=83,53±13,44%; GW=79,62±12,15%). No entanto estas células apresentaram baixa expressão para CD105 (AU=1,02±0,83%; VU=1,90±1,46%; GW=1,47±0,46%). Valores expressos por média ± desvio padrão (M±DP).

As três fontes celulares, AU, VU e GW, também apresentaram um baixo percentual de células expressando proteínas características de células da linhagem hematopoiética (CD34: AU= 1,05±0,97%; VU= 1,37±0,68%; GW= 0,87±0,38%. CD 45: AU= 1,06±0,75%; VU= 1,05±0,70% GW= 0,46±0,35%. HLA-

DR: AU= 0,15±0,12%; VU 0,30±0,24%; GW= 0,42±0,27%). Considerando a dificuldade em se retirar todo o conteúdo de células sanguíneas no procedimento de isolamento das células a partir do CUM essa pequena expressão aqui observada já era esperada, neste tipo de análise.

Apesar das células da AU e da VU serem extraídas de vasos, foi observada, também, uma baixa expressão de antígenos endoteliais, CD133 (AU=0,57±0,45%; VU=0,62±0,40%; GW=1,04±0,59%) e CD31 (AU=1,36±0,37%; VU=1,13±0,66%; GW=1,02±0,45%). No entanto foi observada a presença de moléculas de adesão CD166 (AU=15,00±6,95%; VU=20,60±9,52%; GW=22,53±13,17%), CD54 (AU=43,10±13,78%; VU=37,70±10,02%; GW=29,07±20,04%), e CD44 (AU=32,47±27,79%; VU=27,85±15,53%; GW=35,52±11,48%) também presentes em CTMs de medula óssea. Esses dados sugerem que as células em questão não são células endoteliais, ou progenitores endoteliais e podem estar envolvidas na adesão, proliferação e migração celular pela presença de moléculas de adesão.

O antígeno CD117 é uma molécula presente em células progenitoras de medula óssea e em progenitores cardíacos. Nossos resultados demonstraram que as células de AU, VU e GW indiferenciadas apresentam baixos percentuais de expressão do CD117 (AU=0,12±0,06%; VU=0,30±0,21%; GW=0,40±0,25%).

O perfil imunofenotípico das células de AU, VU e GW está discriminado na Tabela 5.

Anticorpo	AU (n=5)	VU (n=5)	GW (n=4)
CD90	91,57±6,73	92,58±10,73	92,56±10,40
CD73	79,93±14,75	83,53±13,44	79,62±12,15
CD105	1,02±0,83	1,90±1,46	1,47±0,46
CD34	1,05±0,97	1,37±0,68	0,87±0,38
CD45	1,06±0,75	1,05±0,70	0,46±0,35
HLA-DR	0,15±0,12	0,30±0,24	0,42±0,27
CD31	1,36±0,37	1,13±0,66	1,02±0,45
CD133	0,57±0,45	0,62±0,40	1,04±0,59
CD44	32,47±27,44	27,42±15,53	35,52±11,48
CD54	43,10±13,78	37,70±10,02	29,07±20,04
CD166	15,01±6,95	20,60±9,52	22,53±13,17
CD117	0,12±0,06	0,30±0,21	0,40±0,25

Tabela 5. Perfil imunofenotípico das células do CUm em cultura. Valores expressos por %M±DP.

A quantificação da expressão das proteínas das 3 fontes do CUm, após terceira passagem, está ilustrada na figura 10.

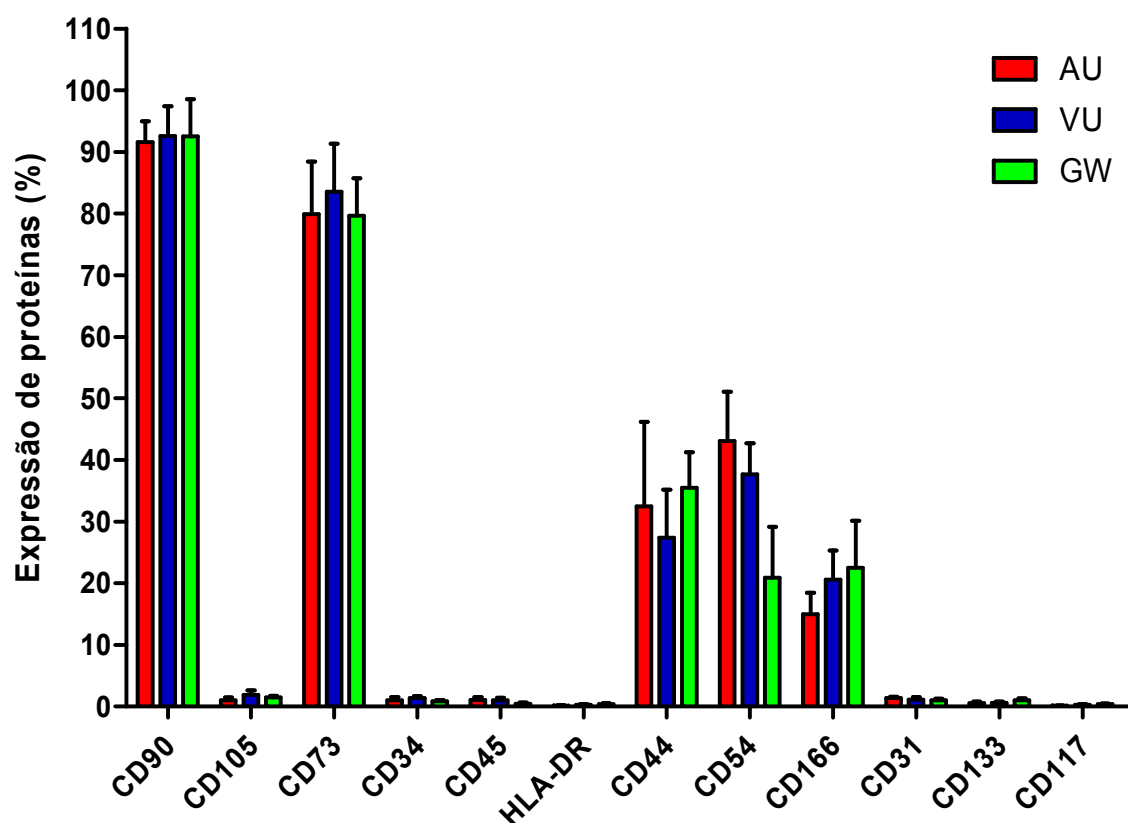


Figura 10. Quantificação da expressão de moléculas presentes após o cultivo de AU (n=5), VU (n=6) e GW (n=5) em P3. Valores expressos em $M \pm DP$.

Assim, as células em terceira passagem do CUM apresentaram características imunofenotípicas presentes em CTMs, CD90, CD73, CD44, CD54 e CD166 e não expressaram antígenos característicos de linhagem hematopoiética (CD34, CD45 e HLA-DR) e endotelial (CD133 e CD31) além de não expressarem CD117. Estes dados sugerem que as células isoladas do CUM são células com características imunofenotípicas de CTMs.

4.4. Estudo de proliferação celular - Population Doubling Time (PDT)

Para testar qual tipo celular do CUM apresentava uma maior taxa de crescimento, utilizamos a técnica de PDT, que consiste no tempo necessário para dobrar o número de células plaqueadas inicialmente. Os resultados mostraram que as três fontes de células do CUM apresentaram um perfil de crescimento exponencial (Figura 11).

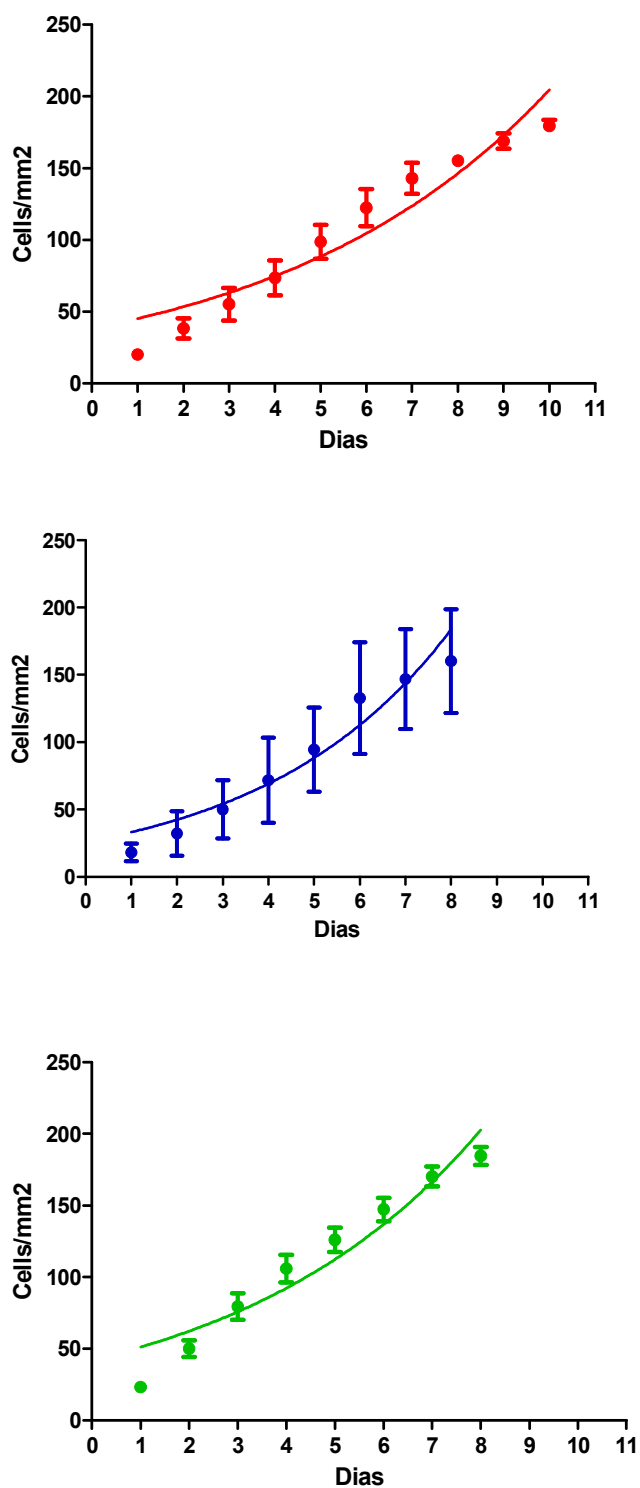


Figura 11. Perfil do crescimento das células de CUM em dias. (A) AU (n=5), (B) VU (n=6) e (C) GW (n=5).

Para determinarmos qual o tempo que as células levam para duplicar a população inicial, convertemos as curvas obtidas em retas, utilizando a regressão linear. Observamos em gráficos semilog os valores das retas de crescimento populacional destas células (Figura 12).

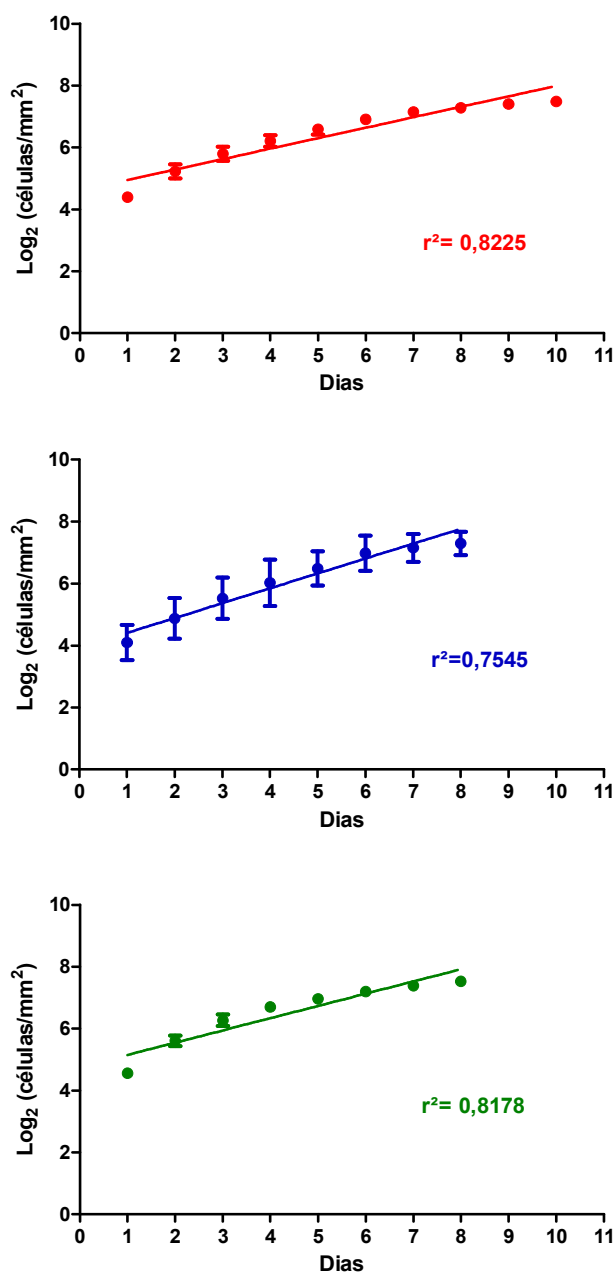


Figura 12. Crescimento das células do CUM em escala semilogarítmica. (A) AU (n=5), (B) VU (n=6) e (C) GW (n=5).

O PDT (Figura 14) foi calculado a partir do inverso do coeficiente angular das retas mostradas na Figura 13. A veia umbilical (VU) é a fonte do CUM que apresenta a proliferação celular mais rápida, levando cerca de $1,95 \pm 0,05$ dias para dobrar sua quantidade inicial de células. O tempo necessário para a artéria umbilical (AU) e a geléia de Wharton (GW) dobrarem sua quantidade inicial de células é de, respectivamente, $2,75 \pm 0,25$ e $2,52 \pm 0,37$ dias (Figura 14). Existe diferença significativa entre AU e VU e entre VU e GW, com $p < 0,05$.

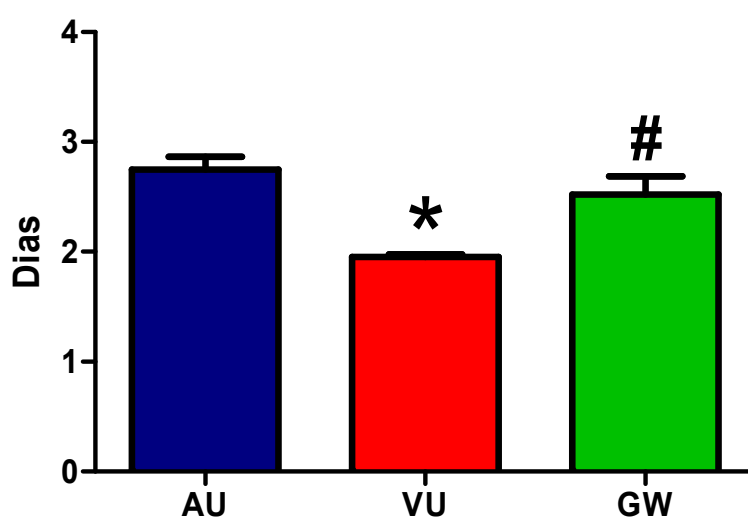


Figura 13. Tempo para dobrar a população (PDT) (dias). AU $2,75 \pm 0,25$ dias, VU $1,95 \pm 0,05$ dias e GW $2,52 \pm 0,37$ dias. Valores expressos por $M \pm EP$; * $p < 0,05$ AU vs VU e # $p < 0,05$ VU vs GW.

4.5. Caracterização por RT-PCR

Diversos autores acreditam que as células presentes nos tecidos neonatais, como o líquido amniótico, placenta e cordão umbilical estejam em um estágio intermediário entre as CTEs e as CTMs (Marcus & Woodbury, 2008; La Rocca et

al., 2008; Papa & Anagnou, 2009) e por isso, por meio da técnica de RT-PCR investigou-se a expressão de transcritos típicos de CTEs nas três fontes do CUM (Figura 14).

As células derivadas de AU expressaram apenas Klf4, fator transcricional, expresso em diversos tecidos, como intestino, pele, pulmão, testículos, vasos e miócitos cardíacos, e que faz parte do “pool” de genes para caracterizar as CTEs, regulando a autorenovação destas, além de provavelmente estar envolvido na formação de vasos em vertebrados. Este dado isolado, não confere características de pluripotencialidade à AU (Figura 14).

Nas células derivadas de VU, além do Klf4, foi observada também a expressão do fator de transcrição Rex1, relacionado à manutenção das células em estágios indiferenciados e de TDGF, fator de crescimento, provavelmente, envolvido na formação de células do epiblasto e posteriormente do mesoderma (Figura 14). A expressão de Rex1, TDGF e Klf4 nas células derivadas da VU sugere que estas células apresentam uma maior propensão em se manterem e se auto-renovarem no estágio indiferenciado, podendo dar origem a tecidos do mesoderma.

Além de expressar, juntamente com células da AU e a VU, Klf4, nas células derivadas da GW, foi observada a presença de Oct4, caracterizado por manter a pluripotência em células embrionárias e Dmt3b, envolvida na metilação do DNA e dos promotores de Oct4, indicando que este tipo celular consegue manter o fenótipo indiferenciado além de se autorrenovar. Este dado indica, também, que este tipo celular apresenta maior pluripotencialidade comparado às células derivadas da AU (Figura 14).

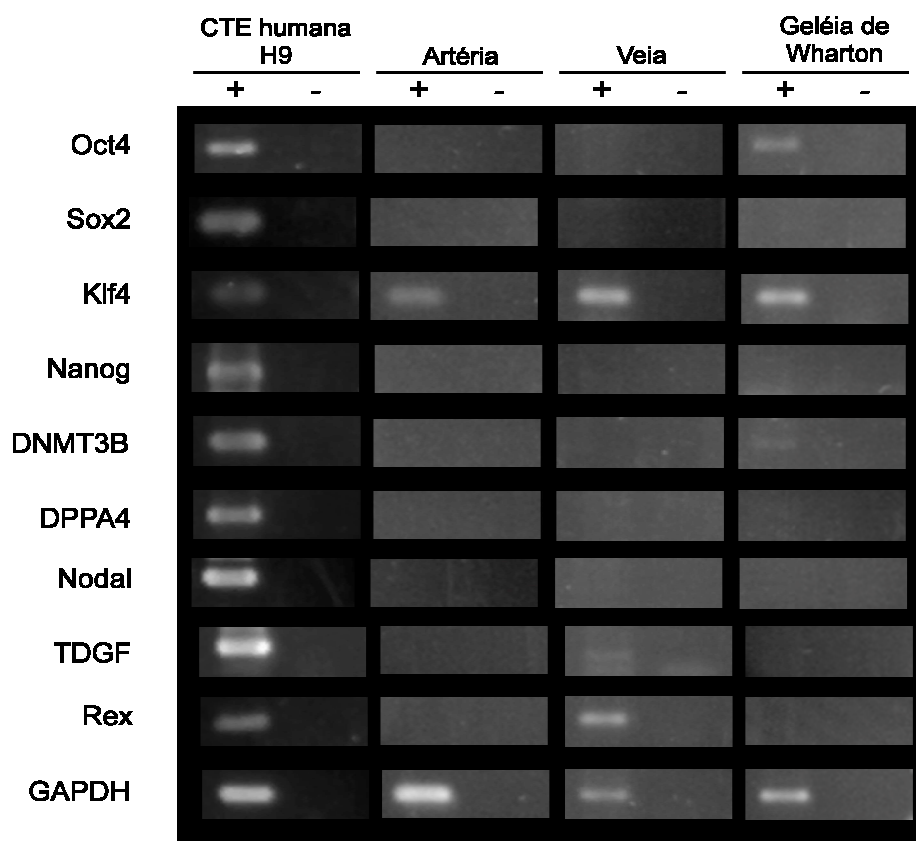


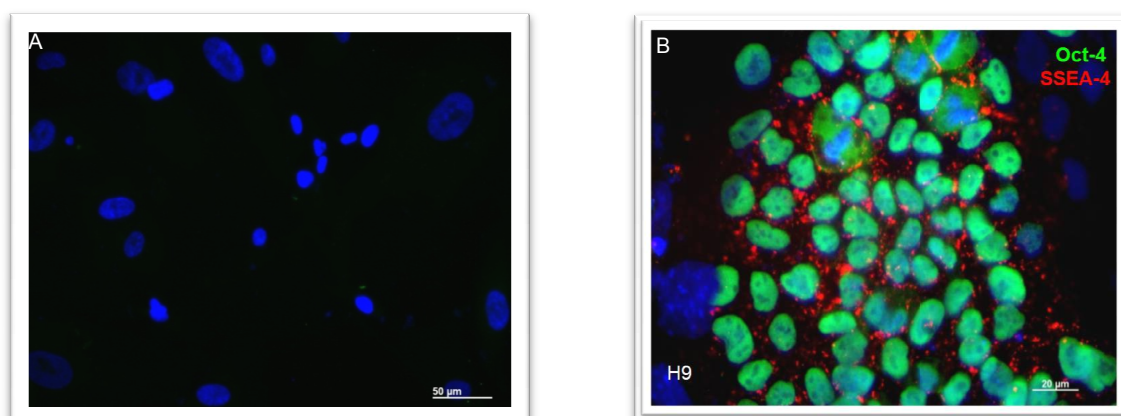
Figura 14. RT-PCR representativo do CUm. CTE humana H9 representa o controle positivo, AU (n=3) é positiva para Klf4, VU (n=3) é positiva para Rex1, Klf4 e TDGF e GW (n=3) é positiva para Oct4, Klf4 e Dnmt3b.

Estes resultados sugerem que as células derivadas da VU e da GW apresentam uma maior pluripotencialidade comparada às derivadas da AU e às CTMs de medula óssea, inserindo-as em um estágio intermediário entre as CT multipotentes e as CT pluripotentes.

4.6. Caracterização por imunofluorescência

A caracterização por imunofluorescência foi realizada com o intuito de detectar se as células do CUM expressam algumas proteínas típicas de células pluripotentes, endoteliais, mesenquimais e, tecido-específicas, no nosso caso de tecidos cardíacos, pois nosso interesse maior é utilizar estas células para diferenciação em fenótipo cardíaco. Os experimentos foram realizados em triplicata para confirmar a reprodutibilidade dos resultados.

Confirmando os dados encontrados no ensaio de RT-PCR, foi detectada, no núcleo das células da GW, a presença da isoforma A de Oct4, caracterizada por manter a pluripotência das células, enquanto a isoforma B, citoplasmática, cuja função ainda não foi elucidada, foi observada nas células da AU e da VU. Ainda neste contexto, foi investigada a presença de outra molécula presente nas CTEs e foi observada a presença do antígeno estágio específico precoce 4 (SSEA-4), glicoproteína também relacionada à pluripotência das células, em grupos celulares de AU, VU e GW (Figura 15).



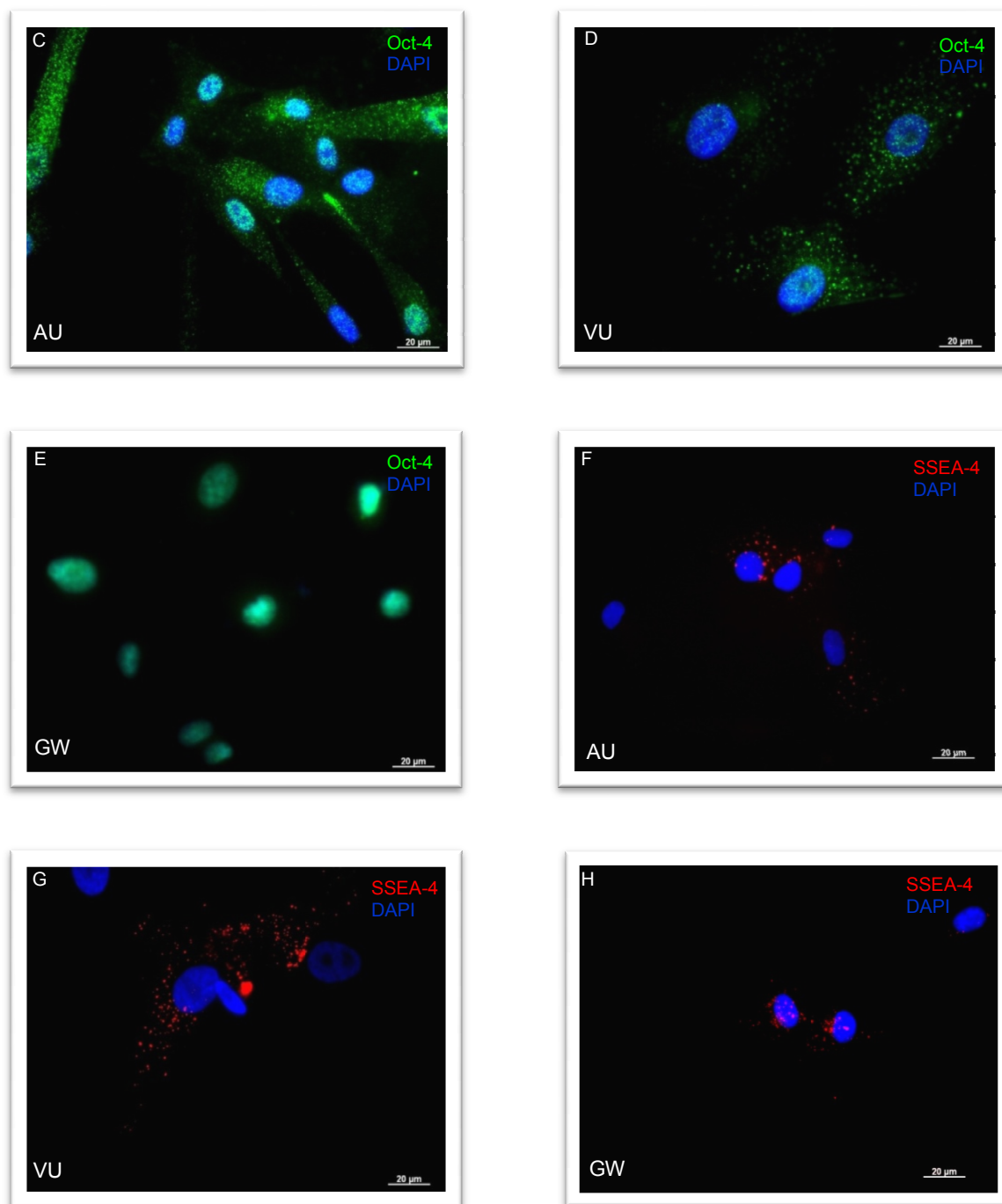


Figura 15. Imunofluorescência representativa para Oct4 e SSEA-4. (A) controle negativo. (B) Controle positivo (H9), (C) Oct4 de AU, (D) Oct4 de VU e (E) Oct4 de GW. (F) SSEA-4 de AU, (G) SSEA-4 de VU e (H) SSEA-4 de GW. Em verde, marcação com Alexa 488, em vermelho marcação com Cy3 e em azul, os núcleos com DAPI.

Apesar dos resultados de citometria de fluxo demonstrarem uma baixíssima expressão de proteínas endoteliais (CD31 e CD133), levando-nos a considerar esta expressão negativa, observamos a presença do fator de Von Willebrand, glicoproteína constitutiva do endotélio e subendotélio, em algumas células das três regiões do CUm. Provavelmente por estas células serem originadas de vasos e de mesoderma extra-embriônico, elas ainda apresentem algumas características endoteliais (Figura 16).

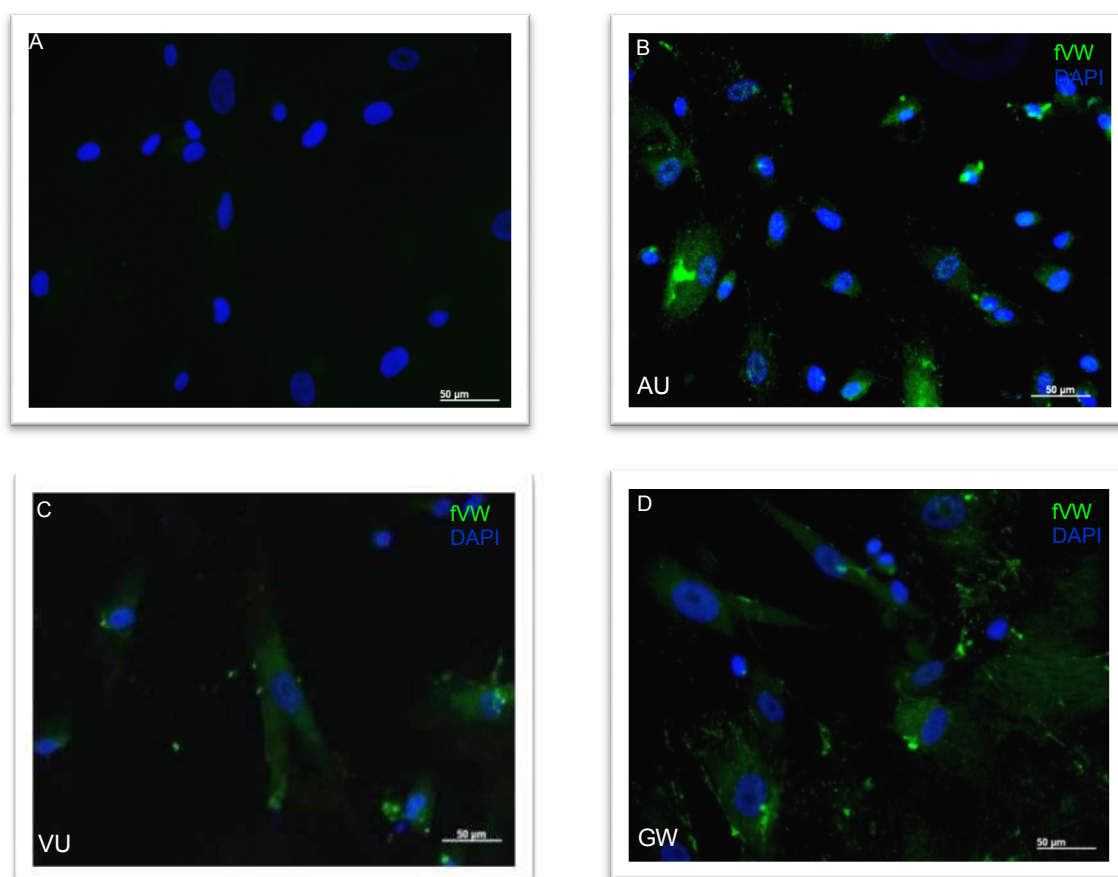
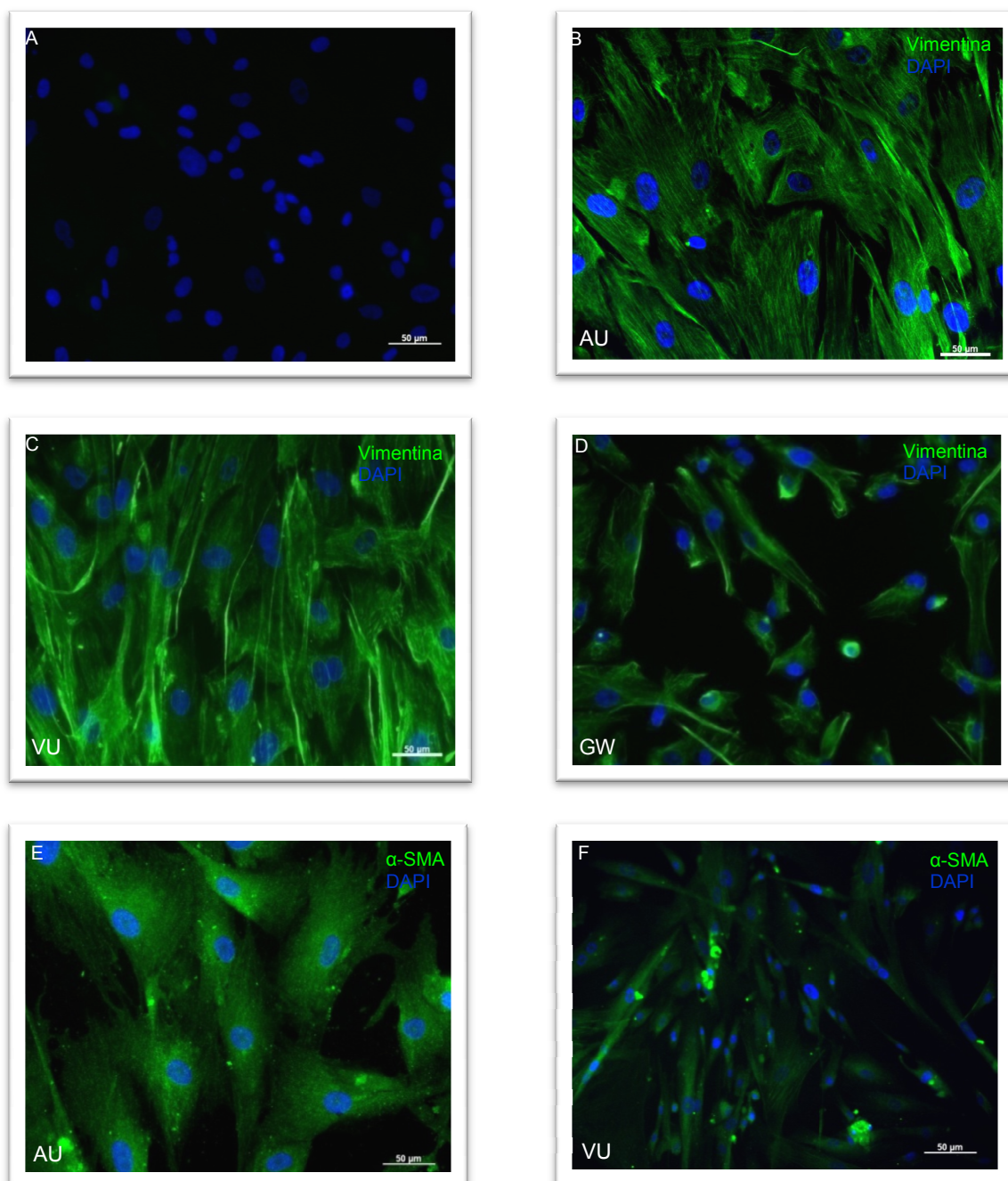


Figura 16. Imunofluorescência representativa para Fator de Von Willebrand (fVW). (A) controle negativo. (B) fVW de AU, (C) fVW de VU e (D) fVW de GW. Em verde, marcação com Alexa 488, e em azul, os núcleos com DAPI.

Em seguida, verificamos a presença de vimentina, e de α -actina de músculo liso (α -SMA) presentes em células mesenquimais e constatamos a presença destas nos 3 tipos celulares do CUm (Figura 17).



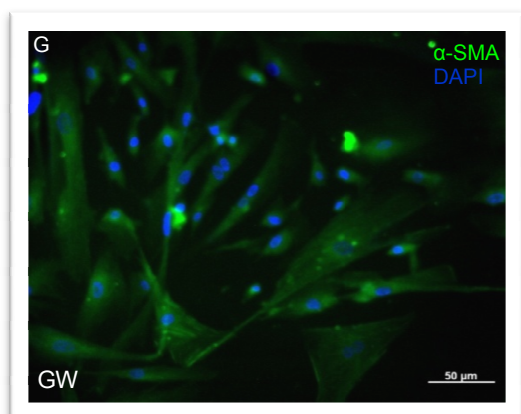
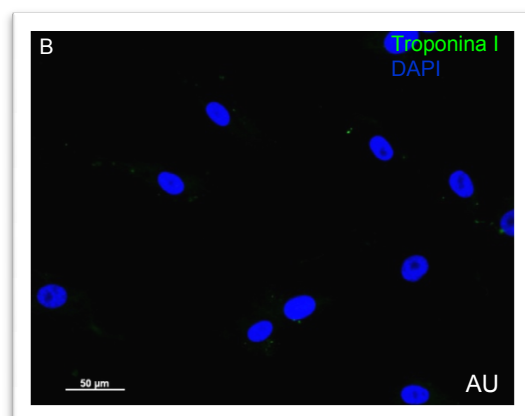
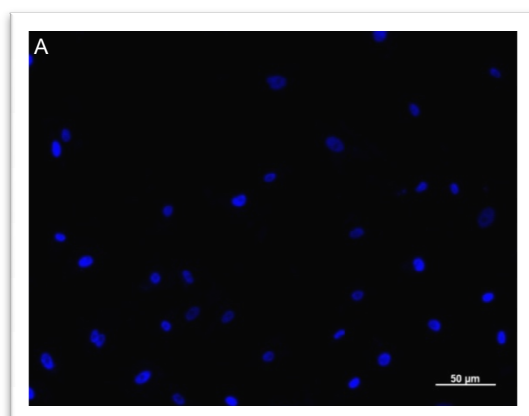


Figura 17. Imunofluorescência representativa para vimentina e α -actina de músculo liso (α -SMA). (A) controle negativo. (B) vimentina de AU (n=3), (C) vimentina de VU (n=3) e (D) vimentina de GW (n=3) (E) α -SMA de AU (n=3), (F) α -SMA de VU (n=3) e (G) α -SMA de GW (n=3). Em verde, marcação com Alexa 488, e em azul, os núcleos com DAPI.

Como nosso interesse é utilizar estas células para diferenciá-las em fenótipo cardíaco, investigamos a expressão de proteínas presentes em músculo cardíaco. Em nossos resultados não observamos a expressão de proteínas cardíacas como troponina I e tropomiosina (Figura 18).

Estes dados nos permitem utilizar os antígenos troponina I e tropomiosina para detectar a diferenciação destas células em linhagens cardíacas, em um posterior ensaio de diferenciação cardiogênico.



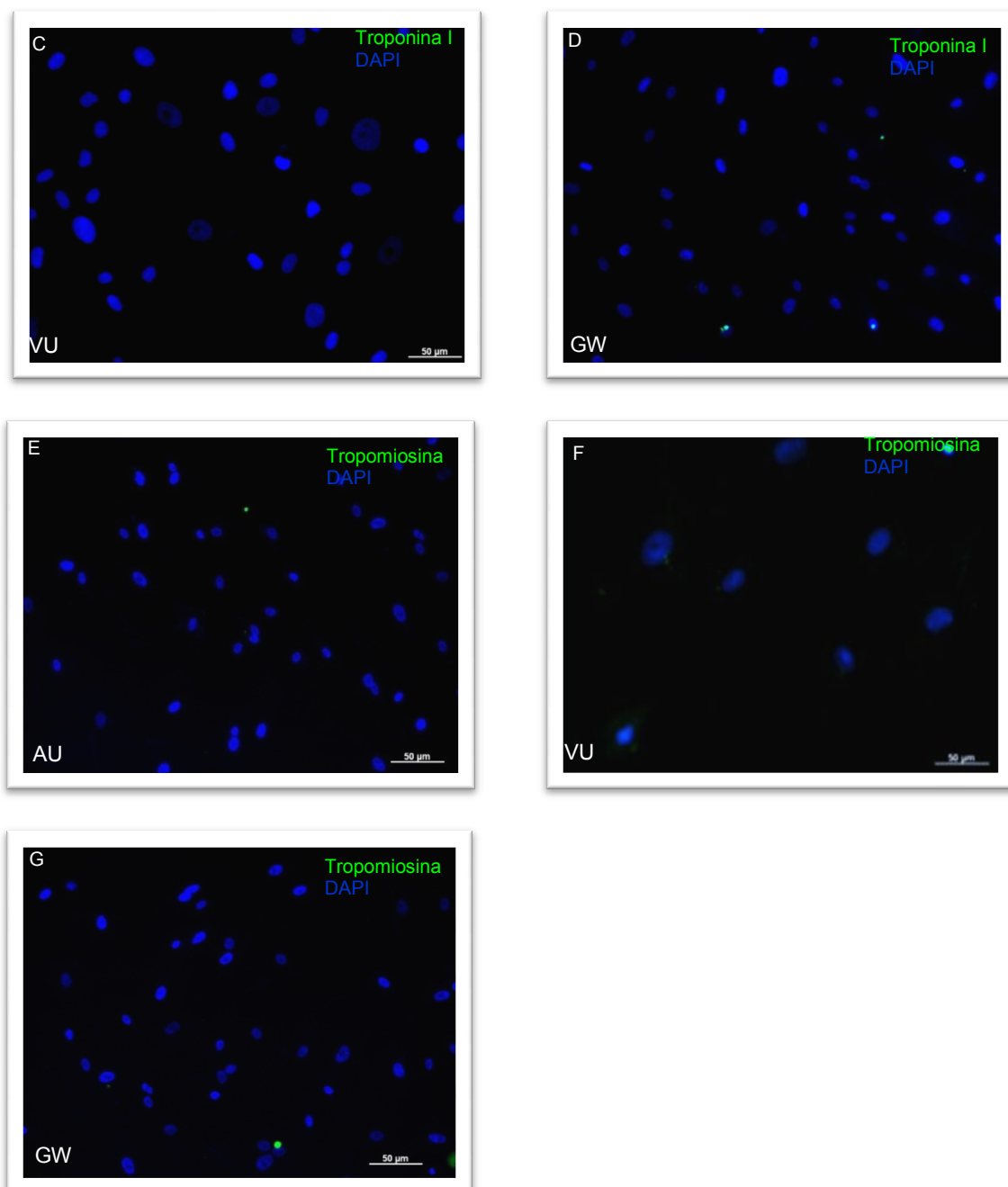


Figura 18. Imunofluorescência representativa para Troponina I e Tropomiosina. (A) controle negativo. (B) Troponina I de AU (n=3), (C) Troponina I de VU (n=3) e (D) Troponina I de GW (n=3). (E) Tropomiosina de AU (n=3), (F) Tropomiosina de VU (n=3) e (G) Tropomiosina de GW(n=3). Em verde, marcação com Alexa 488, e em azul, os núcleos com DAPI.

4.7. Comparação entre as três fontes do CUM

Os resultados comparativos das três fontes do CUM estão resumidos na Tabela 6.

Características	AU	VU	GW
Aderência ao frasco e morfologia fibroblastóide	+	+	+
Diferenciação Adipogênica e osteogênica	+	+	+
Imunofenotipagem			
CTM	+	+	+
PDT	CRESCIMENTO LENTO (2,75±0,25 dias)	CRESCIMENTO RÁPIDO (1,95±0,05 dias)	CRESCIMENTO LENTO (2,52±0,37 dias)
RT-PCR			
Oct4	-	-	+
Sox2	-	-	-
KLF4	+	+	+
Nanog	-	-	-
Dnmt3b	-	-	+
DPPA4	-	-	-
Nodal	-	-	-
TDGF	-	+	-
Rex	-	+	-
Imunocitoquímica			
Oct4A	-	-	+
SSEA-4	+	+	+
fVW	+	+	+

Vimentina	+	+	+
α -SMA	+	+	+
Troponina I	-	-	-
Tropomiosina	-	-	-

Tabela 6. Resultados comparativos entre AU, VU e GW. + representa presença da característica e – representa ausência da característica. Em citometria de fluxo +++ representa 50-100% das células, ++ representa 2-49% e – representa < do que 2% da média.

As 3 fontes do CUM apresentaram, em sua maioria, características semelhantes entre si, com aderência ao frasco de cultura, e morfologia fibroblastóide, foram capazes de se diferenciar em linhagens adipogênica e osteogênica, expressaram por imunocitoquímica algumas proteínas presentes em células mesenquimais, mas as células derivadas da VU, apresentaram os maiores níveis de proliferação celular, comparada às da AU e da GW. A análise por citometria de fluxo demonstrou que estas células são imunofenotipicamente semelhantes, não apresentando diferença significativa entre AU, VU e GW em nenhum antígeno analisado, características estas que permitem classificá-las como CTMs.

Apesar de ser imunofenotipicamente semelhante e de apresentar um crescimento mais lento, comparado às células derivadas da VU, as células da GW apresentaram um painel de transcritos (Oct4, Dnmt3b e Klf4) e a expressão de proteínas (Oct4 e SSEA-4) por imunofluorescência, que sugerem que estas células estejam em um estágio intermediário entre as células multipotentes e as células pluripotentes.

A expressão de Rex1, TDGF e Klf4, por RT-PCR e de SSEA-4 por imunocitoquímica nas células derivadas da VU sugere que este tipo celular

também esteja em um estágio intermediário entre as células multipotentes e pluripotentes. No entanto, somente a expressão de Klf4 por RT-PCR e de SSEA-4 por imunocitoquímica nas células da AU não confere a este tipo celular características de células pluripotentes, já que o Klf4 é um fator amplamente expresso em diversos tecidos de um organismo adulto.

Desta forma, nossos dados levam a crer que as células do CUM, principalmente a derivadas da GW e da VU, estejam em um estágio intermediário entre as CTEs e as CTMs, podendo ser utilizadas para diversos ensaios de diferenciação, reprogramação, mecanismos de reparo e em terapias específicas.

5. DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) constituem uma fonte promissora para as terapias celulares. Estas células possuem duas características principais: auto-renovação e potencial de diferenciação. Além disso, as células com características mesenquimais podem ser expandidas *in vitro* a partir de diferentes órgãos e tecidos, como cérebro, coração, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo, timo e pâncreas (Qiao *et al.*, 2007). A grande maioria dos procedimentos para obtenção de CTMs inclui métodos invasivos e apesar de morfológica e imunofenotipicamente semelhantes essas células possuem taxa de proliferação *in vitro* variável dependendo do tecido/órgão de origem. Portanto, buscar novas fontes que excluam a metodologia invasiva de obtenção, que contenham células com alto potencial proliferativo, capacidade de se diferenciar em diversas linhagens, baixo risco de contaminação viral e identificar dentre as diferentes fontes o tipo celular ideal para tratar uma determinada doença é o grande desafio dos grupos de pesquisas em células-tronco.

Kadner *et al.* (2002), Romanov *et al.* (2003) e Ishige *et al.* (2009) foram, respectivamente, os primeiros a isolar CTMs da geléia de Wharton (GW), da veia umbilical (VU) e das artérias umbilicais (AU). No entanto, algumas questões quanto à caracterização destas células continuam em aberto e precisam ser respondidas para que estas fontes de células-tronco (CT) possam ser utilizadas em terapias de reparo e/ou regeneração tecidual.

Neste trabalho, optamos por explorar as três fontes do cordão umbilical: artérias e veia umbilicais e geléia de Wharton, caracterizando e comparando cada um dos tipos de CTMs provenientes delas.

Atualmente, diferentes metodologias têm sido utilizadas para a obtenção das CTMs do CUM: lavagem do vaso com collagenase 1% a 37°C por 20 minutos (Covas *et al.*, 2003; Kadivar *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2007); separação e secção em pequenos fragmentos dos vasos para posterior digestão enzimática em collagenase por aproximadamente 18 horas (Sarugaser *et al.*, 2005); secção de todo o segmento (vasos + geléia de Wharton) em pequenos fragmentos que sofrerão digestão enzimática pela adição de collagenase e/ou tripsina (Lu *et al.*, 2006) ou apenas a secção da geléia de Wharton e digestão enzimática com collagenase e/ou tripsina (Karahuseyinoglu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007).

Em nosso estudo, utilizamos a separação das três partes do cordão umbilical (veia + artérias + geléia de Wharton), pelo método de Sarugaser *et al.* (2005) com algumas modificações, por ser o método de separação das 3 regiões do CUM que apresenta menor grau de contaminação com resíduos teciduais das três partes. Neste método, as três partes do CUM foram separadas manualmente e digeridas, posteriormente, com collagenase por até 15 horas após o processamento do CUM. Observamos que com este protocolo as células foram obtidas e expandidas das três regiões do cordão umbilical com relativa facilidade.

Alguns estudos sugerem que a digestão enzimática com collagenase pode diminuir a viabilidade celular (Ishige *et al.*, 2009) e alterar as funções celulares como a degradação de receptores da superfície celular (La Rocca *et al.*, 2009). Considerando que as células, nesse estudo, apresentaram-se aderentes ao frasco de cultura, com morfologia fibroblastóide e com as características morfológicas mantidas ao longo das passagens, podemos sugerir que o método aqui utilizado foi eficiente na obtenção e manutenção destas células (Figuras 6, 7 e 8).

As células das três regiões (AU, VU e GW) aderentes ao fundo da garrafa de cultura apresentaram morfologia fibroblastóide e formando morros e vales. Não foram encontradas células com morfologia poligonal, caracterizando células endoteliais, nos estágios iniciais de cultivo, conforme já descrito por Kermani *et al.* (2008).

É possível que as CTMs estejam situadas tanto na medula como em outras regiões do corpo sob a forma de pericitos, células presentes na parede vascular embebidas na membrana basal, onde entram em contato com o endotélio vascular (Meirelles *et al.*, 2008). A origem celular dos pericitos não é consensual. Alguns estudos sugerem que os pericitos têm origem mesodérmica (Etchevers *et al.*, 2001) e outros têm sugerido que os pericitos e as células endoteliais se originam de um precursor comum (Yamashita *et al.*, 2000). Collett & Canfield (2005) relataram que os pericitos são derivados de células musculares lisas, fibroblastos, células endoteliais e da medula óssea.

Os pericitos, presentes em grandes vasos, atuam como CTMs quando ocorre uma lesão nesse vaso, dividindo-se e secretando fatores bioativos que protegem e reparam o tecido lesionado (Andreeva *et al.*, 1998). Estes produtos de secreção apresentam um alto fator trófico com efeito antiapoptótico, impedindo formação de cicatriz e estimulando a angiogênese e vasculogênese na região de lesão. Nossos resultados demonstraram esta possibilidade, pois as células de AU, VU e GW expressaram α -actina de músculo liso da mesma forma que as células da medula óssea e os pericitos (Funk *et al.*, 1995; Galmiche *et al.*, 1993).

A proximidade dos pericitos com as CTMs é evidente também pela capacidade de se diferenciar em linhagens adipogênicas, condrogênicas

(Farrington-Rock, *et al.*, 2004) e osteogênicas (Doherty, *et al.*, 1998). Covas *et al.* (2008) compararam a morfologia, perfil imunofenotípico, expressão gênica e potencial de diferenciação de pericitos, CTMs de medula óssea e dos vasos do cordão umbilical, fibroblastos, miofibroblastos e células de músculo liso. Os pericitos apresentavam características semelhantes às das CTMs de medula óssea e cordão umbilical. Por outro lado, quando analisada a expressão gênica, não encontraram relação entre os pericitos e fibroblastos, células musculares lisas e miofibroblastos, uma vez que eles não expressavam principalmente CD146 e proteína específica de fibroblastos-1. Estes resultados indicam uma similaridade entre as CTM e os pericitos localizados na parede dos vasos e que estas células são capazes de agir no reparo e na manutenção de tecidos lesionados.

As CTMs em cultura se diferenciam, quando estimuladas, em diversos tecidos. Estudos prévios mostraram que células da AU, da VU e da GW são capazes de se diferenciar em linhagens adipogênicas e osteogênicas após a indução com meio específico para cada linhagem (Ishige, *et al.*, 2009). Além disso, estes estudos demonstraram que as células de GW, apresentam diferenciação osteogênica mais lenta (49 dias), em relação à das células de AU e de VU. Nossos resultados demonstraram depósitos de cálcio em praticamente toda a placa de cultura 21 dias após o início do ensaio de diferenciação osteogênico nas três fontes celulares estudadas (Figura 7). Estudos utilizando VU e da GW mostraram que as CTMs obtidas daquela região do CUM têm a capacidade de se diferenciarem em adipócitos da mesma forma que as CTM de medula óssea (Covas *et al.*, 2003; Lu, *et al.*, 2006).

Seguindo os critérios definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) para CTM de medula óssea humana, nossos resultados mostraram

que a diferenciação adipogênica ocorreu, em meio específico e manteve-se por 30 dias. A maior capacidade das células em depositar cálcio evidenciada após a coloração com vermelho de alizarina confirmou a diferenciação osteogênica nas células das três fontes de CUM utilizadas neste estudo após 21 dias de cultivo. Considerando que após o tratamento com meios de indução de diferenciação osteogênico e adipogênico as células de todas as fontes do CUM utilizadas neste estudo apresentaram depósitos de cálcio e vacúolos lipídicos nos seus citoplasmas, sugerimos que as células do cordão umbilical, mantidas em cultura, mantêm sua capacidade de diferenciação quando estimuladas (Figura 7 e 8).

A caracterização das células por citometria de fluxo permitiu estabelecer a expressão fenotípica das frações celulares em cultura. Os resultados desta análise mostraram que não houve diferença no tamanho das células obtidas das três fontes do CUM (Figura 9).

Conforme estabelecido em medula óssea, pela ISCT um dos critérios utilizados para classificar uma célula como CTM é a expressão de antígenos específicos em sua superfície, apresentando expressão de CD105, CD73 e CD90 acima de 95% mensurados por citometria de fluxo e expressão menor ou igual a 2% de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (Dominici, *et al.*, 2006).

Como ainda não foi estabelecido um critério específico, com um painel imunofenotípico ampliado para caracterizar as CTMs de cordão umbilical, adaptamos o nosso painel ao já estabelecido pela ISCT, expandindo para a análise dos antígenos CD31, CD133, CD117, CD166, CD54 e CD44.

Consideramos, também, valores menores ou iguais a 2%, como expressão negativa em nossas análises.

Não existe um consenso entre os autores de quais os valores devem ser utilizados para a expressão ser considerada negativa para as CTMs de CUM. Sarugaser *et al.* (2005) e Kadivar *et al.* (2006) consideraram valores menores que 1,5% como negativos e Lu *et al.* (2006) consideraram negativo os antígenos que expressavam valores menores que 1%. Enquanto Panepucci *et al.* (2007) consideraram negativo, valores abaixo de 3,7%. Estudos devem ser realizados, para estabelecer, como nos critérios mínimos estabelecidos pela ISCT para medula óssea, valores para julgar a negatividade e a positividade em relação à expressão das moléculas de superfície destas células.

Seguindo os critérios estabelecidos pelo nosso grupo (valores menores que 2% são considerados negativos), caracterizamos, por citometria de fluxo, as células das três fontes do cordão umbilical. Nossos resultados mostraram uma baixa expressão de antígenos associados a linhagens hematopoiéticas, considerada negativa, segundo os critérios já descritos acima. Observações semelhantes foram apresentadas nos estudos de Lu *et al.* (2006) que consideraram valores menores que 1% como negativos nas células da GW em CD34, CD45 e HLA-DR; de Kadivar *et al.* (2006) (CD34=1,5% e CD45= 0,96%) em VU e de Panepucci *et al.* (2007) (CD34=1,1%; CD45=0,06%; HLA-DR=1,6%) em VU.

Autores têm demonstrado a expressão de antígenos mesenquimais (CD90, CD73 e CD105) em CTMs obtidas a partir do CUM. Nossos dados estão de acordo com a literatura para a expressão de CD90 e CD73. Weiss *et al.* (2006)

observaram a expressão de CD90 em 81% das células de GW em P4, enquanto a expressão de CD73 não foi analisada por este grupo. Kadivar *et al.* (2006) observaram a presença de CD73 (98,43%), CD105 (94,36%) e CD29 (91,50%) nas células de VU, e consideraram que a coexpressão de CD73 e CD105, caracteriza estas células como CTMs. Sarugaser *et al.* (2005), observaram a presença de CD73, CD90 e CD105 em mais de 98% das células de GW, já Friedman *et al.* (2007) encontraram expressões de CD73 variando entre 51-75% e de CD105 acima de 76% neste mesmo tipo celular.

Apesar de Ciavarella *et al.* (2009) demonstrarem que a população de CTM da GW expressava altos níveis de CD105 ($97,8 \pm 0,7\%$), CD90 ($98,0 \pm 1,3\%$) e CD73 ($91,3 \pm 4,2\%$) e que estes níveis se mantinham até a sexta passagem, e Park *et al.* (2007) observarem elevadas expressões de CD90 ($99,7 \pm 0,1\%$) CD73 (99,9%) e CD105 ($78,7 \pm 6,4\%$) em VU, observamos uma baixa expressão de CD105 em terceira passagem (P3), nas três fontes dos CUMs utilizados neste estudo (AU= $1,02 \pm 0,83\%$; VU= $1,90 \pm 1,46\%$; GW= $1,47 \pm 0,46\%$). Weiss *et al.* (2006) relataram que células da GW em passagens mais posteriores reduziram a expressão de CD105 (de 81% em P4 para 24% em P8) e alguns grupos não utilizaram o CD105 para caracterizar as células do CUM como CTMs (Covas *et al.*, 2003; Panepucci *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Secco *et al.*, 2007).

Para descartar problemas com o anticorpo CD105 utilizamos CTM de medula óssea em P3 (n=4) como controle positivo e pudemos observar que estas expressavam altos níveis de CD105 ($86,32 \pm 5,14\%$) (Anexo 2).

Alguns grupos utilizaram meio de cultura diferente do nosso, como o de Sarugaser *et al.* (2005). O meio utilizado por este grupo era composto por α -MEM

acrescido de 15% de SFB e 10% de antibióticos. Outros grupos utilizaram o mesmo meio de cultura que utilizamos neste estudo (DMEM-Low glicose), mas era acrescido de fatores de crescimento como VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e EGF (fator de crescimento epidermal) (Lu *et al.*, 2006; Kadivar *et al.*, 2006; Kermani *et al.*, 2008) e todos estes encontraram altos níveis de CD105. Não foi testado a utilização do meio α -MEM ou destes fatores de crescimento, que possivelmente podem influenciar na alta expressão deste antígeno.

Além disso, as células do CUM deste estudo não foram capazes de se diferenciar em linhagem condrogênica. Foi utilizado meio de cultura DMEM-Low glicose acrescido de fator de crescimento beta transformador (β_1 -TGF, do inglês *transforming growth factor beta*) (10ng/mL), insulina (0,5 μ g/mL) e de ácido ascórbico (5x10⁻⁶M). A incapacidade de diferenciação das células do CUM pode ser devido à ausência de CD105, já que este atua na modulação da resposta celular ao β_1 -TGF (Lastres *et al.*, 1996), e este fator de crescimento é essencial para a diferenciação condrogênica (Lee *et al.*, 2004).

Estes dados nos levam a crer que a expressão de CD105 nas células do CUM é realmente baixa e não está relacionada a problemas com a técnica de detecção ou utilização deste anticorpo.

Diversos estudos demonstraram a expressão de moléculas de adesão em diferentes fontes de CUM. Ciavarella *et al.* (2008) verificaram que moléculas de adesão, como CD54 e CD44 são altamente expressas em GW (66,9 $\pm$ 5,3% e 95 $\pm$ 1,6% respectivamente). Covas *et al.* (2003) constataram que as células de VU expressam 57% de CD44 e 44% de CD54 enquanto Kadivar *et al.* (2006)

observaram elevados índices de CD44 (98,31%), CD54 (91,30%) e de CD166 (97,40%) e Kermani *et al.* (2008) observaram baixa expressão de CD54 (1%) e nenhuma de CD166 (0%) no mesmo tipo celular. Friedman *et al.* (2007) observaram a expressão de CD44 e de CD166 variando entre 51 e 75% das células de GW. Neste estudo, observamos a expressão de CD44 (AU=32,47±27,79%; VU=27,85±15,53%; GW=35,52±11,48%), CD54 (AU=43,10±13,78%; VU=37,70±10,02%; GW=29,07±20,04%) e CD166 (AU=15,00±6,95%; VU=20,60±9,52%; GW=22,53±13,17%) compatível com a maioria dos estudos na literatura.

Ainda assim, podemos observar que a presença de moléculas de adesão nas células do CUm ainda é controversa. Nossos resultados estão de acordo com Covas *et al.* (2003), e não atingiram índices elevados como de Kadivar *et al.* (2006) nem tão baixos como de Kermani *et al.* (2008). Novas análises, possivelmente focando em subpopulações celulares, necessitam ser efetuadas para melhor entender a presença destas moléculas nas CTMs de CUm.

A metodologia de isolamento e cultivo de células mesenquimais de CUm demonstrou ser eficaz já que as células obtidas nesse trabalho apresentaram baixa expressão de antígenos endoteliais. A baixa expressão dos antígenos CD133 e CD31 comprova nosso sucesso. Nossos dados são inferiores aos encontrados por Panepucci *et al.* (2004) que obtiveram expressão de 3,7% em CD133 e 2,4% em CD31 nas células de VU. Em concordância com o trabalho de Ishige *et al.* (2009), a presença de CD133 e CD31 foram consideradas negativas em todas as fontes do CUm, apesar de por imunofluorescência, ter sido detectado a presença de fVW (Figura 16), glicoproteína, constitutiva do subendotélio.

Como o foco principal deste trabalho é caracterizar as células indiferenciadas das três regiões do CUM, para posteriormente diferenciá-las em diferentes fenótipos, investigamos a expressão de CD117. Alguns grupos acreditam que a expressão de CD117 facilite a indução ao fenótipo cardíaco das CTMs (Beltrami *et al.*, 2003) além de ser utilizado para identificar as células progenitoras cardíacas (Bearzi, *et al.* 2009). Já outros grupos não atribuem ao CD117 o potencial de diferenciação em fenótipo cardíaco e postulam que as CTM se diferenciam independentemente da expressão deste antígeno (Wang *et al.*, 2004; Prat-Vidal *et al.*, 2007). A baixa expressão de CD117 demonstrada neste trabalho, nas três fontes do CUM, também foi observada por Wang *et al.*, (2004), Ma *et al.* (2005) e Friedman *et al.* (2007) em GW e Ciavarella *et al.* (2008) em VU.

Em nosso estudo não foram observadas diferenças significativas no perfil imunofenotípico entre as três fontes do CUM. Portanto, estes dados nos permitem caracterizá-las como imunofenotipicamente semelhantes.

Em relação ao crescimento celular, observamos que as células de VU cresceram mais rapidamente do que as da AU e da GW. No entanto, não se observou diferença significativa entre o crescimento das células da AU e da GW. Contrariando esse resultado, Ishige *et al.* (2009) observaram que as células da VU possuem um crescimento mais lento do que GW e AU. Nossos resultados são discordantes, provavelmente pela diferença entre as técnicas utilizadas para a obtenção deste dado. Para o estudo da proliferação celular, os autores realizaram a contagem das células em 3 dias diferentes mediante a dissociação com tripsina. Sabidamente, a tripsina pode interferir com a viabilidade celular e, portanto, alterar os achados de proliferação. Já em nosso estudo não foi necessário o uso da tripsina, uma vez que o PDT foi calculado em dias subsequentes sem que as

células fossem dissociadas da placa de cultura. Além disso, Ishige *et al.* (2009) demonstraram resultados contraditórios em relação ao crescimento da VU. Embora o PDT fosse mais lento, este tipo celular apresentava maior capacidade de formação de colônias do que AU e GW, sugerindo uma maior taxa de crescimento.

Nossos resultados mostraram que a VU apresentou duplicação de $46,80 \pm 1,2$ horas, GW de $60,48 \pm 8,88$ horas e AU de 66 ± 6 horas (Figura 13). Com base nestes resultados e, apesar dos diferentes métodos para obtenção do PDT, comprovamos que as células de CUM dobram seu número inicial em 45-70 horas em P3, semelhante ao que ocorreu nos estudos de Sarugaser *et al.* (2005); Karahuseyinoglu *et al.* (2007) e Lund *et al.* (2007), que dobraram seu número inicial em 50-80 horas nas passagens mais recentes.

Apesar do cordão umbilical ter sido caracterizado como um tecido adulto, ele ainda apresenta características embrionárias e para caracterizar a expressão de marcadores envolvidos na capacidade de autorenovação das CTs, utilizamos a técnica de RT-PCR para detectar a expressão dos principais genes de pluripotencialidade.

Estudos prévios com células-tronco embrionárias (CTEs) e em populações limitadas de CTs do líquido amniótico constataram a expressão de Oct4 (Marcus & Woodbury, 2008). La Rocca *et al.* (2008), analisaram qualitativamente a expressão de genes relacionados à pluripotência e observaram que as células de GW apresentavam expressão para Oct4, isoforma A e B, e Nanog. Kermani *et al.* (2008), demonstraram que as células da VU expressavam Oct4, Nanog e não

expressavam Sox-2 enquanto Sarugaser *et al.* (2005) não encontraram a expressão de Oct4 e SSEA-4 nas células de GW.

Nossos resultados de RT-PCR para Oct4 comprovados por imunofluorescência demonstraram que as células de GW apresentaram a isoforma A, caracterizada como a principal responsável pela autorenovação das CTE humanas (Lee *et al.* 2006) enquanto as células da VU e da AU apresentaram a isoforma B, presente no citoplasma da célula, mas de função ainda desconhecida (Figura 14 e 15). Dessa forma, é possível que as células do CUM, apresentem características mesenquimais, expressando antígenos característicos destas, além de serem reguladas por mecanismos similares às CTEs, quanto à autorenovação, principalmente em GW e VU.

A glicoproteína SSEA-4, presente em CTEs humanas, foi detectada, neste trabalho, em algumas células das três regiões do CUM em cultura (Figura 15). Esse resultado também foi observado por Kermani *et al.* (2008) em VU. Dados de nosso laboratório, no entanto, mostram que esta proteína, não é detectada em CTM de medula óssea tanto de pacientes acometidos de AVC, cirrose hepática, doença de Chagas quanto de doadores sadios, demonstrando que a expressão dessa glicoproteína não pode ser explicada pela presença de doença ou pelas condições de cultivo (Kasai-Brunswick, 2009). Assim, expressão de SSEA-4 em algumas células da AU, VU e GW, aqui observada, pode ser devido ao estágio de maior indiferenciação que tais células se encontram em relação às CTM de medula óssea.

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para detectar, qualitativamente, proteínas presentes em células mesenquimais. Neste estudo houve marcação

positiva para vimentina nas células das três regiões do CUM (Figura 17). Kestendjieva *et al.* (2008) e La Rocca *et al.* (2009) também observaram estes resultados para VU e GW respectivamente.

Os dados de RT-PCR e imunofluorescência, demonstram que as células do CUM, principalmente da GW, apresentam um perfil intermediário, entre as CTEs e as CTAs. O fato de expressarem Oct4, SSEA-4, Klf4 as diferencia das CTM de medula óssea, que não expressam nenhuma destes transcritos.

Conforme descrito por Covas *et al.* (2003), Panepucci *et al.* (2004), Friedman *et al.* (2007), Park *et al.* (2007) e confirmado por este estudo, as células do CUM não expressam moléculas do MHC classe II (HLA-DR). Estas moléculas são fortes aloantígenos que, se expressos, medeiam o reconhecimento alorreativo de linfócitos T CD4+. Este dado é importante para permitir que as células do CUM possam evitar/atenuar problemas como rejeição do sistema imune, mesmo em transplantes alogênicos, pois não são reconhecidas pelas células T (La Rocca *et al.*, 2009).

Estudos recentes sugerem que as células dos tecidos fetais, como o CUM, representam uma nova classe de CTs, localizando-as em um estágio intermediário entre as CTEs e as CTAs, compartilhando e exibindo características de pluripotencialidade e de multipotencialidade, além de serem rapidamente expandidas *in vitro*, possibilitando uma rápida obtenção destas para fins terapêuticos. Estas células seriam particularmente adequadas para terapias por possuírem uma imunogeneticidade ainda negligenciável e por não demonstrarem evidências de formação de teratomas (Papa & Anagnou, 2009).

A possibilidade de obtenção de células no estado pluripotente a partir de células somáticas de um indivíduo representa um grande avanço e o desenvolvimento de metodologias para a reprogramação nuclear das células somáticas, as iPSCs, mostrou ser viável para alcançar este objetivo (Yamanaka, 2009). O CUm, por ser uma importante fonte de CTM e apresentar expressão de alguns dos genes críticos para pluripotência, pode ser uma alternativa para a geração de iPSCs, principalmente as células derivadas da GW, que expressam Oct4 e Klf4, dois dos genes necessários a geração das iPSCs. Uma vantagem adicional é que as iPSCs geradas a partir do cordão umbilical podem ser usadas na geração de células para transplante autólogo, o que evitaria a rejeição imunológica.

Apesar das células deste estudo serem de pacientes geneticamente diferentes, elas apresentaram características semelhantes quanto à sua imunofenotipagem, porém com variabilidade nos níveis moleculares mesmo quando analisadas de um mesmo indivíduo demonstrando que, apesar de compartilharem características imunofenotípicas as três regiões do CUm apresentam diferenças, as quais, certamente, devem ser levadas em consideração antes da sua utilização em ensaios clínicos.

Avaliando todos os dados aqui obtidos, concluímos que as células do CUm, principalmente da GW, por apresentarem expressão dos principais transcritos presentes nas células pluripotentes, e, ao mesmo tempo, manter o padrão típico das CTMs apresentam-se como uma promissora fonte de células-tronco para reprogramação nuclear, testes farmacológicos, estudo de doenças para as quais não existem modelos animais adequados, e para futuras terapias celulares.

6. CONCLUSÃO

Com base nos nossos resultados, pode-se concluir que:

- 1) O isolamento das células do CUM foi eficaz para as três regiões, tanto para a AU, VU e GW;
- 2) Houve a expressão de antígenos de superfície característicos de células mesenquimais nas três regiões do CUM;
- 3) As células de todas as regiões foram capazes de se diferenciarem em linhagens adipogênicas e osteogênicas;
- 4) Houve a expressão de marcadores de pluripotência em VU e GW;
- 5) A VU apresentou uma maior taxa de crescimento celular, comparada à AU.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, L., ROBERTS, M., WALTERS, P. *Biologia Molecular da Célula*. 4ªed. Porto Alegre: Artmed. 2004

ALISON, M. R., POULSOM, R., FORBES, S., WRIGHT, N. A. An introduction to stem cells. *J. Pathol.* 197:419-423. 2002

ANDREEVA, E.R., PUGACH, I.M., GORDON, D., OREKHOV, A.N. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell.* 30(1):127-35. 1998

BAKSH, D., YAO, R., TUAN, R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25(6): 1384-92. 2007

BATTULA, V.L., BAREISS, P.M., TREML, S., CONRAD, S., ALBERT, I., HOJAK, S., ABELE, H., SCHEWE, B., JUST, L., SKUTELLA, T., BÜHRING, H.J. 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):279-91. 2007

BEARZI C, LERI A, LO MONACO F, ROTA M, GONZALEZ A, HOSODA T, PEPE M, QANUD K, OJAIMI C, BARDELLI S, D'AMARIO D, D'ALESSANDRO DA, MICHLER RE, DIMMELER S, ZEIHHER AM, URBANEK K, HINTZE TH, KAJSTURA J, ANVERSA P. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(37):15885-90. 2009

BELTRAMI, A.P., BARLUCCHI, L., TORELLA, D., BAKER, M., LIMANA, .F, CHIMENTI, S., KASAHARA, H., ROTA, M., MUSSO, E., URBANEK, K., LERI, A., KAJSTURA, J., NADAL-GINARD, B., ANVERSA, P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 114(6):763-76. 2003

BJORNSON, C. R., R. L. RIETZE, REYNOLDS, B.A., MAGLI, M.C., VESCOVI, A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283(5401): 534-7. 1999

BOHELER, K.R., CZYZ, J., TWEEDIE, D., YANG, H.T., ANISIMOV, S.V., WOBUS, A.M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* 91:189–201. 2002

BROXMEYER, H. E., DOUGLAS, G.W. HANGOC, G., COOPER, S., BARD, J., ENGLISH, D., ARNY, M., THOMAS, L., BOYSE, E.A. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(10): 3828-32. 1989

BROXMEYER, H. E., GLUCKMAN, E., AUERBACH, A., DOUGLAS, G.W., FRIEDMAN, H., COOPER, S., HANGOC, G., KURTZBERG, J., BARD, J., BOYSE, E.A. Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Cell Cloning* 8 Suppl 1: 76-89; discussion 89-91. 1990

CAMPAGNOLI, C., ROBERTS, I.A., KUMAR, S., BENNETT, P.R., BELLANTUONO, I., FISK, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98(8): 2396-402. 2001

CAN A., KARAHUSEYINOGLU S. Concise review: human umbilical Cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 25(11): 2886-95. 2007

CARLIN R, DAVIS D, WEISS M, SCHULTZ B, TROYER D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 6;4:8. 2006

CARVALHO, A.B., QUINTANILHA, L.F., DIAS, J.V., PAREDES, B.D., MANNHEIMER, E.G., CARVALHO, F.G., ASENSI, K.D., GUTFILEN, B., FONSECA, L.M., RESENDE, C.M., REZENDE, G.F., TAKIYA, C.M., DE CARVALHO, A.C., GOLDENBERG, R.C. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells*. 26(5):1307-14. 2008

CHARBORD, P., NEWTON, I., VOILLAT, L., SCHAAL, J.P., HERVE, P. The purification of CD34 cells from human cord blood: comparison of separation techniques and cytokine requirements for optimal growth of clonogenic progenitors. *Br J Haematol* 94(3): 449-54. 1996

CHEN, N., KAMATH, S., NEWCOMB, J., HUDSON, J., GARBUZOVA-DAVIS, S., BICKFORD, P., DAVIS-SANBERG, C., SANBERG, P., ZIGOVA, T., WILLING, A. Trophic factor induction of human umbilical cord blood cells in vitro and in vivo. *J Neural Eng* 4(2): 130-45. 2007

CHIEN, C.C., YEN, B.L., LEE, F.K., LAI, T.H., CHEN, Y.C., CHAN, S.H., HUANG, H.I. *In vitro* differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells. *Stem Cells*. 24:1759-1768. 2006

CHULIÁ, F.Z., NODA, M. "Opening" the mesenchymal stem cell tool Box. Eur J Dent. 3(3): 240-9. 2009

CIAVARELLA, S., DAMMACCO, F., DE MATTEO, M., LOVERRO, G., SILVESTRIS, F. Umbilical cord mesenchymal stem cells: role of regulatory genes in their differentiation to osteoblasts. Stem Cells Dev. 18(8):1211-20. 2009

ClinicalTrials.gov. Disponível em <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00823316>. Acesso realizado em 03 de novembro de 2009

COHEN, Y., NAGLER, A. Umbilical cord blood transplantation-how, when and for whom? Blood Rev 18(3): 167-79. 2004

COLLETT, G. D., CANFIELD, A. E. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. Circ.Res. 96(9): 930-938, 2005

COVAS, D. T., SIUFI, J.L., SILVA, A.R., ORELLANA, M.D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. Braz J Med Biol Res 36(9): 1179-83. 2003

COVAS, D.T., PANEPUCCI, R.A., FONTES, A.M., SILVA, W.A. JR, ORELLANA, M.D., FREITAS, M.C., NEDER, L., SANTOS, A.R., PERES, L.C., JAMUR, M.C., ZAGO, M.A. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. Exp Hematol. 36(5):642-54. 2008

DAWN, B., BOLLI, R. Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. Basic Res. Cardiol. 100(6): 494-503. 2005

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol 28(8): 875-84. 2000

DE COPPI, P.D., BARTSCH, G., SIDDIGUI, M.M., XU, T., SANTOS, C.C., PERIN, L., MOSTOSLAVSKY, G., SERRE, A.C., SNYDER, E.Y., YOO, J.J., FURTH, M.E., SOKER, S., ATALA A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol. 25:100 –106. 2007

DOHERTY, M.J., ASHTON, B.A., WALSH, S., BERESFORD, J.N., GRANT, M.E., CANFIELD, A.E. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. J Bone Miner Res. 13(5):828-38. 1998

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., J., HORWITZ, E. Minimal criteria for defining

multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-7. 2006

DUMM, C.G. *Embriologia Humana: Atlas e Texto*. 1ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006

ERICES, A., CONGET, P., MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood." *Br J Haematol* 109(1): 235-42. 2000

ETCHEVERS, H. C.; VINCENT, C.; LE DOUARIN, N. M.; COULY, G. F. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development*. 128(7): 1059-1068. 2001

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

FARRINGTON-ROCK, C., CROFTS, N.J., DOHERTY, M.J., ASHTON, B.A., GRIFFIN-JONES, C., CANFIELD, A.E. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation*. 110(15):2226-32. 2004

FRIEDENSTEIN, A. J., GORSKAJA, J.F. KULAGINS, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4(5): 267-74. 1976

FRIEDMAN, R., BETANCUR, M., BOISSEL, L., TUNCER, H., CETRULO, C., KLINGEMANN, H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 13(12):1477-86. 2007

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):649-58. 2004

FUNK, P.E., STEPHAN, R.P., WITTE, P.L. Vascular cell adhesion molecule 1-positive reticular cells express interleukin-7 and stem cell factor in the bone marrow. *Blood*. 86(7):2661-71. 1995

GALMICHE, M.C., KOTELIANSKY, V.E., BRIÈRE, J., HERVÉ, P., CHARBORD, P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 82(1):66-76. 1993

GLUCKMAN, E., BROXMEYER, H.A. AUERBACH, A.D., FRIEDMAN, H.S., DOUGLAS, G.W., DEVERGIE, A., ESPEROU, H., THIERRY, D., SOCIE, G., LEHN, P., et al.

Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321(17): 1174-8. 1989

GLUCKMAN, E., ROCHA, V. Cord blood transplantation for children with acute leukaemia: a Eurocord registry analysis. *Blood Cells Mol Dis* 33(3): 271-3. 2004

GLUCKMAN, E., ROCHA, V. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. *Cytotherapy* 7(3): 219-27. 2005

GOODWIN, H. S., BICKNESE, A.R., CHIEN, S.N., BOGUCKI, B.D., QUINN, C.O., WALL, D.A. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 7(11): 581-8. 2001

HAKENBERG, P., KÖGLER, G., WERNET, P. NETCORD: a cord blood allocation network. *Bone Marrow Transplant* 22 Suppl 1: S17-8. 1998

HOU, L., CAO, H., WANG, D., WEI, G., BAI, C., ZHANG, Y., PEI, X. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Hematol.* 78(3):256-61. 2003

HOYNOWSKI, S.M., FRY, M.M., GARDNER, B.M., LEMING, M.T., TUCKER, J.R., BLACK, L., SAND, T., MITCHELL, K.E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 19;362(2):347-53. 2007

HUMEAU, L., BARDIN, F., MAROC, C., ALARIO, T., GALINDO, R., MANNONI, .P, CHABANNON, C. Phenotypic, molecular, and functional characterization of human peripheral blood CD34+/THY1+ cells. *Blood.* 1;87(3):949-55. 1996.

HUNG, S.C., CHEN, N.J., HSIEH, S.L., LI, H., MA, H.L., LO, W.H. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells.* 20(3):249-58. 2002

ICHINOHE, T., MARUYA E., SAJI, H. Long-term feto-maternal microchimerism: nature's hidden clue for alternative donor hematopoietic cell transplantation? *Int J Hematol* 76(3): 229-37. 2002

INCA. (2008, 13/05/2008). "Perguntas e Respostas sobre Sangue de Cordão Umbilical." Retrieved 16/12/2009, from http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2469.

ISHIGE, I., NAGAMURA-INOUE, T., HONDA, M.J., HARNPRASOPWAT, R., KIDO, M., SUGIMOTO, M., NAKAUCHI, H., TOJO, A. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol.* 90(2): 261-9. 2009

JAVAZON, E.H., COLTER, D.C., SCHWARZ, E.J., PROCKOP, D.J. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells.* 19(3):219-25. 2001

JAZEDJE, T., SECCO, M., VIEIRA, N.M., ZUCCONI, E., GOLLOP, T.R., VAINZOF, M., ZATZ, M. Stem cells from umbilical cord blood do have myogenic potential, with and without differentiation induction in vitro. *J Transl Med.* 14;7:6. 2009

JOGGERST, S.J.; HATZOPOULOS, A.K. Stem cell therapy for cardiac repair:benefits and barriers. *Expert Rev Mol Med.* 8;11:e20. 2009

JOMURA, S., UY, M., MITCHELL, K., DALLASEN, R., BODE, C.J., XU, Y. Potential treatment of cerebral global ischemia with Oct-4+ umbilical cord matrix cells. *Stem Cells.* Jan;25(1):98-106. 2007

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Histologia Básica.* 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp 206-220. 2004

JUNYING, Y.; THOMSON J.A. Pluripotent stem cell lines. *Genes dev.* 22. 1987-1997. 2008

KARAHUSEYINOGLU, S., CINAR, O., KILIC, E., KARA, F., AKAY, G.G., DEMIRALP, D.O., TUKUN, A., UCKAN, D., CAN, A. Biology of the stem cells in human umbilical cord stroma: In situ and in vitro surveys. *Stem Cells.* 25:319 –331. 2007

KADIVAR, M., KHATAMI, S., MORTAZAVI, Y., SHOKRGOZAR, M.A., TAGHIKHANI, M., SOLEIMANI, M. In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 340(2): 639-47. 2006

KADNER, A., S. P. HOERSTRUP, S.P., TRACY, J., BREYMAN, C., MAURUS, C.F., MELNITCHOUK, S., KADNER, G., ZUND, G., TURINA M. Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. *Ann Thorac Surg* 74(4): S1422-8. 2002

KANG, X.Q., ZANG, W.J., BAO, L.J., LI, D.L., SONG, T.S., XU, X.L., YU, X.J. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol.* 21;11(47):7461-5. 2005

KERMANI, A.J., FATHI, F., MOWLA, S.J. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. *Rejuvenation Res.* 11(2):379-86. 2008

KERN, S., EICHLER, H., STOEVE, J., KLÜTER, H., BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 24:1294 –1301. 2006

KESTENDJIEVA, S., KYURKCHIEV, D., TSVETKOVA, G., MEHANDJIEV, T., DIMITROV, A., NIKOLOV, A., KYURKCHIEV, S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol Int.* 32(7):724-32. 2008

KIM, B.O., TIAN, H., PRASONGSUKARN, K., WU, J., ANGOULVANT, D., WNENDT, S., MUHS, A., SPITKOVSKY, D., LI, R.K. Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation.* 30;112(9 Suppl):I96-104. 2005

KOBAYASHI, K., KUBOTA, T. ASO, T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of alpha-smooth muscle actin. *Early Hum Dev* 51(3): 223-33. 1998

KOGLER, G., SENSKEN, S. AIREY, J.A., TRAPP, T., MÜSCHEN, M., FELDHAHN, N., LIEDTKE, S., SORG, R.V., FISCHER, J., ROSENBAUM, C., GRESCHAT, S., KNIPPER, A., BENDER, J., DEGISTIRICI, O., GAO, J., CAPLAN, A.I., COLLETTI, E.J., ALMEIDA-PORADA, G., MÜLLER, H.W., ZANJANI, E., WERNET, P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200(2): 123-35. 2004

KOGLER, G., SENSKEN, S. WERNET, P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp Hematol* 34(11): 1589-95. 2006

KOSZTOWSKI, T., ZAIDI, H.A., QUIÑONES-HINOJOSA, A. Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther.* 9(5):597-612. 2009

KNOBLICH, J.A.. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 22;132(4):583-97. 2008

LA ROCCA G, ANZALONE R, CORRAO S, MAGNO F, LORIA T, LO IACONO M, DI STEFANO A, GIANNUZZI P, MARASÀ L, CAPPELLO F, ZUMMO G, FARINA F. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol*. 131(2):267-82. 2008

LARSEN, W.J. *Human Embryology*. 2^aed. New York: Churchill Livingstone Inc. 1997

LASTRES, P., LETAMENDÍA, A., ZHANG, H., RIUS, C., ALMENDRO, N., RAAB, U., LÓPEZ, L.A., LANGA, C., FABRA, A., LETARTE, M., BERNABÉU, C. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J. Cell Biol*. 133(5):1109-21. 1996

LEBLOND, C.P. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. *Natl Cancer Inst Monogr* 14, 119-150. 1964

LEE, J.W., KIM, Y.H., KIM, S.H., HAN, S.H., HAHN, S.B. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J*. 30;45 Suppl:41-7. 2004

LEE, M.W., CHOI, J., YANG, M.S., MOON, Y.J., PARK, J.S., KIM, H.C., KIM, Y.J. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun*. 16;320(1):273-8. 2004

LOVELL, M. J., MATHUR, A. The role of stem cells for treatment of cardiovascular disease. *Cell Prolif*. 37(1):67-87. 2004

LU, L.L. LIU, Y.J., YANG, S.G. ZHAO, Q.J., WANG, X., GONG, W., HAN, Z.B., XU, Z.S., LU, Y.X., LIU, D., CHEN, ZZ, HAN Z.C. Isolation and characterization of human umbilical Cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 91(8):1017-26. 2006

LUND, R.D., WANG, S., LU, B., GIRMAN, S., HOLMES, T., SAUVÉ, Y., MESSINA, D.J., HARRIS, I.R., KIHM, A.J., HARMON, A.M., CHIN, F.Y., GOSIEWSKA, A., MISTRY, S.K. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells*. 25(3):602-11. 2007

MA, N., Y. LADILOV, Y., KAMINSKI, A., PIECHACZEK, C., CHOI, Y.H., LI, W., STEINHOFF, G., STAMM, C. Umbilical cord blood cell transplantation for myocardial regeneration. *Transplant Proc* 38(3): 771-3. 2006

MARCUS, A.J., COYNE, T.M., RAUCH, J., WOODBURY, D., BLACK, I.B. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation*. 76(2):130-44. 2008

MARCUS, A.J., WOODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *J Cell Mol Med*. 12(3):730-42. 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): 1099-100. 2001

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

MARTINEZ-FRIAS, M.L., BERMEJO E., RODRÍGUEZ-PINILLA E., PRIETO D. Does single umbilical artery (SUA) predict any type of congenitaç defect? Clinical-epidemiological analysis of a large consecutive series of malformed infants. *Am J Med Genet A* 146A(1):15-25. 2008

McCULLOCH, E.A., TILL, J.E. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res*. 13:115-25. 1960

MEIRELLES L.S., CAPLAN, A.I., NARDI, N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 26(9):2287-99. 2008

MEIRELLES, L. S., NARDI, N.B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci*. 14:4281-4298. 2009

MIKI, T., LEHMANN, T., CAI, H., STOLZ, D.B., STROM, S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 23: 1549-59. 2005

MITCHELL, K. E., WEISS, M.L. MITCHELL, B.M., MARTIN, P., DAVIS, D., MORALES, L., HELWIG, B., BEERENSTRAUCH, M., ABOU-EASA, K., HILDRETH, T., TROYER, D., MEDICETTY, S. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia." *Stem Cells* 21(1): 50-60. 2003

MOORE, B.E., QUESENBERRY, P.J. The adult hemopoietic stem cell plasticity debate: idols vs new paradigms. *Leukemia*. 17:1.205-1.210. 2003

MOORE, K.L., PERSAUD T.V.N. Embriologia Clínica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p.114-45, 2008

MUROHARA, T., IKEDA, H., DUAN, J., SHINTANI, S., SASAKI, K., EGUCHI, H., ONITSUKA, I., MATSUI, K., IMAIZUMI, T.. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. J Clin Invest. 105(11):1527-36. 2000

NAKAHATA, T., OGAWA, M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. J Clin Invest 70(6): 1324-8. 1982

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Disponível em www.nih.gov. Acesso realizado em 20 de outubro de 2009. NIH 2009

OLIVARES, E.L., RIBEIRO, V.P., WERNECK DE CASTRO, J.P., RIBEIRO, K.C., MATTOS, E.C., GOLDENBERG, R.C., MILL, J.G., DOHMANN, H.F., DOS SANTOS, R.R., DE CARVALHO, A.C., MASUDA, M.O. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Aug;287(2):H464-70. 2004

O'RAHILLY, R., MULLER, F. Embriologia e Teratologia Humanas. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005

PANEPUCCI, R. A., SIUFI, J.L., SILVA, W.A. JR, PROTO-SIQUIERA, R., NEDER, L., ORELLANA, M., ROCHA, V., COVAS, D.T., ZAGO, M.A. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 22(7): 1263-78. 2004

PAPPA, K.I., ANAGNOU, N.P. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? Regen Med. 4(3):423-33. 2009

PARK, K. S., JUNG, K.H., KIM, S.H., KIM, K.S., CHOI, M.R., KIM, Y., CHAI, Y.G. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. Stem Cells 25(8): 2044-52. 2007

PARODY, R., MARTINO, R., ROVIRA, M., VAZQUEZ, L., VÁZQUEZ, M.J., DE LA CÁMARA, R., BLAZQUEZ, C., FERNÁNDEZ-AVILÉS, F., CARRERAS, E., SALAVERT, M., JARQUE, I., MARTÍN, C., MARTÍNEZ, F., LÓPEZ, J., TORRES, A., SIERRA, J., SANZ, G.F. Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell

transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12(7): 734-48. 2006

PERIN, L., SEDRAKYAN, S., DA SACCO, S., DE FILIPPO, R. Characterization of human amniotic fluid stem cells and their pluripotential capability. *Meth Cell Biol.* 86:85-99. 2008

PIMENTEL-COELHO, P.M., MAGALHÃES, E.S., LOPES, L.M., DE AZEVEDO, L.C., SANTIAGO, M.F., MENDEZ-OTERO, R. Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells Dev.* 2009

PINHO-RIBEIRO, V.; MAIA, A. C.; WERNECK-DE-CASTRO, J. P.S.; OLIVEIRA, P.F.; GOLDENBERG, R. C. S.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C. Umbilical cord cells in infarcted rats. *Braz J Med Biol Res.* 43(3). 290-296. 2010

PRAT-VIDAL, C., ROURA, S., FARRÉ, J., GÁLVEZ, C., LLACH, A., MOLINA, C.E., HOVE-MADSEN, L., GARCIA, J., CINCA, J., BAYES-GENIS, A. Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits. *Transplant Proc.* 39(7):2434-7. 2007

PRUSA, A.R., MARTON, E., ROSNER, M., FREILINGER, A., BERNASCHEK, G., HENGSTSCHLÄGER, M. Stem cell marker expression in human trisomy 21 amniotic fluid cells and trophoblasts. *J Neural Transm* (67):235-42. 2003

QIAO C, XU W, ZHU W, HU J, QIAN H, YIN Q, JIANG R, YAN Y, MAO F, YANG H, WANG X, CHEN Y. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int.* 32(1):8-15. 2007

RAO, M.S., MATTSON, M.P. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev.* 31;122(7):713-34. 2001

ROMANOV, Y. A., SVINTSITSKAYA, V.A., SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21(1): 105-10. 2003

RUBINSTEIN, P., ROSENFELD, R.E., ADAMSON, J.W., STEVENS, C.E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 81(7): 1679-90. 1993

RUBINSTEIN, P., STEVENS, C.E., ADAMSON, J.W., MIGLIACCIO, G. Umbilical cord blood cells: informed consent. *Bone Marrow Transplant* 15(1): 160. 1995

SARUGASER, R., D. LICKORISH, D., BAKSH, D., HOSSEINI, M.M., DAVIES, J.E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23(2): 220-9. 2005

SECCO M, ZUCCONI E, VIEIRA NM, FOGAÇA LL, CERQUEIRA A, CARVALHO MD, JAZEDJE T, OKAMOTO OK, MUOTRI AR, ZATZ M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 26(1):146-50. 2008

SIVAPRAKASAM, P., CARR, T.F., COUSSONS, M., KHALID, T., BAILEY, A.S., GUIVER, M., MUTTON, K.J., TURNER, A.J., GRAINGER, J.D., WYNN, R.F. Improved outcome from invasive adenovirus infection in pediatric patients after hemopoietic stem cell transplantation using intensive clinical surveillance and early intervention. *J Pediatr Hematol Oncol*. 29(2): 81-5. 2007

SORDI, V., MALOSIO, M.L., MARCHESI, F., MERCALLI, A., MELZI, R., GIORDANO, T., BELMONTE, N., FERRARI, G., LEONE, B.E., BERTUZZI, F., ZERBINI, G., ALLAVENA, P., BONIFACIO, E., PIEMONTI, L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*. 106(2):419-27. 2005

TAMAGAWA, T., OI, S., ISHIWATA, I., ISHIKAWA, H., NAKAMURA, Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Hum Cell*. 20(3):77-84. 2007

THOMSON, J.A., KALISHMAN, J., GOLOS, T.G., DURNING, M., HARRIS, C.P., BECKER, R.A., AND HEARN, J.P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 92: 7844–7848. 1995

THOMSON, J.A., KALISHMAN, J., GOLOS, T.G., DURNING, M., HARRIS, C.P., AND HEARN, J.P. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod*. 55: 254–259. 1996

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

TROYER, D.L., WEISS, M.L Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 26(3):591-9. 2008

TSAI, M.S., LEE, J.L., CHANG, Y.J., HWANG, S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* 19(6):1450-6. 2004

van de VEN, C., COLLINS, D., BRADLEY, M.B., MORRIS, E., CAIRO, M.S. The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration. *Exp Hematol* 35(12): 1753-65. 2007

WAGERS, A. J., R. I. SHERWOOD, CHRISTENSEN, J.L., WEISSMAN, I.L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297(5590): 2256-9. 2002

WAGNER, J. E., BROXMEYER, H.E., BYRD, R.L., ZEHNBAUER, B., SCHMECKPEPER, B., SHAH, N., GRIFFIN, C., EMANUEL, P.D., ZUCKERMAN, K.S., COOPER, S. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood* 79(7): 1874-81. 1992

WANG HS, HUNG SC, PENG ST, HUANG CC, WEI HM, GUO YJ, FU YS, LAI MC, CHEN CC. Stem Cells. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. 22(7):1330-7. 2004

WEISS, M. L., S. MEDICETTY, S., BLEDSOE, A.R., RACHAKATLA, R.S., CHOI, M., MERCHAV, S., LUO, Y., RAO, M.S., VELAGALETI, G., TROYER, D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 24(3): 781-92. 2006

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): 368-74. 2003

WOHLGEMUTH B, BORTE G. The 150th birthday of Julius Cohnheim. *Z Arztl Fortbild (Jena)*. 83(14):743-5. 1989

WU, K.H., ZHOU, B., MO, X.M., CUI, B., YU, C.T., LU, S.H., HAN, Z.C., LIU, Y.L. Therapeutic potential of human umbilical cord-derived stem cells in ischemic diseases. *Transplant Proc.* 39(5):1620-2. 2007

YAMANAKA, S. A fresh look at iPS cells. *Cell.* 3;137(1):13-7. 2009

YAMASHITA, J.; ITOH, H.; HIRASHIMA, M.; OGAWA, M.; NISHIKAWA, S.; YURUGI, T., NAITO, M., NAKAO, K., NISHIKAWA, S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*. 408(6808): 92-96. 2000

YEN, B.L., HUANG, H.I., CHIEN, C.C., JUI, H.Y., KO, B.S., YAO, M., SHUN, C.T., YEN, M.L., LEE, M.C., CHEN, Y.C. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*. 23: 3-9. 2005

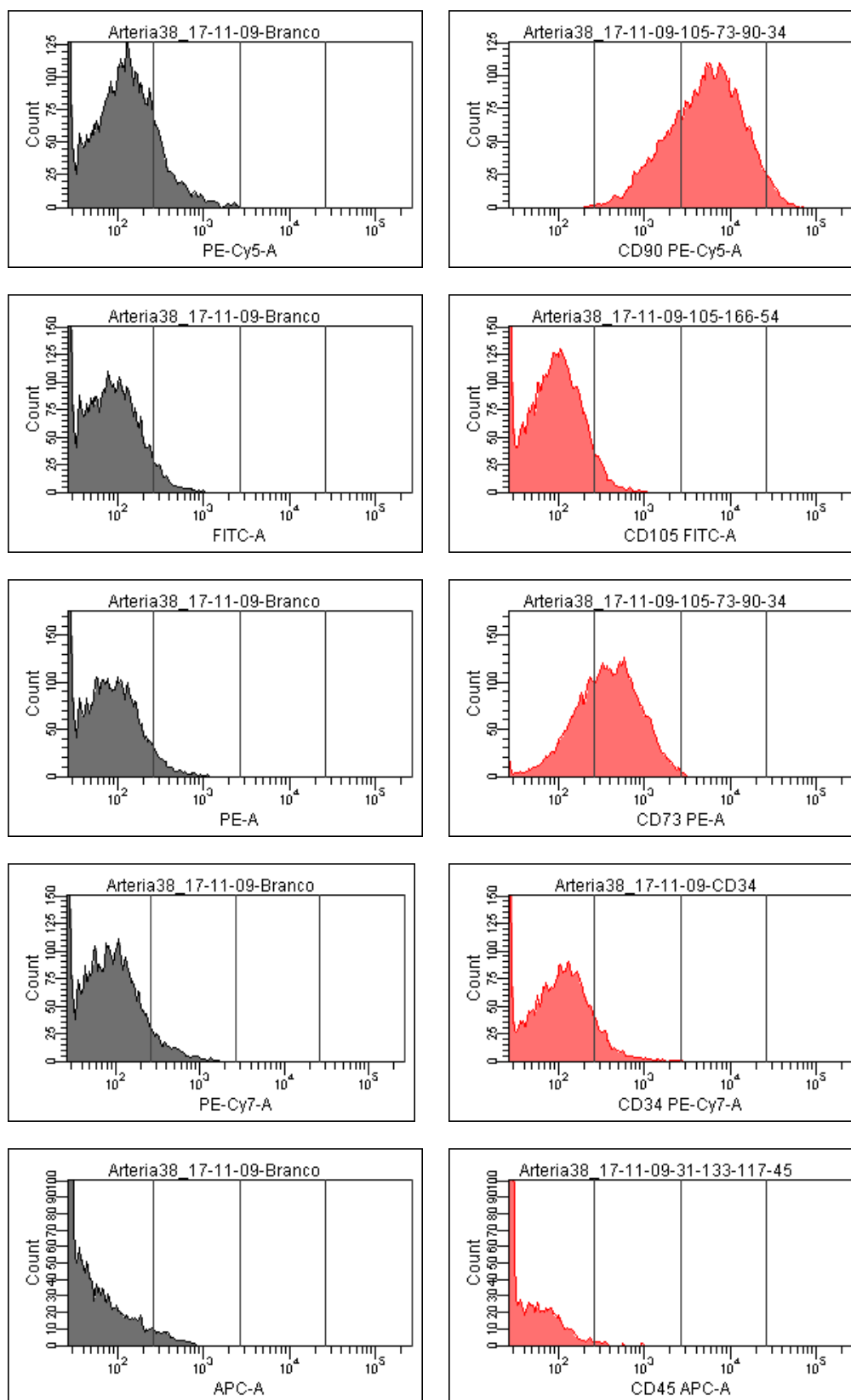
ZHANG, H.J., SIU, M.K., WONG, E.S., WONG, K.Y., LI, A.S., CHAN, K.Y., NGAN, H.Y., CHEUNG, A.N. Oct4 is epigenetically regulated by methylation in normal placenta and gestational trophoblastic disease. *Placenta*. 29(6):549-54. 2008

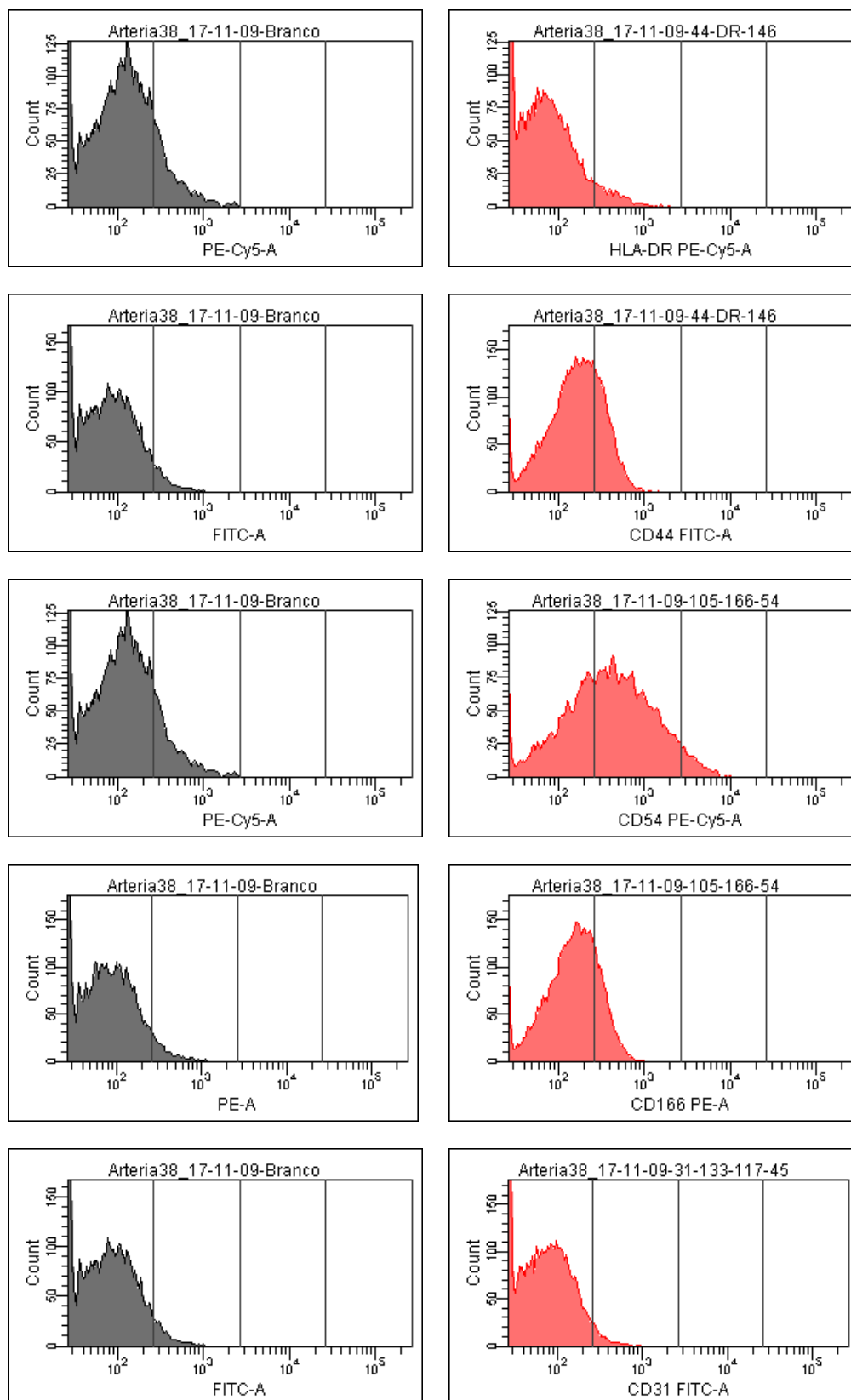
Anexo I – Principais características das Moléculas CD

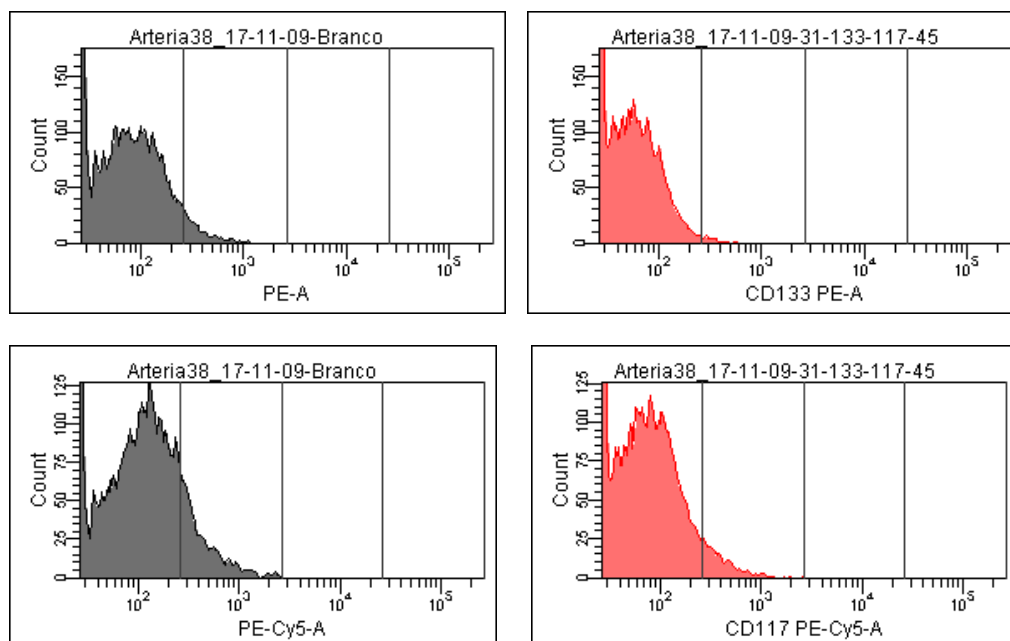
Monoclonal	Clone	Marca	Sinônimos Comuns	Principais/Possíveis funções
CD90 PE-CY5	5 E10	BD	Thy-1	Marcador para linfócito T; papel na ativação de linfócitos T (?); Inibe a diferenciação das CTHs
CD105 FITC	166707	Immunostep	Endoglina	Liga-se a TGF- β ; modula respostas celulares a TGF- β
CD73 PE	AD2	BD	Ecto-5'-nucleotidase	sinalização nos linfócitos T; protege contra inflamação vascular
CD34 PE-CY7	8Y12	BD	Gp 105-120	Adesão célula-célula, inibe a diferenciação hematopoética (?)
CD45 APC	2D1	BD	Antígeno comum dos leucócitos (LCA)	Sinalização mediada pelo receptor antigênico de linfócitos T e B
HLA-DR PE-CY5	TU36	BD	MHC classe II	Reconhecimento imune e apresentação de antígenos
CD44 FITC	L178	BD	H-CAM	Adesão célula-célula e célula-matriz; estimula a proliferação e migração celular
CD54 PE-CY5	HA58	BD	ICAM-1	Adesão de neutrófilos ao endotélio do sítio de inflamação
CD166 PE	3A6	BD	ALCAM	Molécula de adesão; envolvida na hemopoiese e angiogênese embrionária
CD31 FITC	WM59	BD	PECAM-1	Molécula de adesão envolvida na diapedese de leucócitos, e adesão em células endoteliais.
CD133 PE	293C3	Macs	AC133	Presente em progenitores endoteliais; funções não conhecidas (?)
CD117 PercP-CY5.5		BD	c-kit	Liga-se ao ligante de c-Kit e medeia seus efeitos biológicos; relacionado à sobrevivência das CTHs

Adaptado de Protein Reviews on the web (PROW), <http://prow.nci.nih.gov/default.htm>

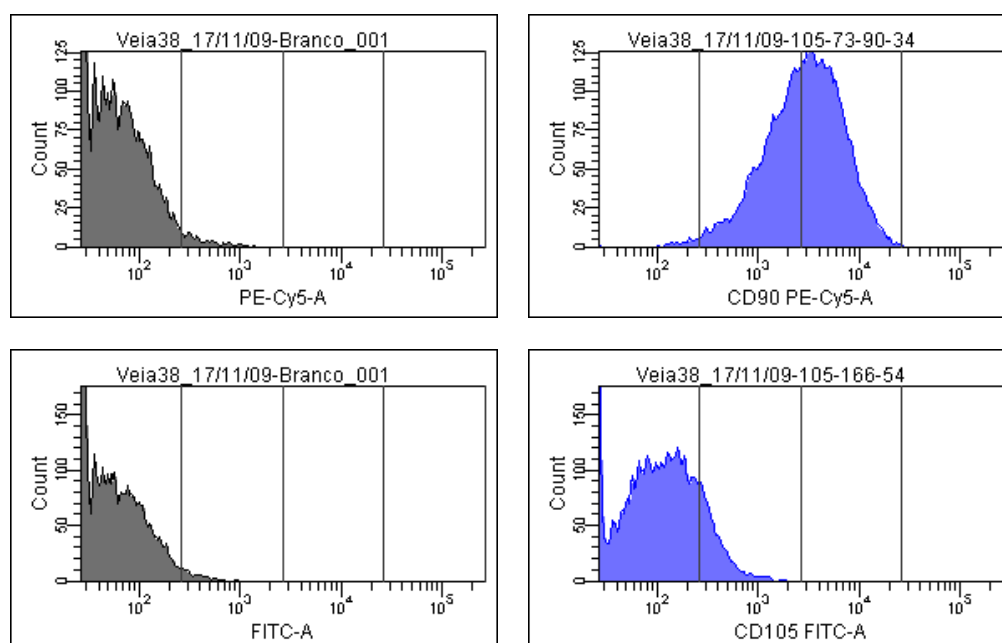
Anexo II – Histogramas de citometria de fluxo

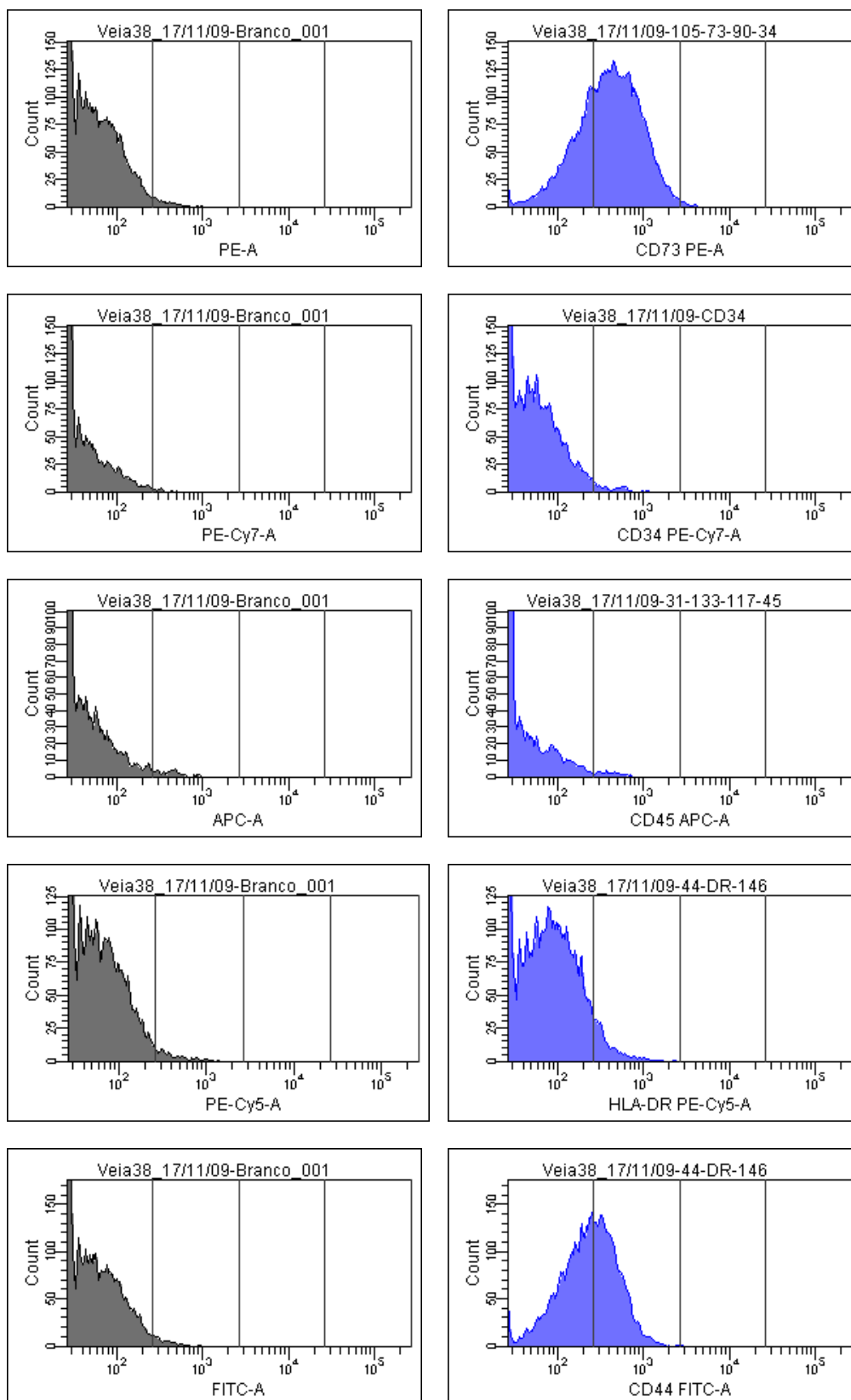


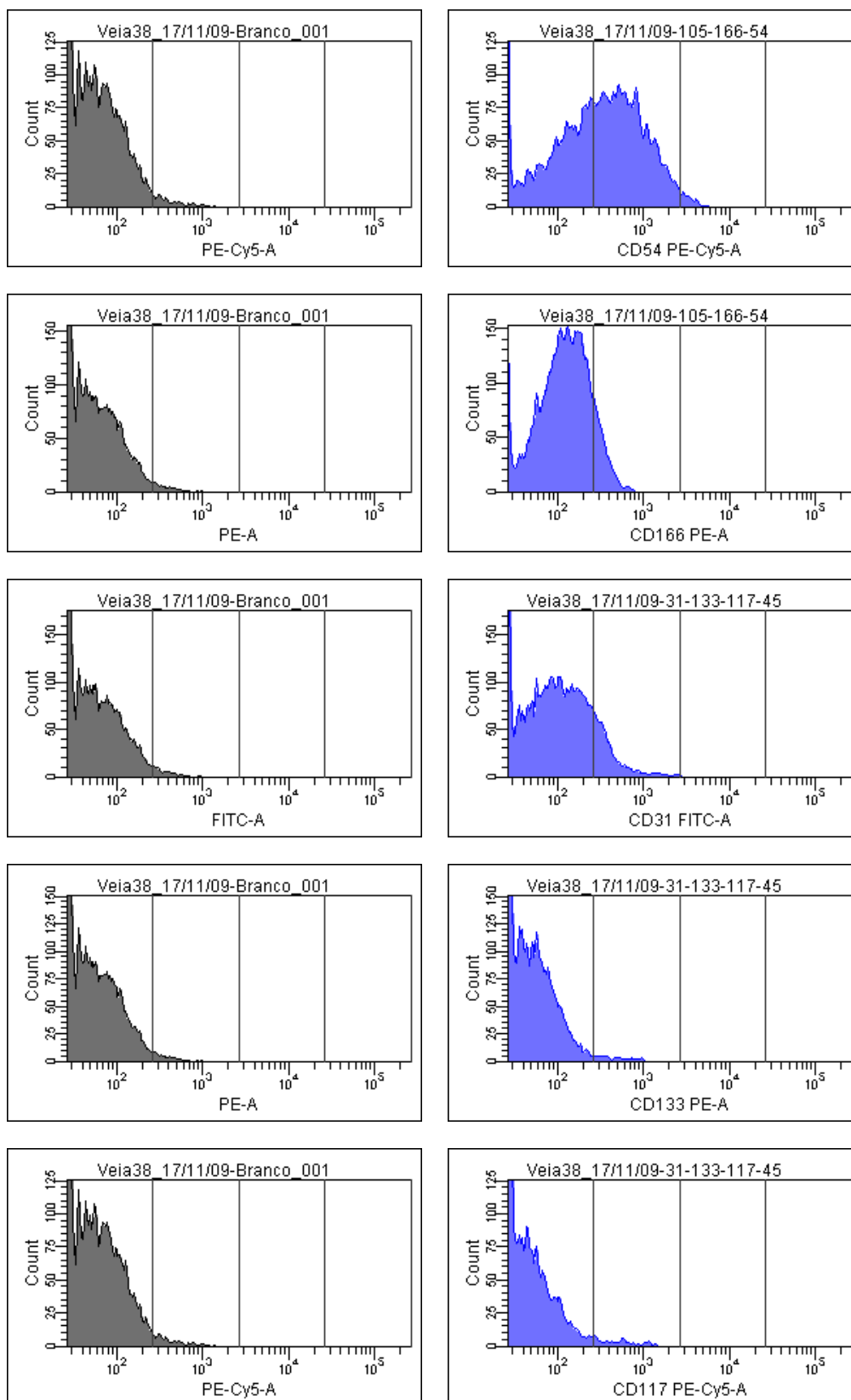




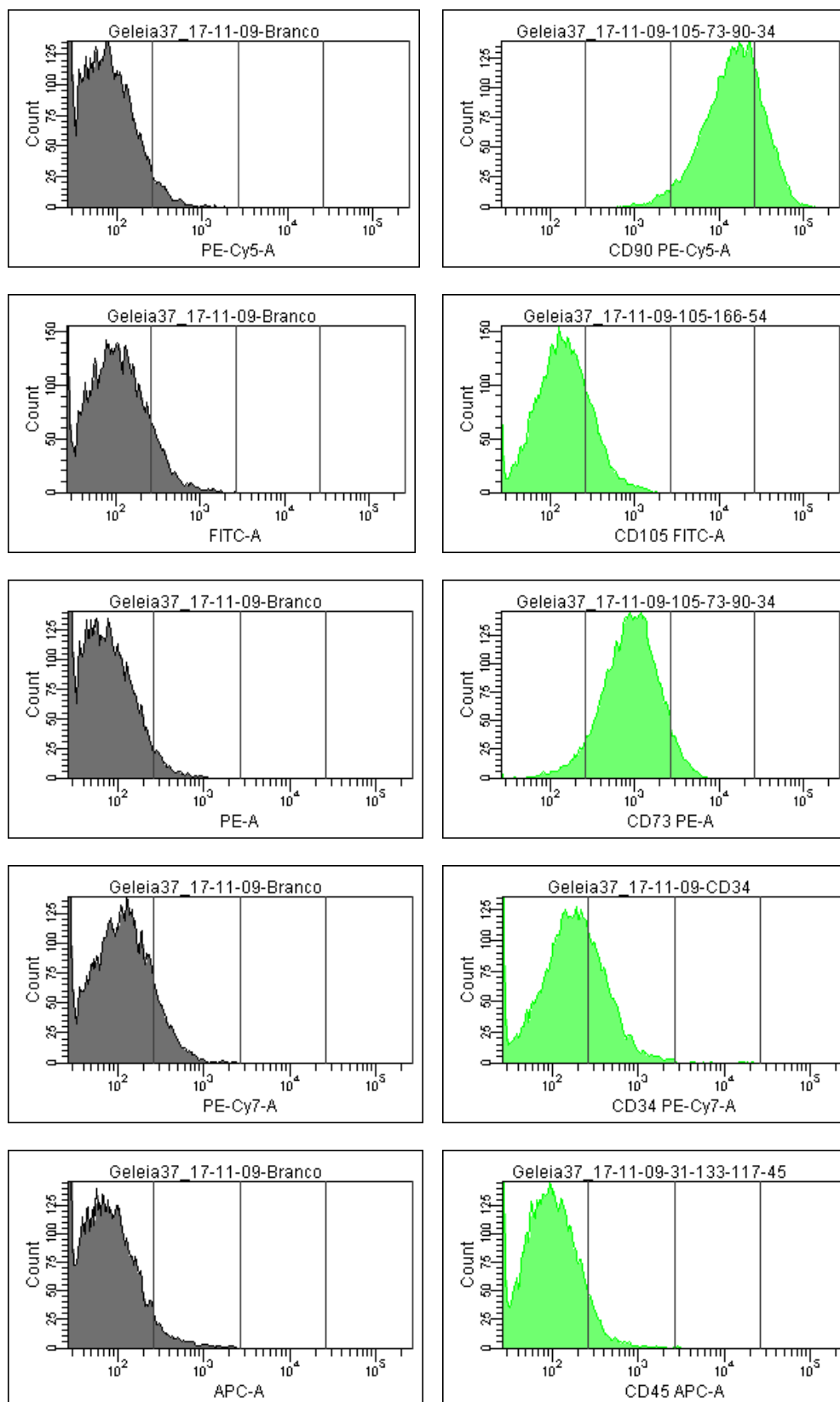
Histogramas ilustrativos das células de AU em P3. Em cinza, células não marcadas (branco) e em vermelho, células da AU com os anticorpos específicos.

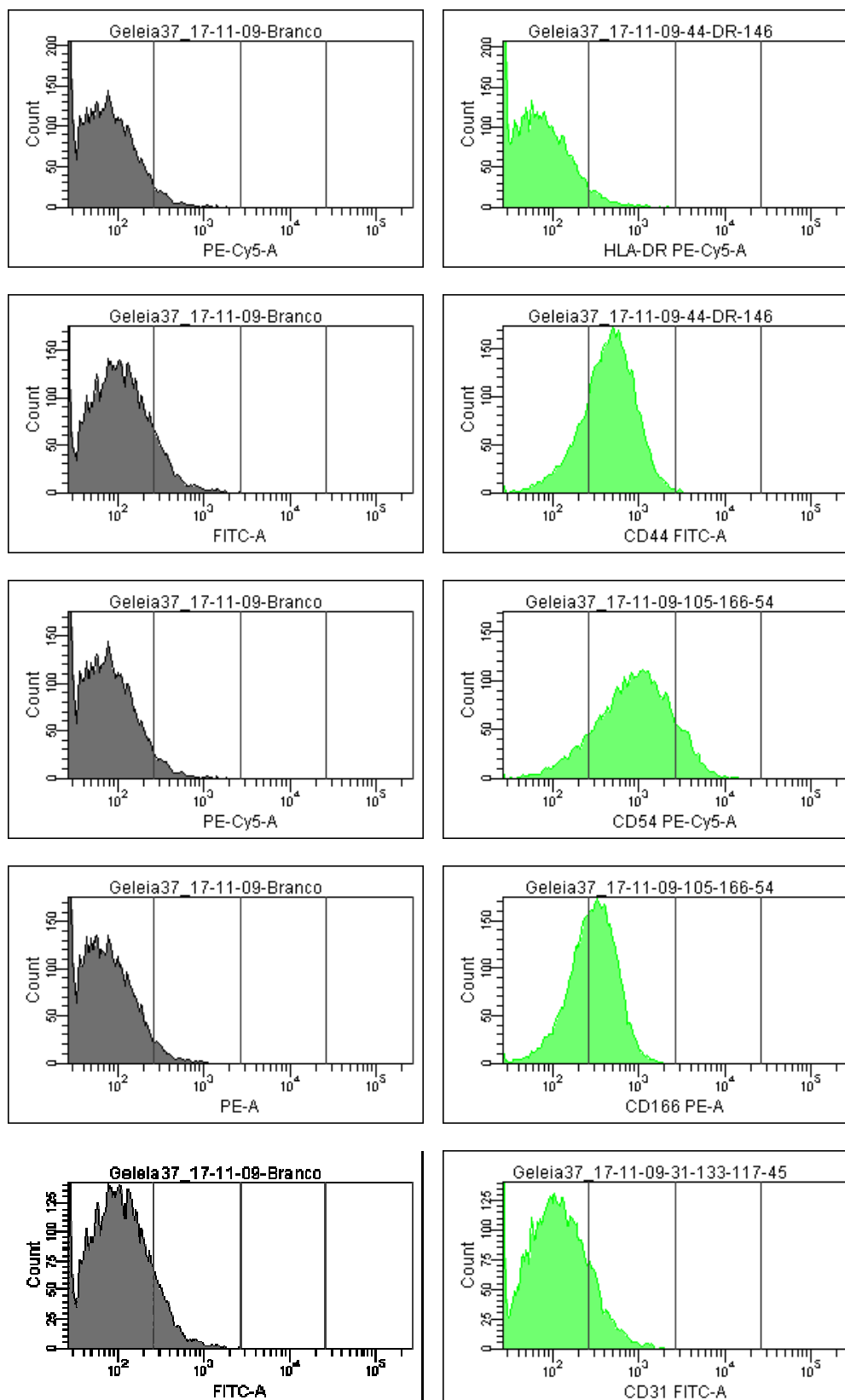


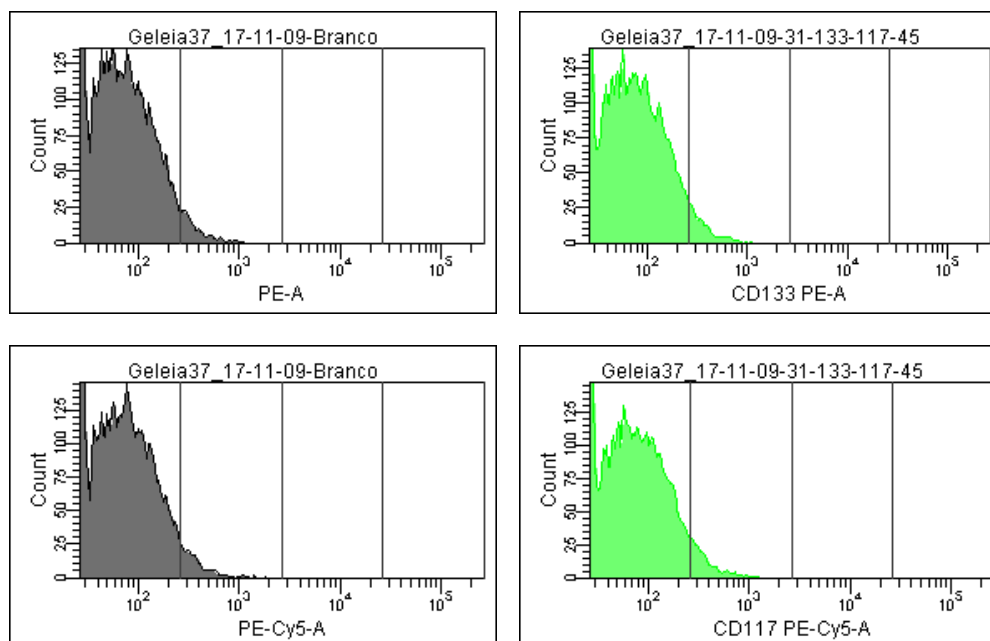




Histogramas ilustrativos das células de VU em P3. Em cinza, células não marcadas (branco) e em azul, células da VU com os anticorpos específicos.

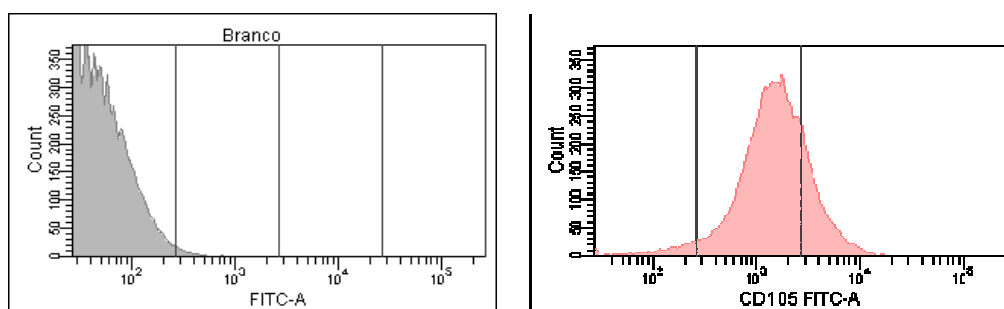






Histogramas ilustrativos das células de GW em P3. Em cinza, células não marcadas (branco) e em verde, células da GW com os anticorpos específicos.

Anexo III – Histogramas de citometria de fluxo de CD105 nas CTM de medula óssea



Histogramas ilustrativos das CTM de medula óssea em P3. Em cinza, células não marcadas (branco) e em rosa, células da CTM de medula óssea com os anticorpos específicos.

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](#)