



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

*Isolamento, expansão e diferenciação
osteogênica de células-tronco mesenquimais
obtidas de cordão umbilical humano*

ALDENISE LIZANDRA DE MIRANDA OLIVEIRA

RECIFE, 2010

ALDENISE LIZANDRA DE MIRANDA OLIVEIRA

***Isolamento, expansão e diferenciação
osteogênica de células-tronco mesenquimais
obtidas de cordão umbilical humano***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia, em agosto de 2010.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Márcia Bezerra da Silva

RECIFE, 2010

Oliveira, Aldenise Lizandra de Miranda

Isolamento, expansão e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais obtidas de cordão umbilical humano/ Aldenise Lizandra de Miranda Oliveira. – Recife: O Autor, 2010.

77 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Oleg Vladimirovich Krasilnikov

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica e fisiologia, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Células – tronco 2. Cordão umbilical 3. Osteogênese I. Título.

616.027 74

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 134

“Isolamento, expansão e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais obtidas de cordão umbilical humano”

Aldenise Lizandra de Miranda Oliveira

Banca Examinadora



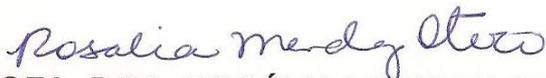
**PROF. DR. OLEG VLADIMIROVICH KRASILNIKOV – PRESIDENTE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**



**PROFA. DRA. BELMIRA LARA DA SILVEIRA ANDRADE DA COSTA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**



**PROFA. DRA. ANA DURCE OLIVEIRA DA PAIXÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**



**PROFA. DRA. ROSÁLIA MENDEZ-OTERO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

RECIFE, 31 de AGOSTO de 2010

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais (Lourdes e Antonio) por me apoiarem e ajudarem a ser quem hoje sou e também aos meus avós Inácia, Amara e Paulo (*in memoriam*) pessoas que amo e admiro muito.

Serei eternamente grata a vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida. A minha família querida (meus pais Lourdes e Antonio, irmãs Li e Letícia, meus avós e tios, Marcelo e tia Roseane, Ru e Serginho) que me apóia sempre, pelo amor que me transmitem e sem o qual não conseguiria viver. A meu amado namorado “Carlos André” pelo carinho e incentivo a mim dedicados, pela compreensão e apreensão divididas.

Ao professor Oleg pela oportunidade e confiança cedidas. A Dijanah, minha grande amiga, pela presença inigualável em minha vida pessoal e profissional – um anjo em minha vida, um exemplo para mim. A professora Márcia pelos ensinamentos passados. A Valéria por sempre ser tão disponível. A minha amiga Darlene, que lutou e perdeu o sono comigo para que eu concluísse mais essa etapa em minha vida – uma figura!! A quem eu exploro descaradamente, mas admiro bastante, e a sua família que me acolheu com carinho.

Agradeço também a toda equipe LBM – Laboratório de Biofísica das Membranas – ao pessoal das células: Layse, Gisele, Alberto, Willamis, Jéssica e Elga; a Sheilinha e a todo pessoal dos sensores. Aos “quebra-galhos”: professor Cláudio, Reginaldo, Júnior (Janilson) e a seu Fredson, essenciais na minha jornada. A Thiago, Diego, Carlos, Raquel-Luciano, Nadja e todas pessoas que se preocuparam comigo, obrigada pela força e torcida.

Que Deus abençoe a todos vocês.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 As células-tronco, localização e classificações:	12
2.2 Células-tronco em cordão umbilical:	15
2.2.1 Características das CTM <i>ex vivo</i>	17
a) Isolamento:.....	17
b) Morfologia:	18
c) Caracterização:.....	18
d) Proliferação:.....	19
e) Diferenciação:.....	20
2.3 Nicho das células-tronco, maturação celular e câncer:	21
2.4 Terapia celular:	28
3. OBJETIVOS	33
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
5. ARTIGO CIENTÍFICO	42
6. CONCLUSÕES	67
7. PERSPECTIVAS	68
8. ANEXOS	69
Anexo I: Parecer do comitê de ética em pesquisa da UFPE:	69
Anexo II: Termo de consentimento livre e esclarecido:.....	72
Anexo III: Trabalho enviado à FeSBE 2009:.....	74
Anexo IV: Trabalho enviado ao IV Simpósio Internacional de Terapias Avançadas e.....	75
Anexo V: Instruções da revista aos autores do periódico do trabalho:.....	76

RESUMO

As células-tronco são dotadas de capacidade de auto-renovação e diferenciação, que têm os tecidos adultos como uma de suas fontes. Essas células podem ser expandidas em cultura e dar origem a múltiplas linhagens. Dentre as células-tronco adultas, as mesenquimais ocupam posição de destaque, uma vez que são células multipotentes com capacidade de originar osteoblastos, adipócitos, condrócitos, neurônios e hepatócitos. Células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical são funcionalmente similares às derivadas de medula óssea (fonte clássica). Esse tecido apresenta-se como atraente fonte alternativa dessas células também por: existir em abundância, ser normalmente descartado pós-parto, além do procedimento para sua coleta não ser invasivo. No momento, a terapia celular representa grande esperança na medicina regenerativa devido à perspectiva de se reparar a perda de tecidos e/ou até mesmo órgãos nobres do corpo. As pesquisas com células-tronco ainda estão num estágio onde muitas questões científicas precisam ser resolvidas até suas aplicações se tornarem definitivas. Existem inúmeros métodos de isolamento dependendo tanto da origem do tecido, quanto dos procedimentos adotados pelos laboratórios. Neste trabalho analisamos a obtenção de células-tronco da geléia de Wharton de cordão umbilical humano através do método da “migração espontânea”. Todos os experimentos foram realizados de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (nº.420/2007). O isolamento de células-tronco foi feito a partir da população primária de células mesenquimais. Utilizamos, para isso uma nova metodologia da seleção celular - imunomagnética ”column-free” conhecida como “*EasySep Magnet - EMA*”, no modo de seleção positiva pelo CD44 ou CD90. A eficácia do isolamento foi comprovada por citometria de fluxo (*FACSCalibur*). A mesma metodologia foi utilizada para detecção da expressão dos marcadores de superfície nas membranas citoplasmáticas das células (fenotipagem). A diferenciação osteogênica foi induzida durante três semanas com meio de cultura suplementado com indutores: ácido ascórbico, dexametasona e β -glicerofosfato. Observamos que as células primárias da “migração espontânea” (terceira passagem) mostraram presença até 70-80% de células positivas aos marcadores das células-tronco mesenquimais. Todavia, nas culturas das células selecionadas mais de 90% das células foram positivas para os marcadores das células-tronco mesenquimais (CD90+; CD44+; CD29+) e negativas para as de origem hematopoéticas (CD45-; CD34- e CD31-). O tempo de duplicação das células-tronco foi de 2-3 dias. As células tiveram morfologia fibroblastóide e possuíram potencial de diferenciação pronunciado. Especificamente, o estímulo osteogênico originou características osteoblásticas que foram comprovadas por coloração citohistoquímica (von Kossa) onde se observou o aparecimento de cristais de hidroxiapatita na matriz extracelular. Desta forma, estabelecemos que a “migração espontânea” é um método relativamente simples, que requer menos tempo de processamento e resulta em considerável quantidade das células com alto índice de marcadores específicos das células-tronco já na população primária obtida. A seleção positiva com partículas magnéticas é capaz de aumentar ainda mais a pureza das células-tronco isoladas de cordão umbilical humano.

Palavras-chave: Células-tronco; Geléia de Wharton; Migração espontânea; Seleção Positiva; Diferenciação osteogênica.

ABSTRACT

Stem cells are cells with capacity for self-renewal and differentiation. These cells can be isolated from all tissues of adult organisms, expanded in culture and derived in multiple lineages. Mesenchymal cells occupy a prominent position among adult stem cells. They are multipotent cells that can differentiate into osteoblasts, adipocytes, chondrocytes, neurons and hepatocytes. Mesenchymal stem cells derived from umbilical cord are functionally similar to those derived from bone marrow (classical source). Umbilical cord is an attractive alternative to bone marrow as source of mesenchymal stem cells because umbilical cord is normally discarded after birth, and the procedure for its collection is non-invasive. Currently, cell therapy represents a great hope in regenerative medicine because of the prospect of repairing damaged tissues or even the creation of the entire organs of the body. Stem cell research is still at a stage where many scientific issues need to be solved before their applications become permanent. There are numerous methods for stem cells isolation depending on both the origin of the tissue used, and the laboratories procedures. In this work we examined the "spontaneous migration" method to obtain these cells from Wharton's jelly of human umbilical cords. All the experiments were performed according to protocol approved by the Federal University of Pernambuco Ethics in Research Committee (No .420/2007). Using flow cytometry (FACSCalibur), we found that 70-80% of the primary cells (third passage) are positive for markers of mesenchymal cells. Application of positive selection ("column-free" magnetic sorting) enhanced the presence of CD90, CD44, CD29 cells to more than 90%. Such cells don't possess the hematopoietic markers (CD45, CD34 and CD31). The doubling time of the obtained stem cells was 2-3 days. They had fibroblastoid morphology and held pronounced differentiation potential. The osteogenic differentiation was achieved by the medium supplemented with ascorbic acid, dexamethasone and β -glycerophosphate for three weeks. The differentiation was confirmed by histochemical staining (von Kossa), the presence of hydroxyapatite crystals in extracellular matrix was observed. Thereby, we can conclude that the "spontaneous migration" is a relatively simple method, which requires less processing time and results in a considerable number of cells with typical stem cell markers already in the primary population. The positive selection with magnetic particles is a fast and effective method to obtain highly purified stem cells.

Key words: Stem cells; Wharton's jelly; Spontaneous migration; Positive selection; Osteogenic differentiation

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: Compartimentos do cordão umbilical contendo células-tronco mesenquimais. Adaptada de Troyer & Weiss, 2008.	17
FIGURA 2: Características estruturais dos diferentes tipos de células do cordão umbilical humano em cultura. Extraída de Karahuseyinoglu et al, 2007.	18
FIGURA 3: Modelo mostrando deslocamento das CTM por meio da corrente sanguínea via atração quimiotática liberadas de lesões/inflamações e tumores, onde contribuem para o reparo do tecido e a formação do estroma com o tumor. Adaptada de Chen et al, 2008.	23
FIGURA 4: Diagrama esquemático representando potenciais mecanismos para explicações da plasticidade de células-tronco adultas <i>in vivo</i> . Adaptada de Wagers & Weissman, 2004.	25
FIGURA 5: Quantificação dos possíveis genes que podem estar relacionados ao processo de diferenciação. Adaptada de Baksh et al, 2004.	26
FIGURA 6: Fontes de células-tronco para reconstituição hematopoética segundo a fonte celular por ano (1988-2008). Extraída de: da Silva Junior et al, 2009.	28
FIGURA 7: Testes clínicos com CT adultas em andamento no Brasil. Extraída de Pereira, 2008.	30
FIGURA 8: Número de unidades de cordão umbilical armazenadas em bancos de cordão umbilical no mundo, por ano (1994-2008). Extraída de: da Silva Junior et al, 2009.	32

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1: Classificação das células-tronco.	13
TABELA 2: Características fenotípicas das CTA induzidas à diferenciação <i>in vitro</i> , como também os indutores em uso para tal fim – mínimos potenciais preconizados para defini-las como CTM multipotentes.	21

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Antígenos – do inglês, <i>Cluster of Differentiation</i>
CT	Células-tronco;
CTA	Células-tronco adultas;
CTE	Células-tronco embrionárias;
CTH	Células-tronco hematopoéticas;
CTM	Células-tronco mesenquimais;
CU	Cordão umbilical;
DPs	Duplicações da população ou dobras da população;
MO	Medula óssea;
SCU	Sangue do cordão umbilical;
SCUP	Sangue de cordão umbilical e placentário;
GAGs	Glicosaminoglicanos

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) são apontadas como a base da terapia celular, devido a sua capacidade de auto-renovação e diferenciação (ZAGO & COVAS, 2007). O conhecimento da existência das CT provenientes de várias fontes de tecidos adultos, contendo células mais indiferenciadas (multipotentes, pluripotentes), abre um leque de possibilidades para obtenção de células-tronco sem grandes preocupações éticas, morais ou religiosas (DEL CARLO et al, 2008).

O cordão umbilical surgiu, nos últimos anos, como uma fonte alternativa à medula óssea para obtenção de células-tronco adultas - CTA (ROMANOV et al, 2003; SECCO et al, 2008a). Sua coleta trata-se de procedimento não invasivo e menos caro que recolher células do aspirado de medula óssea, ainda considerada a fonte clássica de CTA (onde o método pode causar: infecção, hemorragia e dor crônica). Trata-se de um órgão extra-embriônico usualmente descartado pós-parto, além de poder fornecer tanto células-tronco hematopoéticas como mesenquimais (CAN & KARAHUSEYINOGLU, 2007; SECCO et al, 2008b). Dentre as células-tronco adultas, as mesenquimais ocupam posição de destaque. São células multipotentes que podem originar células de origem mesodérmica (como osteoblastos, adipócitos e condrócitos) como também podem se diferenciar em células de origem extra-mesenquimal, como neurônios e hepatócitos (LEE et al, 2004).

As pesquisas com células-tronco ainda estão num estágio onde muitas questões científicas precisam ser resolvidas até suas aplicações se tornarem definitivas. A identificação de determinadas redes de sinalização que regulam a diferenciação das CTM em uma linhagem específica permanece um desafio (KOLF et al, 2007). O domínio desse contexto nos permitiria manipular mais efetivamente as condições necessárias para induzir a diferenciação celular com base na interação observada no seu tecido de origem (FAVALLI, 2009).

Este trabalho teve como objetivo iniciar a cultura de células-tronco humanas de cordão umbilical, devido as suas vantagens já expostas, a fim de dar suporte a técnicas que estão relacionadas à pesquisa de base. Para tal fim, se faz necessário estabelecer uma rotina de isolamento e manutenção dessas células – procedimentos como padronização da obtenção de grandes quantidades de células e de condições para expansão e estabilidade das células-tronco *in vitro*. A fenotipagem e diferenciação das células isoladas tornam-se fundamental para caracterizá-las como células-tronco. Esses estudos são fundamentais para dar suporte a futuras aplicações, como por exemplo, na reconstituição de fraturas ósseas e tratamentos odontológicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 As células-tronco, localização e classificações:

A origem do termo células-tronco (CT) surgiu pela primeira vez há mais de cem anos (1909), no Congresso da Sociedade Hematológica em Berlim. O palestrante russo Alexander A. Maximow desenvolveu e introduziu a teoria unitária da hematopoese (a existência de “células-tronco comuns para todos os elementos figurados do sangue”), e propôs o termo para uso científico. Também foi pioneiro em outras considerações sobre CT e seus nichos dentro do estroma da medula óssea – indicando que o enxerto de algumas células da medula resultaria na formação óssea e também na existência de um microambiente hematopoiético adequado para a população de células hematopoiéticas (GOLDMAN et al, 2006; FRIEDENSTEIN, 2009). Admiravelmente, quase 50 anos depois, que o conceito de células-tronco hematopoéticas surge em sua presente forma de interpretação, base para as estratégias de tratamentos revolucionários como o transplante de CT hematopoéticas, abrindo uma nova era na gestão de uma variedade de neoplasias hematológicas (NOVIK et al, 2009). Na mesma época (década de 70), Tavassoli, Friedenstein e Owen introduziram um segundo tipo de CT que poderia estar presente na medula óssea, mais especificamente no estroma sustentando a hematopoese, seria os primórdios das células-tronco mesenquimais conhecidas atualmente (BIANCO et al, 2008).

O estudo com CT demorou a se tornar um campo de pesquisa bem estabelecido, uma das razões foi que, nos primeiros anos muito tempo e energia foram gastos na tentativa de defini-las e em discutir se uma determinada célula era ou não realmente uma célula-tronco. Essencialmente, todos os conceitos importantes sobre as CT foram publicados nos anos 1960 e início dos anos 1970. Nomes como Leblond, Lajtha, Till e McCulloch são bastante conhecidos e suas contribuições são ainda hoje relevantes. Surgiu depois dessa percepção o estímulo aos pesquisadores da área a filosofar menos e focarem mais nos experimentos em busca de um maior conhecimento da biologia dessas células e saber como podemos explorá-las em benefício da sociedade (WATT, 1999).

Atualmente existe consenso em dizer que as células-tronco são células indiferenciadas, raras na maioria dos tecidos, que possuem a capacidade de se multiplicar raramente e/ou sofrer divisões assimétricas (onde uma célula-filha permanece indiferenciada enquanto a outra

pode seguir diferenciação – é o que permite a auto-renovação, característica própria dessas células), além de poderem gerar células maduras funcionais através de diferenciação (FUCHS & SEGRE, 2000; REYA et al, 2001; CHOUMERIANOU et al, 2008; BYDŁOWSKI et al, 2009). O uso do termo células progenitoras, ou células-tronco comprometidas, significa dizer que se trata de células amplificadoras transitórias, ou seja, em estado intermediário entre células-tronco e células maduras funcionais e deveria ser reservado para células que têm deixado o compartimento original da célula-tronco, mas ainda mantêm a capacidade de sofrer divisão celular (até auto-renovação) e diferenciação, ainda que de forma mais limitada (POTTEN & LOEFFLER, 1990; WATT, 1999, SCHWINDT et al, 2005, WATT & DRISKELL, 2010).

As células-tronco são classificadas de acordo com sua origem e sua plasticidade, tabela 1 (AEJAZ et al, 2007; CHOUMERIANOU et al, 2008). As CT embrionárias (CTE) podem ser: **totipotentes**, estas podem ser encontradas apenas no estágio de zigoto e na primeira clivagem do blastômero; ou **pluripotentes**, sendo as encontradas na massa interna do blastocisto, nas células do epiblasto (após implantação) e nas células germinativas primordiais (na fase tardia embrionária/início da fetal). Enquanto que as CT adultas (CTA), na maioria das vezes, têm potencial mais limitado que as embrionárias sendo **multipotentes**, por exemplo, as CT hematopoéticas (CTH) quando não unipotentes (como as encontradas nos testículos), mas existe atualmente uma nova categoria de CTA “reprogramadas” que atingem estado de pluripotência artificialmente e são ditas células-tronco **pluripotentes induzidas**, podem ser alteradas por meio da tecnologia de: transferência nuclear, fusão celular ou manipulação genética. Esta reprogramação nuclear é de grande interesse médico, porque tem o potencial de gerar uma fonte de células específicas do próprio paciente (JAENISCH & YOUNG, 2008; WATT & DRISKELL, 2010).

Quanto à origem:	Quanto à plasticidade:
Embrionárias	Toti- ou pluripotente
Adultas	Pluri-, multi- ou unipotente

Tabela 1: Classificação das células-tronco. Quanto à origem, existem duas classes principais: as embrionárias e as adultas. Considerando a capacidade em se diferenciar em outros tipos de células (plasticidade), também são qualificadas como: totipotentes, cada célula pode se desenvolver e originar qualquer tipo de célula do organismo, incluindo os tecidos extra-embrionários; pluripotentes, podem formar quase qualquer tipo de célula, mais de 200 tipos; multipotentes, podem ser diferenciadas apenas em tipos específicos de células de uma linhagem.; ou unipotentes, formam apenas um tipo de célula.

As células-tronco embrionárias apresentam características essenciais como uma ilimitada capacidade de proliferação indiferenciada (pluripotentes) *in vitro*, além de formar os derivados dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma) mesmo após um longo período em cultura, o que lhes permite dar origem à maioria dos tecidos do organismo (THOMSON et al., 1998; AEJAZ et al, 2007). Considerando as CTA, são menos indiferenciadas e geralmente tecido-específicas, sendo capazes de diferenciação em células diferentes dentro de suas respectivas camadas germinativas; são interessantes porque há uma menor possibilidade de rejeição, porém ainda encontram-se algumas dificuldades em torno de seu isolamento e expansão *in vitro*, na maioria das vezes limitam-se a função de reparação e homeostase do tecido onde foram encontradas. (CHOUMERIANOU et al, 2008).

Embora já existam muitos estudos com as CTE, em camundongos e humanos, seu uso em terapia celular e em pesquisa tem sido dificultado por questões de compatibilidade, segurança e ética. Em qualquer transplante, é necessário existir compatibilidade entre doador e receptor para que as células não sejam rejeitadas. Formas de contornar esse problema foram propostas como: uma delas foi à criação de um banco dessas CTE (cada uma derivada de um embrião diferente), para aumentar as chances de semelhança entre doadores; ou mesmo produzir embriões clonados dos pacientes e deles extraírem as CTE, totalmente compatíveis, por meio de uma técnica chamada clonagem terapêutica. No entanto, a experiência adquirida com bancos de medula óssea (MO) demonstrou que essa pretensão é extremamente difícil de ser obtida, além da proibição de realizar a clonagem humana pela legislação brasileira a torna ilegal. Quanto à segurança, ainda restam dúvidas a cerca da utilização destas células na medicina regenerativa porque, se por um lado são atrativas por conta de sua enorme plasticidade, por outro elas representam um perigo. Testes indicam que se injetadas em seu estado nativo, as CTE podem gerar teratomas, ou seja, antes de utilizar estas células, será preciso controlar cuidadosamente o processo de diferenciação para que elas gerem apenas os tecidos de interesse. Em contraste, as CTA não apresentam estes empecilhos e podem ser isoladas do próprio paciente, multiplicadas *in vitro* e utilizadas para benefício do paciente ou armazenadas em bancos para uso posterior. Por outro lado, contornam as questões de âmbito religioso ainda tão intrinsecamente ligadas às pesquisas com as CTE, apesar da extensão da plasticidade das CTA ainda estar sob investigação. Atualmente, diversos testes clínicos em humanos estão em andamento utilizando CTA, principalmente derivadas da medula óssea (PEREIRA, 2008).

Células-tronco adultas têm sido descritas a partir de uma variedade de tecidos e órgãos, incluindo: cérebro (CLARKE et al, 2000), coração (MESSINA et al, 2004), pulmões

(KIM et al, 2005), fígado (MATTHEWS & YEOH, 2005), pâncreas (KRUSE et al, 2006), rins (AL-AWQATI & OLIVER, 2002), tecido adiposo (ZUK et al, 2002), músculo esquelético (CHEN & GOLDHAMER, 2003), decídua dos dentes (MIURA et al, 2003), folículos de cabelos (JAHODA et al, 2003), pele (JOHNSTON, 2004), sangue periférico (ZHAO et al, 2003), testículos (GUAN et al, 2006), sangue menstrual (MENG et al, 2007), líquido amniótico (DE COPPI et al, 2007). O termo CTA também descreve as células obtidas de fontes menos maduras, como: sangue de cordão umbilical (KANG et al, 2006), tecido do cordão umbilical – incluindo vasos sanguíneos e geléia de Wharton (SECCO et al, 2009), placenta (YEN et al, 2005) e tecidos fetais (IN'T ANKER et al, 2003). No entanto, a fonte melhor caracterizada de células-tronco adultas ainda é da medula óssea adulta (ZHAO et al, 2002; SALEM & THIEMERMANN, 2010).

O conhecimento da existência das células-tronco provenientes de várias fontes de tecidos adultos, contendo células mais indiferenciadas (multipotentes, pluripotentes) com a possibilidade de se diferenciar em tipos celulares provenientes de diferentes camadas germinativas, abre um leque de possibilidades para obtenção de CT – sem grandes preocupações éticas, morais ou religiosas – e oferece esperança para a população no que diz respeito à evolução das pesquisas com a finalidade de uma utilização mais rápida na terapia celular para o tratamento de várias doenças (MOORE et al, 2006, AEJAZ et al, 2007; DEL CARLO et al, 2008).

2.2 Células-tronco em cordão umbilical:

O cordão umbilical (CU) surgiu, nos últimos anos, como uma fonte alternativa à medula óssea para obtenção de células-tronco (ROMANOV et al, 2003; WEISS & TROYER, et al 2006; SECCO et al, 2008a; KESTENDJIEVA et al, 2008). A coleta do CU trata-se de procedimento não invasivo, indolor, e menos caro quando comparado com o recolhimento de células do aspirado de MO (este método pode, ao contrário: causar infecção, hemorragia e dor crônica). Adicionalmente ele contorna as questões éticas que vigoram a temática das CTE – por ser um órgão extra-embriônico usualmente descartado pós-parto, sem efeitos nocivos para a mãe ou bebê (WEISS & TROYER, et al 2006; CAN & KARAHUSEYINOGLU, 2007; SECCO et al, 2008b).

Este tecido pode ser o órgão de escolha quando o objetivo for auxiliar a demanda existente na procura por medula óssea para fins terapêuticos, pois, de forma semelhante, o CU

pode fornecer tanto CT hematopoéticas como mesenquimais (ROCHA et al, 2006; BAKSH et al, 2007). O cordão umbilical apresenta uma menor reatividade imunológica (menor risco de desenvolvimento da doença enxerto *versus* hospedeiro) o que permite teoricamente ser utilizado em de transplantes alogênicos com menos riscos se comparado a MO, neste é preciso ter uma maior compatibilidade genética para serem utilizadas para tal fim (OKAMOTO & CAMPOS, 2004; PEREIRA, 2008; WEISS et al, 2008). Outra conveniência que favorece a utilização do CU é que o número e o potencial de diferenciação das células-tronco na MO diminui com o avanço da idade do doador, o que não ocorre com o cordão, por ser um órgão derivado do feto, possui células jovens (com propriedades multipotenciais, entre CTE e CT adultas) nas quais o processo de degradação do telômero encontra-se em fase inicial e podem ter uma sobrevivência maior que às células da MO, pois estas possuem seu telômero já comprometido pelo encurtamento natural que existe no decorrer dos anos de vida do doador (BAXTER et al, 2004; KIM et al, 2008; CAN & KARAHUSEYINOGLU, 2007).

As células-tronco hematopoéticas podem ser isoladas do sangue retido no CU e servem como progenitoras das células especializadas que compõem os tecidos sanguíneos e o sistema imune (da SILVA JUNIOR et al, 2009). São células multipotenciais, dando origem às diferentes células sanguíneas. Duas linhagens principais são reconhecidas terem as CTH como precursoras comuns: a linhagem linfóide (abrange os linfócitos B, T e NK) e mielóide (inclui os eritrócitos, megacariócitos, monócitos e granulócitos). Entre o grande número de CTA atualmente conhecidas, as CTH foram as primeiramente descritas e estudadas, sendo ainda as melhor compreendidas e mais amplamente aplicadas em protocolos clínicos para restauração sanguínea frente a diferentes doenças estudadas (ZAGO & COVAS, 2007). Trabalhos publicados recentemente sugerem a capacidade pluripotencial das CTH, diante desse argumento persiste o estímulo para continuarem as pesquisas com o intuito de tentar explorar o potencial dessas CTA atualmente disponíveis (ZHAO et al, 2003; KUCI et al, 2009).

As células-tronco mesenquimais (CTM) também são CT multipotenciais por natureza que tem demonstrado se comportar como pluripotentes em vários trabalhos. São capazes de sustentar a hematopoese, podendo facilitar o enxerto de CTH, como também exibirem propriedades imunossupressoras (JIANG et al, 2002; WEISS et al, 2008; SALEM & THIEMERMANN, 2010). O interesse neste tipo celular cresceu exponencialmente nos últimos anos devido ao seu grande potencial de uso na medicina regenerativa e engenharia tecidual para órgãos lesados, como demonstrado em estudos pré-clínicos e clínicos que ilustram seu valor terapêutico (BARRY & MURPHY, 2004; FRIEDMAN et al, 2007).

Podem ser encontradas no cordão umbilical em sua totalidade mesmo que ainda haja controvérsia sobre sua presença no sangue. A provável explicação para esse questionamento pode ser devido tanto a maior dificuldade de extração no sangue do cordão umbilical (SCU) onde a frequência é muito menor (cerca de 1 em 200 milhões de células) quando comparado a possibilidade de obtenção no tecido (em torno de 1 em 300 células) bem como o uso de diferentes condições de extração e cultivo de CTM utilizadas nos trabalhos independentes (SECCO, 2008b; AEJAZ et al, 2007). Além do sangue, as CTM podem ser isoladas do subendotélio da veia umbilical e de toda a extensão que compreende a geléia de Wharton, este se trata de um tecido conectivo que envolve os vasos sanguíneos presente no cordão, ver figura 1 (TROYER & WEISS, 2008).

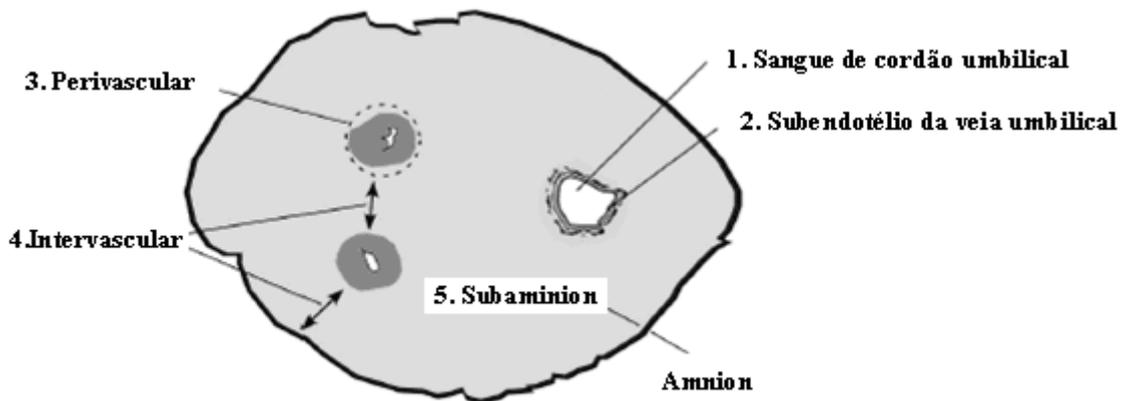


Figura 1: Compartimentos do cordão umbilical contendo CTM (representação de secção transversal). As células-tronco mesenquimais podem ser isoladas da camada subendotelial da veia, como também podem ser obtidas da geléia de Wharton, desta com maior frequência quando comparada com o sangue no cordão umbilical – local que compreende a geléia de Wharton: inclui as regiões perivascular, intervascular e subamnio / zonas: 3-5. Adaptada de Troyer & Weiss, 2008.

2.2.1 Características das CTM *ex vivo*

a) Isolamento:

As células podem ser extraídas por métodos enzimáticos ou por meio de cultura de explante. O primeiro utiliza enzimas para digerir a matriz extracelular e libertar as células para serem cultivadas, o protocolo varia bastante e o tempo de digestão depende das enzimas e das concentrações utilizadas (WEISS et al, 2006; CAN & KARAHUSEYINOGLU, 2007). A segunda metodologia não necessita de artefatos específicos, neste o tecido permanece dentro da cultura durante um período e tem como base a migração espontânea das células (MITCHELL et al, 2003; ISHIGE et al, 2009). As células do sangue são obtidas utilizando gradiente de densidade por centrifugação. A fração contendo células mononucleadas é

recuperada, cultivada e, posteriormente, as células não aderentes no suporte da cultura são desprezadas, pois uma das características das CTM é a boa aderência ao plástico (KAWASAKI-OYAMA et al, 2008; TROYER & WEISS, 2008; BYDLOWSKI et al, 2009). O aumento do intervalo de tempo coleta/processamento do SCU influencia negativamente na contagem de células nucleadas (FERRAZ, 2009).

b) Morfologia:

Na cultura primária das células isoladas do cordão umbilical tipicamente se encontram duas populações distintas de células, que diferem entre si pela morfologia (fusiforme e achatada) e pela expressão diferencial de proteínas de filamento intermediário, vimentina e pancitoqueratina, figura 2. Todas as células expressaram vimentina, enquanto pancitoqueratina foi limitada ao tipo 1. Além disso, verificou-se que houve um declínio no número de células de tipo 1 através de passagens posteriores, o que coincidiu com a diminuição da expressão pancitoqueratina – demonstrado por Western blot na figura 2 (KARAHUSEYINOGLU et al, 2007).

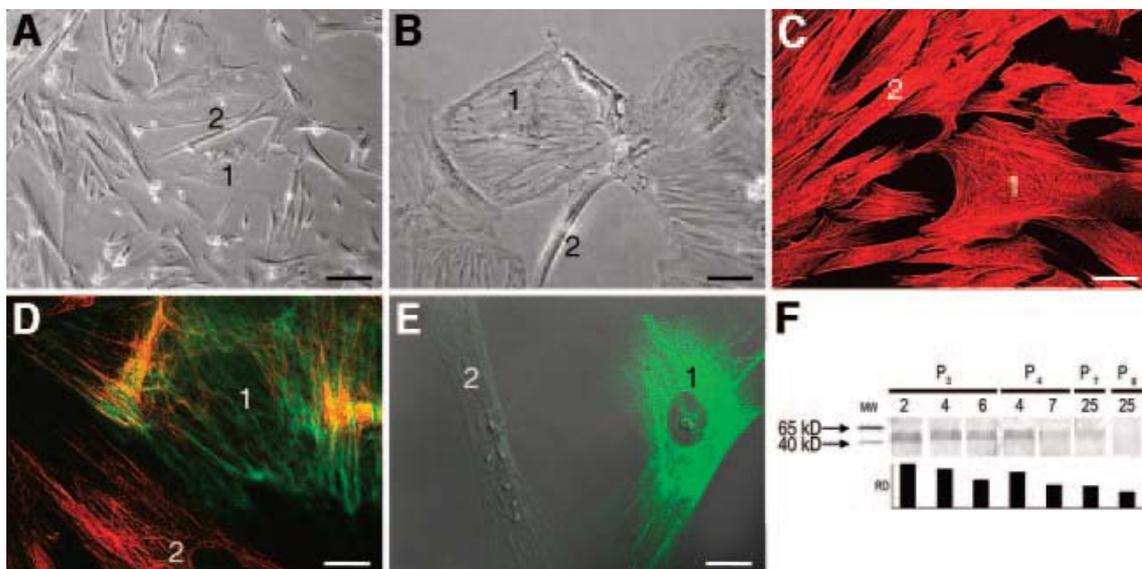


Figura 2: Características estruturais dos diferentes tipos de células do cordão umbilical humano em cultura. (A,B): Dois distintos fenótipos celulares, em especial no início passagens (P₁-P₃). Células com amplo citoplasma achatado (tipo 1) dispersos entre células semelhantes a fibroblastos, delgadas (tipo 2); (C): Coloração das células do tipo 1 e tipo 2 por F-actina, discriminados pelos seus padrões fibra típicos; (D,E): Imagens tridimensionais da dupla marcação com anti-pancitoqueratina (verde) e vimentina (vermelho), mostrou que a pancitoqueratina foi expressa, exclusivamente, em células do tipo 1 (imagens de contraste de interferência diferencial + fluorescência). (F): Western blot mostrando pancitoqueratina gradualmente diminuindo ao longo das passagens na cultura. Escala barras = 20 µm (D), 35 µm (E), 50 µm (B, C), 200 µm (A). Extraída de Karahuseyinoglu et al, 2007.

c) Caracterização:

Devido à falta de um marcador específico que defina as CTM, a Sociedade Internacional de Terapia Celular designou um conjunto de critérios a fim de facilitar uma

distinção mais uniforme, esta afirmação corrobora com a opinião corrente predominante. Para serem classificadas como CTM precisam: (a) ser uma população de células aderentes em plástico; (b) ter a expressão simultânea de um conjunto de marcadores de superfície incluindo CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105 com uma concomitante ausência da expressão de marcadores hematopoéticos/endoteliais CD31, CD34, CD45, CD14 (ou CD11b), CD19 (ou CD79-alfa) e do antígeno leucocitário humano classe II (HLA-II), não sendo expressos em mais de 95% das células em cultura e (c) ter a capacidade de se auto-renovar e diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI, 2006; CAN & KARAHUSEYINOGLU, 2007; LA ROCCA et al, 2009). Novas ferramentas têm possibilitado um considerável progresso para separar as CTM, algumas se baseiam no isolamento celular usando fluorescência FACS (*fluorescence activated cell sorting*) e métodos de separação por *beads* magnéticas (BERTINE & ARAUJO, 2009).

d) Proliferação:

É importante ter o conhecimento como determinada população de células expande em cultura. A construção de uma curva de crescimento permite acompanhar as células que são cultivadas e ter uma previsão do melhor período para que se faça a coleta das células ou adição de reagentes para experimentações (fase *log*). A cinética de proliferação celular é característica de cada linhagem. É durante a fase *log* que o tempo de dobramento é determinado, este depende tanto do doador como da densidade inicial de plaqueamento e da saturação da linhagem (PERES & CURI, 2005; CHAMBERLAIN et al, 2007). É conhecido que as CTM apresentam inibição do crescimento quando atingem a confluência. Esse comportamento é compartilhado pela maioria das culturas de células aderentes e leva à necessidade de várias passagens sucessivas para a obtenção de grandes quantidades de CTM, com ausência de outros tipos celulares (KARAHUSEYINOGLU et al, 2007; BYDŁOWSKI et al, 2009).

Em contraste com a medula óssea as CTM da geléia de Wharton têm maior capacidade de expansão, mais rápido crescimento *in vitro*, e podem sintetizar citocinas diferentes (TROYER & WEISS, 2008). Também existem diferenças no padrão de proliferação e diferenciação das células isoladas de diferentes localidades da geléia de Wharton do cordão umbilical. O tempo de duplicação foi superior para as células isoladas próximo a veia que das outras regiões (das retiradas próximo as artérias e da região intervacular). Não obstante, essas células extraídas próximo a veia exibem a mais alta frequência de unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (CFU-F, do inglês, *colony forming unit-fibroblasts*), isso

poderia indicar que essas células têm alto potencial como CT mesenquimais (SARUGASER et al, 2005; ISHIGE et al, 2009).

Embora as CTM não sejam imortais, quando extraídas do cordão umbilical são capazes de se propagar muitas vezes (passando por várias duplicações da população ou DPs), ainda retendo seu crescimento e potencial multilinhagem (CHAMBERLAIN et al, 2007). Seguem o processo normal de senescência celular – onde há o encurtamento de telômero – o que tem como resultado a diminuição do potencial proliferativo e de diferenciação das células cultivadas a longo prazo. Esse comportamento constitui a grande dificuldade existente frente a limitar a expansão celular necessária para a utilização em terapias. Por outro lado, CTM cultivadas por um longo período conservaram grande estabilidade cromossômica *in vitro*, como também não induzir formação de tumor em transplante *in vivo* (KIM et al, 2008; LA ROCCA et al, 2009). Diante desses fatos, pode-se supor que as CTM constituem uma fonte segura para aplicações que exijam grande número de células e extenso período de propagação, desde que se conheçam as características das células em cultura, assegurando com isso a sua potencialidade em se diferenciar evitando que entrem em senescência para serem utilizadas nos diversos ensaios clínicos.

e) Diferenciação:

As células-tronco podem ser estimuladas *in vitro* a sofrerem alterações morfológicas, moleculares e funcionais para originarem outros tipos de células maduras. Os mecanismos precisos por meio dos quais acontecem mudanças na fisiologia celular que determinam o destino da diferenciação ainda não são completamente compreendidos (FU-JIANG & SHI-QING, 2009). Há uma variedade de tipos celulares que as CTM podem se diferenciar. Da Silva Meirelles e colaboradores (2006) afirmaram que o potencial de diferenciação das CTM adultas está relacionado ao tecido do qual as CT foram isoladas. Contudo, sabe-se que as do CU podem originar: osteoblastos, condroblastos, adipócitos, neurônios, hepatócitos (LEE et al, 2004) cardiomiócitos (WANG et al, 2004), células endoteliais (KESTENDJIEVA et al, 2008), e provavelmente outros potenciais podem ser descobertos já que a pesquisa é um campo que nos permite investigar e as células-tronco estão ainda longe de serem inteiramente conhecidas e dominadas. A tabela 2 cita alguns dos reagentes comumente usados em laboratório para fazer a indução e obter as células diferenciadas que são preconizadas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular como o mínimo de potencial que as CTM devem possuir para ser multipotencial, diferenciação em: osso, cartilagem e gordura (CHAMBERLAIN et al, 2007).

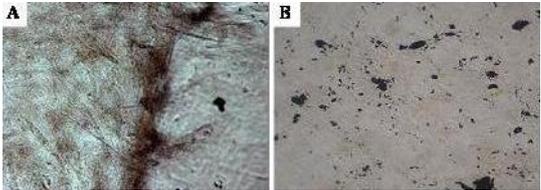
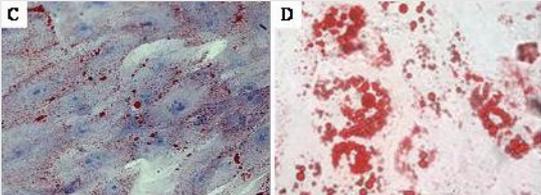
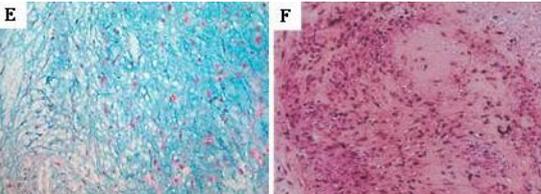
Potencial de diferenciação	Indutores	Fenótipo <i>in vitro</i> (células diferenciadas)
Ósseo	Dexametasona; Ácido ascórbico; β -glicerofosfato.	
Adiposo	Dexametasona; Insulina; Indometacina; Isobutilmetilxantina.	
Cartilaginoso	Dexametasona; Ácido ascórbico; Piruvato de sódio; ITS-Premix; TGF- β .	

Tabela 2: Características fenotípicas das CTA induzidas à diferenciação *in vitro*, como também os indutores em uso para tal fim – mínimos potenciais preconizados para defini-las como células-tronco mesenquimais multipotentes. Figuras A e B representam produtos da diferenciação osteogênica, cálcio depositado matriz extracelular mineralizada: (A) corado por *Alizarin Red S*, extraída de La Rocca et al, 2009 e (B) corado pelo método de Von Kossa, extraída de Kestendjieva et al, 2008. Figuras C e D, após diferenciação adipogênica: (C) extraída de La Rocca et al, 2009 e (D) de Ciavarella et al, 2009, ambas contendo vacúolos lipídicos formados corados com *Oil Red O*. Figuras E e F, resultado da diferenciação condrogênica: (E) corada com *Alcian Blue*, extraída de Ciavarella et al, 2009 e (F) corada por Safranina O, extraída de Lee et al, 2004, podemos ver marcação dos glicosaminoglicanos e mucopolissacarídeos produzidos pelos condroblastos na matriz extracelular.

2.3 Nicho das células-tronco, maturação celular e câncer:

O nicho engloba todos os elementos que cercam imediatamente as células-tronco quando estão em seu estado nativo, incluindo as células que não são CT que podem estar em contato direto com elas, bem como a matriz extracelular e moléculas solúveis encontradas nessa localidade. Todos estes agem em conjunto para regular o equilíbrio de auto-renovação e diferenciação em todas as células-tronco, protegendo-as dos estímulos de diferenciação, apoptóticos e outros estímulos que desafiam as reservas de células-tronco (KOLF et al, 2007; MOORE & LEMISCHKA, 2006). Observações das diferentes combinações do comportamento desses múltiplos fatores sugerem existir nichos-microambientes únicos e que

a arquitetura envolvendo as CT mantém o estado indiferenciado, determinam quão rápido irão se dividir e especificam se irão se dividir assimetricamente ou simetricamente (FUCHS et al, 2004).

Um nicho funcional mantém o tecido em homeostase, permite a manutenção de um estado de equilíbrio entre quiescência celular e atividade, produzindo células comprometidas a produzir linhagens de células maduras, além de prevenir contra produção excessiva de CT que podem levar ao câncer (MOORE & LEMISCHKA, 2006). Uma caracterização dos nichos das CT possibilita compreender melhor a contribuição dos diversos fatores, incluindo os do tecido de origem, que contribuem para esse complexo sistema de comunicação e controle da diferenciação celular (DEL CARLO, 2008; KOLF et al, 2007; WEISS & TROYER, 2006).

No cordão umbilical, há uma interação entre as células presentes na geléia e fatores de crescimento existentes neste local (FGF ácido, FGF básico, EGF, IGF-I, PDGF e TGF- β), supõe-se que estes fatores atuem estimulando-as a produzirem a quantidade muito elevada de componentes da matriz extracelular encontrada neste tecido que é composta principalmente por colágeno e glicosaminoglicanos (GAGs). Estudos quantitativos demonstram que: o colágeno corresponde a cerca de 50 % do peso seco do tecido; dentre os GAGs, 70% corresponde ao ácido hialurônico, outras formas incluem queratina, heparan, dermatan, condroitina-4 e condroitina-6 sulfato. A elevada quantidade de ácido hialurônico torna este tecido altamente hidratado e a grande quantidade de colágeno torna-o resistente à extensão e compressão ocasionadas por movimentos fetais e contrações uterinas (KARAHUSEYINOGLU et al, 2007; SOBOLEWSKI et al, 2005). As CTM, além de contribuir com a matriz extracelular presente no cordão também parecem sofrer influência do microambiente onde se encontram, pois não estão distribuídas de maneira uniforme na geléia Wharton, existe desigualdade na expressão de proteínas do citoesqueleto e na taxa de proliferação das células em diferentes regiões do tecido. A maioria das células imaturas, com maior capacidade de proliferação, está localizada nas regiões subamniótica e intervacular, enquanto que as células da região perivascular constituem principalmente células mais diferenciadas – as células que expressam pancitoqueratina localizam-se nesta região e foi dito não se diferenciam em neurônios (KARAHUSEYINOGLU et al, 2007).

De modo geral, as CT mesenquimais têm seu nicho com uma natureza perivascular por todo o corpo. A localização perivascular dá-lhes fácil acesso a todo o organismo e explicaria o fato de encontrarmos CTM em alguns tecidos, especialmente quando feridos ou em condições patológicas, figura 3 (CHEN et al, 2008; da SILVA MEIRELLES et al, 2006; KOLF et al, 2007). Os mecanismos relacionados à migração de CTM continuam sendo

investigados, embora evidências sugiram que ambas as quimiocinas e seus receptores e moléculas de adesão estejam envolvidos (CHAMBERLAIN et al, 2007).

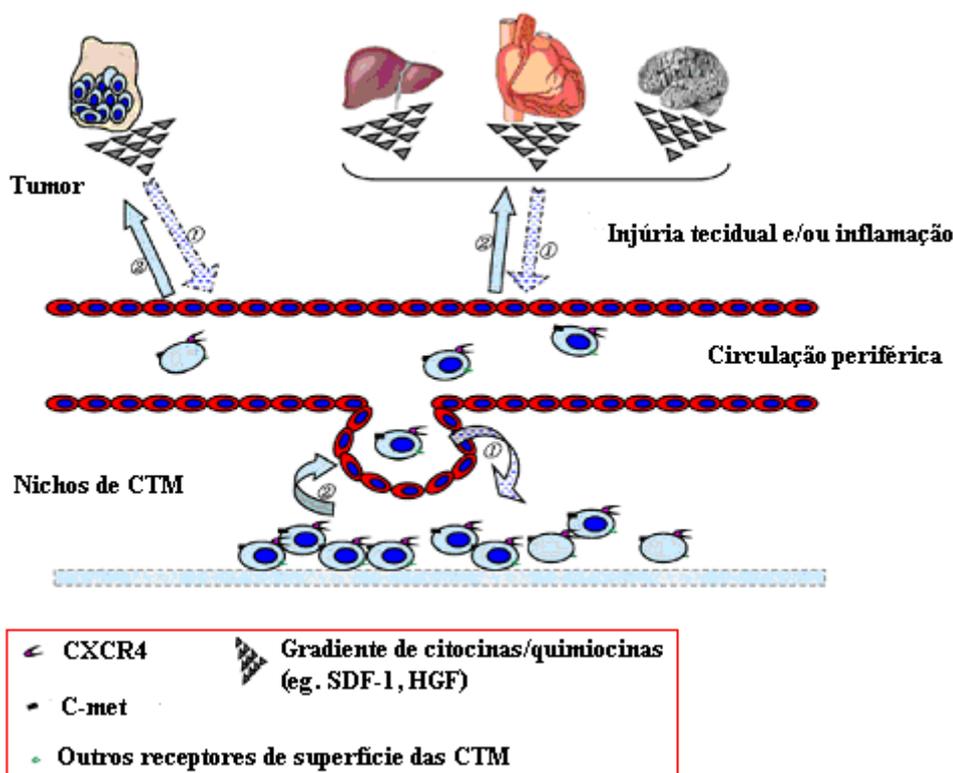


Figura 3: Modelo mostrando deslocamento das CTM por meio da corrente sanguínea via atração quimiotática liberadas de lesões/inflamações e tumores, onde contribuem para o reparo do tecido e a formação do estroma com o tumor. (1) A secreção de quimiocinas/citocinas dos tumores e tecidos lesionados aumenta a sobrevivência, proliferação e migração das CTM. (2) CTM ativadas migram para os locais de lesão, inflamação e tumores. Adaptada de Chen et al, 2008.

A célula madura é resultante de eventos de proliferação e diferenciação. Com a especialização funcional a maioria dos tecidos adultos cessa a atividade proliferativa após o nascimento, em outros um grande número de células maduras devem ser continuamente produzidas por toda a vida adulta, como é o caso do epitélio intestinal, da epiderme e da medula óssea em mamíferos, estes tecidos abrigam células-tronco que são responsáveis pela reposição celular local (MOORE & LEMISCHKA, 2006). O processo de diferenciação celular pode ser compreendido como a expressão qualitativa do fenótipo, de forma diferente da maturação que representa uma expressão quantitativa do fenótipo, ou seja, a célula madura expressa a totalidade de seus constituintes que possibilitam a plena funcionalidade celular (PERES & CURI, 2005).

Há vários processos envolvidos na diferenciação celular e todos têm como alvo final a regulação dos genes, incluindo aqueles que têm como passo inicial interação célula-célula (BYDLOWSKI et al, 2009).

Os mecanismos de interação célula-ambiente extracelular (nicho) têm fundamental importância no processo de diferenciação, levando em consideração essa premissa, foram sugeridas que as células de um tipo podem ser transformadas para outro tipo através dos tais processos hipotéticos (figura 4): A transdiferenciação afirma que a conversão de uma linhagem a outra ocorreria diretamente, a partir da ativação de um conjunto de genes que alteraria a especificidade celular o que poderia explicar, por exemplo, a origem de células neurais e hepatócitos das células da medula óssea (fig. 4A). A conversão entre diferentes linhagens celulares também poderia, teoricamente, ocorrer via desdiferenciação, um estágio intermediário, em que uma célula especializada torna-se uma célula mais primitiva, multipotente, para então se rediferenciar em outro tipo celular (fig. 4B). Desdiferenciação em células de mamíferos adultos não tem sido clara e inequivocamente documentada e, neste momento, nenhuma evidência suporta diretamente eventos de transdiferenciação ou desdiferenciação como uma explicação para a plasticidade das células-tronco ou células da medula óssea *in vivo*. Uma terceira explicação para a observação de plasticidade de células-tronco adultas baseia-se na pureza e na homogeneidade da população em estudo, ou seja, há a possibilidade de coexistirem distintos tipos de CT e progenitores em um tecido, que contribuiriam para o surgimento de diversos tipos celulares (fig. 4C). O aporte de células entre diversos tecidos também pode ocorrer a partir da ação de CT-pluripotentes, que seriam capazes de originar células de tecidos formados a partir de diferentes folhetos embrionários (fig. 4D). A existência de células-tronco pluripotentes na medula óssea de camundongos e em humanos ganhou recentemente o apoio depois do isolamento em cultura de células progenitoras adultas multipotentes (MAPCs, do inglês *multipotent adult progenitor cells*), na verdade pluripotentes. O último mecanismo de plasticidade a ser considerado é a fusão celular em que, após a fusão entre células de diferentes linhagens, os marcadores das células do hospedeiro são transferidos para a célula receptora fundida (fig. 4E). Dessa forma, as células da medula óssea fundidas podem assumir o fenótipo das células receptoras, sugerindo uma “transdiferenciação”. No entanto, parece improvável que o mecanismo de fusão seja responsável pela regeneração tecidual em larga escala, visto a baixíssima frequência com que esse evento ocorre (SCHWINDT et al, 2005; WAGERS & WEISSMAN, 2004). Entretanto, os novos achados sugerem que a capacidade das CTM em alterar microambiente tecidual por meio da secreção de fatores solúveis pode ter papel importante na reparação tecidual (PHINNEY & PROCKOP, 2007).

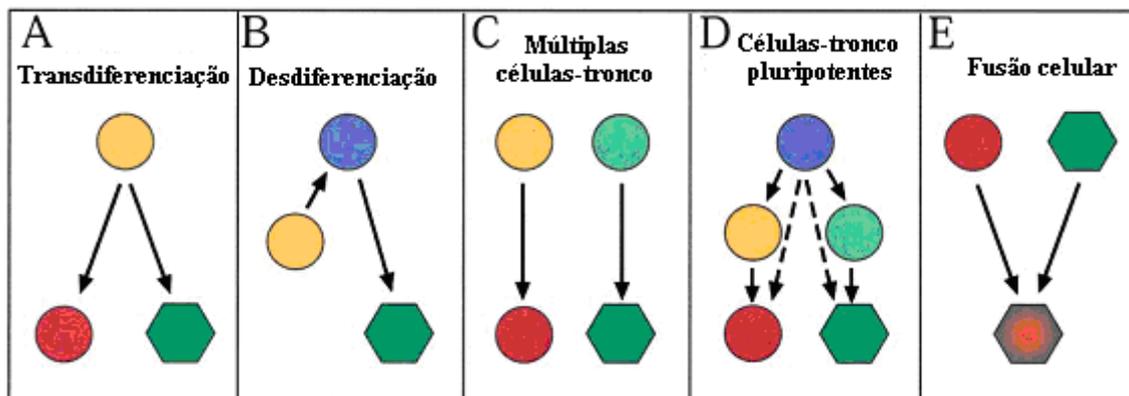


Figura 4: Diagrama esquemático representando potenciais mecanismos para explicações da plasticidade de células-tronco adultas *in vivo*. Maiores detalhes ver texto. Os círculos amarelos e verdes estão relacionados às células-tronco tecido específicas; os círculos azuis às CT pluripotentes e os vermelhos e hexágonos verdes às linhagens de células diferenciadas. Adaptada de Wagers & Weissman, 2004.

Experimentos, *in vitro*, permitiram investigar o processo de diferenciação das CTM induzidas a osteoblastos, adipócitos e condroblastos. Em 2000, Muraglia et al. propuseram um modelo hierárquico de diferenciação das CTM da medula óssea com base na perda constitutiva do potencial com o aumento do número de duplicações: partindo de uma plasticidade tripotente, para bipotente osteo-condrogênico e por fim unipotente osteogênico, com base nas observações dos resultados das induções de clones não imortalizados. Em 2004, Baksh et al analisaram o padrão de expressão de genes durante as diferenciações de células-tronco em função dos diferentes microambientes indutivos e permitiu enquadrar e categorizar os genes em três subclasses, dependendo do aumento de sua expressão em: apenas uma linhagem, em duas linhagens ou três linhagens, figura 5. O fato dos osteoblastos e adipócitos partilharem de mais genes “upregulados” durante sua aquisição fenotípica (235 genes), comparado com os genes compartilhados entre osteoblastos e condrócitos (3) e entre condrócitos e adipócitos (10), sugere que os osteoblastos e adipócitos podem originar de um precursor comum enquanto condrócitos seriam derivados a partir de um diferente. Uma análise mais aprofundada da partilha de genes entre as diferentes linhagens deve melhorar nossa compreensão da seqüência hierárquica de células-tronco durante o desenvolvimento. (BAKSH et al, 2004).

Uma adicional investigação da transcrição de genes mestres das três linhagens, por meio de PCR em tempo real, revelou um notável aumento da regulação do Runx2 em células osteogênicas-induzidas com relação a ambos os PPAR- γ e SOX9 para as células-tronco mesenquimais do CU adipogênica- e condrogênica-diferenciadas, respectivamente. Além disso, o TAZ (um co-regulador da transcrição) mostrou ter papel no controle recíproco da diferenciação entre as células osteogênicas e adipogênica-induzidas, uma vez que impulsiona

a transcrição de osteocalcina após a ativação dos genes relacionados à osteogênese, enquanto a inibe os genes relacionados à adipogênese (CIAVARELLA et al, 2009; KOLF et al, 2007).

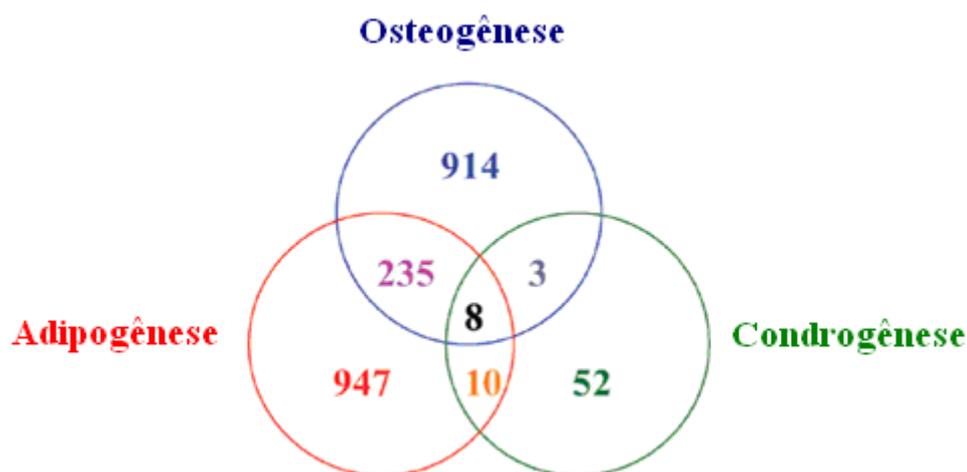


Figura 5: Quantificação dos possíveis genes que podem estar relacionados ao processo de diferenciação. Foram analisados 39000 transcritos e encontrados para a osteogênese, adipogênese e condrogênese, respectivamente, 914, 947 e 52 genes aumentaram a sua expressão em uma única linhagem mesenquimal; enquanto 235, 3 e 10 genes tiveram sua expressão aumentada e participaram de duas linhagens. Houve oito genes cuja expressão esteve aumentada durante as três diferenciações, sugerindo que eles podem funcionar em todas as três linhagens mesenquimais, e assim podem representar os genes de suposto “controle mestre”. Adaptada de Baksh et al, 2004.

Não somente o perfil genético como também os padrões moleculares verificados na expressão dos genes das CTM tecido-específicas podem refletir atividades funcionais influenciadas por nichos distintos e devem ser consideradas no desenvolvimento de protocolos clínicos envolvendo células-tronco mesenquimais de diferentes fontes – foram encontradas diferenças no nível de expressão dos genes de CT mesenquimais obtidas no sangue e no tecido do CU; nas do SCU os genes relacionados ao desenvolvimento de sistemas, a osteogênese e ao sistema imunológico foram encontrados em maior quantidade, enquanto que nas do tecido apresentaram maior expressão de genes relacionados à adesão celular, morfogênese, secreção, angiogênese e neurogênese (SECCO et al, , 2009).

A identificação de determinadas redes de sinalização que regulam a diferenciação das CTM em uma linhagem específica permanece um desafio. Esclarecer ao máximo essas vias para a diferenciação das CTA permitiria interferir na progressão de determinadas lesões por meio da aplicação de efetores biológicos para manter o programa diferenciação pretendido, ou possivelmente para evitar a diferenciação espúria de CTM. O domínio desses conhecimentos é necessário para a aplicação clínica eficaz, tanto na engenharia quanto na regeneração

tecidual, seja manipulando as células em cultura ou mesmo interferindo diretamente no tecido lesado (DEL CARLO et al, 2008; KOLF et al, 2007).

Existe a possibilidade de uma célula-tronco, como qualquer outra célula, dar origem a um câncer e é esta possibilidade que tem gerado grande receio na sociedade sobre a utilização terapêutica dessas células. Não necessariamente CT irão originar câncer, há vários elementos considerados importantes no processo da “transformação” que ocorre com as CT resultando em células-tronco cancerosas. Existem hipóteses para esse fenômeno, a mais completa parece incluir uma combinação dos dois modelos atualmente sugeridos, o estocástico e o hierárquico: as células-tronco com suas propriedades de auto-renovação e multipotência, acumulam mutações adquiridas e/ou efeitos epigenéticos, além disso, são capazes de sofrer seleção e adquirir capacidade característica de se adaptar a nichos desfavoráveis, possibilitando-as proliferar em qualquer nicho aumentando a malignidade do tumor. Não existe consenso na terminologia para definir um câncer contendo CT cancerosas, termos como câncer de células semelhantes às células-tronco ou mesmo câncer de células-tronco tem sido utilizados (Bjerkvig et al, 2009). Este câncer é composto de um conjunto de células heterogêneas, existindo células-tronco modificadas com capacidade de se auto-renovar (com alto potencial proliferativo) como também células nos mais variados estágios de diferenciação (pode existir também diferenciação aberrante); a diversidade de células encontradas nos tumores sem CT restringe-se a populações que variam no grau de diferenciação, embora também exibam alta taxa de proliferação (DALERBA et al, 2007; KOCH et al, 2010).

O câncer com CT cancerosas é mais preocupante que o câncer de células somáticas, pois a maioria dos fármacos anticancerígenos atuais atuam inibindo a síntese de DNA ou a divisão celular dessas células cancerosas, assim visando o crescimento do tumor, este tipo de câncer pode ter células em estado quiescente (em repouso), o que torna possível que haja uma maior reincidência dos tumores após esses tratamentos, mesmo que só reste uma célula-tronco cancerosa no organismo (IWASAKI & SUDA, 2009). Investigação apontou a má regulação na via de sinalização Wnt, relacionada ao processo de auto-renovação, como um dos possíveis responsáveis pela alteração e formação das CT cancerosas que contribuem para a malignidade deste câncer. Também se tem sugerido que estas células tumorais podem ser protegidas por nichos microambientais específicos, modificados quando comparados com o nicho das CT não cancerosas (IWASAKI & SUDA, 2009; REYA & CLEVERS, 2005).

Pesquisas para encontrar as diferenças biológicas entre as CT normais e cancerosas tanto quanto para compreender os sistemas que regulam estas diferenças têm sido propostas visando buscar novas abordagens terapêuticas que impeçam o desenvolvimento do câncer.

Uma das opções seria fazer adaptação de tratamento individualizado, caso as mudanças observadas sejam muito variadas entre indivíduos, permitindo que sejam atingidas apenas as células alvo e não os tecidos normais (KOCH et al, 2010; WONG et al, 2008). A frequência de célula-tronco cancerosa, experimentalmente, em geral, é considerada baixa – inferior a 1% em populações de células cancerosas não fracionadas (IWASAKI & SUDA, 2009). Atualmente, julga-se que a alternativa mais segura seria diferenciar as células antes de introduzi-las no corpo humano, principalmente as CTE, as células sendo menos indiferenciadas haveria menor possibilidade de gerar teratomas (DEL CARLO et al, 2008).

2.4 Terapia celular:

A terapia celular usa um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas fundamentais no conhecimento de várias ciências que visa à utilização de células para o tratamento de doenças. O principal foco atual de interesse na terapia celular é a medicina regenerativa, cujo objetivo é a substituição de células ou tecidos lesados, senescentes ou perdidos. Isso explica os muitos investimentos técnicos-científicos para o uso de células-tronco. A forma de tratamento com CT humanas cuja aplicação já faz parte do arsenal médico no mundo todo é relativa à reconstituição hematopoética, utiliza-se para tal as CT encontradas: na medula óssea, no sangue periférico como também no sangue do cordão umbilical, ver figura 6. Todas as outras formas de tratamento com CT são ainda experimentais e seus benefícios precisam ser demonstrados ou, quando há evidências positivas, as formas de aplicação e indicações precisam ainda ser consolidadas (da SILVA JUNIOR et al, 2009; ZAGO & COVAS, 2007).

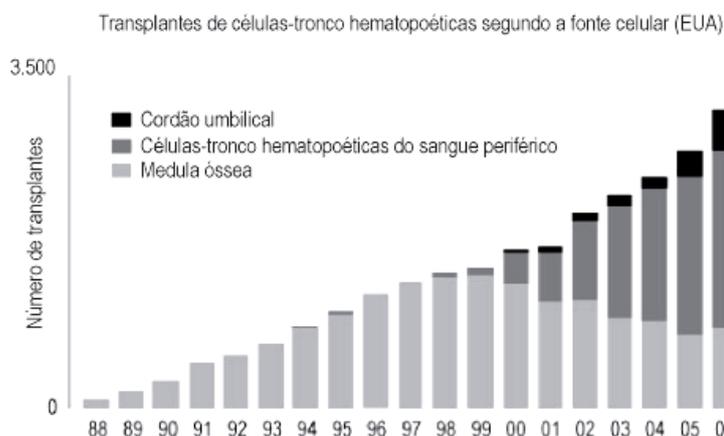


Figura 6: Fontes de células-tronco para reconstituição hematopoética segundo a fonte celular por ano (1988-2008). A medula óssea continua sendo a principal fonte de CTH nos transplantes realizados no mundo, mas fontes alternativas de CTH (sangue periférico e de cordão umbilical) têm ganhado importância crescente nos últimos anos. Extraída de: da Silva Junior et al, 2009.

As células-tronco são a base da terapia celular e podem ser aproveitadas de diferentes formas: CT adultas, extraídas do próprio tecido a ser regenerado; estimulação das próprias CT endógenas por meio de injeção de substâncias biológicas (fatores de crescimento, citocinas) como também manipular geneticamente as CT para se atingir a finalidade pretendida, combinando a terapia gênica a terapia celular. Alguns procedimentos utilizam-nas no estado natural, realizam injeção direta das células-tronco esperando o alojamento no órgão que se deseja reparar, diferenciando-se no sentido esperado; outros estimulam previamente a diferenciação para depois realizar o transplante das células, é o caso das células produtoras de dopamina (doença de Parkinson), células musculares cardíacas (insuficiência cardíaca), células produtoras de insulina (diabetes) e das células mesenquimais para doenças do sistema esquelético (ZAGO & COVAS, 2007).

As células-tronco adultas são as mais estudadas e caracterizadas visto que contornam os impasses que ferem questões éticas e sociais (DEL CARLO et al, 2008). A pesquisa com CT mesenquimais já se encontra em fase clínica onde se observa uma margem de segurança maior que os testes com as células-tronco embrionárias e as células pluripotentes induzidas (SALEN & THIEMERMANN, 2010; DEL CARLO et al, 2009) . Há um protocolo a ser seguido para a prática clínica, existe grande preocupação em passar para o paciente (que deve ser voluntário) nos experimentos *in vivo* que existe a possibilidade do tratamento não dar certo, ele precisa estar totalmente esclarecido e consciente dos riscos que corre (McCORMICK & HUSO, 2010). Também é importante a questão do monitoramento das células-tronco cultivadas por profissionais de citogenética, de modo a assegurar o controle e segurança das células que serão utilizadas na terapia em seres humanos e evitar que o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, resultem em um processo neoplásico (PAYÃO et al, 2009).

O Brasil se destaca pelo grande número de testes clínicos em andamento com CTA, e os resultados preliminares indicam que não há efeitos adversos do transplante autólogo de CT da medula óssea. Resta ainda analisar se existe algum efeito terapêutico das mesmas nas doenças testadas. É importante frisar que os tratamentos são experimentais e ainda não podem ser oferecidos à população, figura 7. Quanto as CTE, a legislação brasileira atual facilita a definição do potencial terapêutico destas células ao mesmo tempo em que estimula a busca por fontes alternativas, particularmente de células autólogas adultas (PEREIRA, 2008; OKAMOTO & CAMPOS, 2004). Nos Estados Unidos, em 30 de julho de 2010, a FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*, órgão que fiscaliza alimentos e medicamentos no país)

autorizou o primeiro teste mundial com células-tronco embrionárias em seres humanos. A empresa Geron que ajudou a financiar o isolamento das primeiras células-tronco embrionárias da Universidade de Wisconsin nos anos 90, agora seguirá com o experimento que inicia estudando pacientes com lesões na medula espinhal (cerca de 8 a 10 pacientes) e os testes devem durar cerca de dois anos. A pesquisa pode dar uma primeira visão da segurança e eficácia dessa aplicação, aclamada como uma grande promessa médica (FOLHA, 2010).



Figura 7: Testes clínicos com CT adultas em andamento no Brasil. A maioria dos experimentos com CT estão localizadas nas cidades: Salvador, Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre; avaliam o uso terapêutico em diferentes doenças (ver figura). Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz); UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro); INCOR (Instituto do Coração); FM-USP (Faculdade de Medicina da USP, São Paulo); FM-USP-RP (Faculdade de Medicina da USP, Ribeirão Preto); FAMERP (Faculdade de Medicina de Rio Preto, São José de Rio Preto); UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Extraída de Pereira, 2008.

Perspectivas para a utilização das CT estão relacionadas ao emprego em engenharia tecidual e tratamento sítio-dirigido. Frente a algumas restrições e limitações que encontramos na atualidade, devido à grande demanda existente e a insuficiente oferta de materiais doados, é necessário ter uma combinação entre materiais de suporte (*scaffolds*), células adequadas e moléculas bioativas. Sendo assim, as últimas décadas têm testemunhado o desenvolvimento do princípio da cultura tridimensional (3D), buscando recriar *in vitro* ambientes fisiológicos mais semelhantes aos encontrados *in vivo*. Entre os principais biomateriais utilizados como análogos da matriz extracelular estão hidrogéis (tais como colágenos, glicosaminoglicanos, ácido polilático e derivados) que devem ser porosos, biocompatíveis, biodegradáveis, possuir propriedades mecânicas e físicas adequadas. Essas características são fundamentais para que eles exerçam por completo a sua função: criar um ambiente adequado para crescimento e/ou diferenciação celular. Diferenciá-las *in vitro*, associadas a suportes tridimensionais biocompatíveis que, subsequentemente, substituam e se adaptem as zonas lesadas no organismo amplia suas aplicações para a chamada engenharia de tecidos. Este fato tem levado à busca de diferentes estratégias que aperfeiçoem os diferentes polímeros que compõem esses

materiais biomiméticos e trata-se de promissor campo de pesquisa. (SOARES et al, 2007; FAVALLI, 2009). Esta tecnologia pode ser adequada a uma ampla gama de casos, como na área de estética para recuperação de queimados, acidentes deformativos entre outros (MANO et al, 2007).

Pode-se também utilizar as CT como veículos de drogas entre outros agentes terapêuticos, visto que elas podem se direcionar ao local de injúria de forma quimiotática, carregando consigo o arsenal químico ou genético que se pretende trabalhar no tecido alterado. Para isso se faz necessário conhecer bem o papel das quimiocinas e seus receptores e moléculas de adesão para permitir a interferência externa ajudando no direcionamento mais eficaz das CT para o tecido alvo, além de observar o comportamento das drogas testadas quando unidas as células antes de partir para o estudo *in vivo* em seres humanos (CHAMBERLAIN et al, 2007, CHEN et al, 2008). O que torna a investigação em células-tronco tão emocionante é o seu enorme potencial em benefício da saúde humana e as possibilidades de interdisciplinaridade que a pesquisa apresenta (WATT & DRISKELL, 2010).

Para a popularização da utilização da terapia celular, visando minimizar as reações imunológicas, é aconselhável utilizar as CT do próprio paciente. Isso determina a necessidade do isolamento e caracterização cada vez mais detalhada de novos tipos de células-tronco/progenitoras em tecidos adultos e a exploração de fontes alternativas destas células (FUCHS & SEGRE, 2000; ZAGO & COVAS, 2007). Já foram criados e são mundialmente conhecidos os bancos de medula óssea para o fácil acesso e disponibilização das células-tronco encontradas neste local. Nos últimos anos, surgiu a proposta de criação de outros bancos para armazenamento de células para transplantes de CTH como também outras CT para os diversos fins terapêuticos no futuro. No Brasil e no mundo, atenção esteve focada principalmente no sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP), é dito que representam fontes alternativas socialmente justa e cientificamente recomendável para transplantes alogênicos de CT, em 2004 foi criada a rede BrasilCord – que armazena SCUP, figura 8 (da SILVA JUNIOR et al, 2009; OKAMOTO & CAMPOS, 2004). No cordão umbilical podemos isolar além das CTH as CT mesenquimais. Como na medula óssea, CT mesenquimais podem servir como matéria-prima para futuras abordagens terapêuticas, tendo em vista seus potenciais de diferenciação como também imunomodulação que podem proporcionar quando utilizadas no seu estado natural (SALEM & THIEMERMANN, 2010; KESTENDJIEVA et al, 2008; WEISS et al, 2008). Devido à descoberta de que as células-tronco mesenquimais são mais facilmente obtidas do tecido de cordão umbilical que do sangue, houve um alerta e

estímulo para armazenar também o tecido que é normalmente descartado logo após os partos (SECCO et al, 2008a).

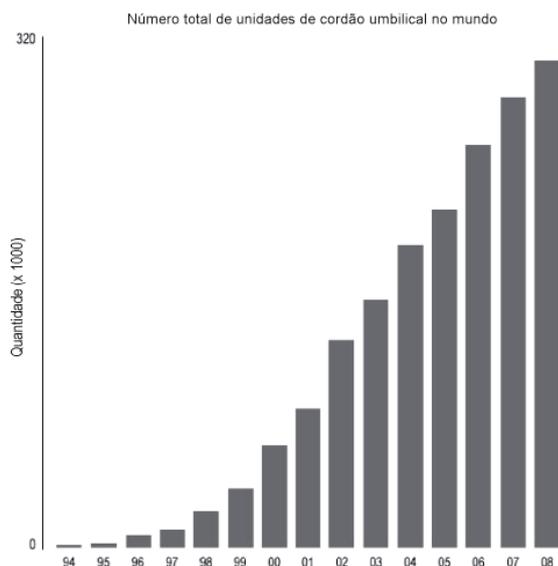


Figura 8: Número de unidades de cordão umbilical armazenadas em bancos de cordão umbilical no mundo, por ano (1994-2008). Atualmente, há mais de 260 mil unidades de sangue de cordão umbilical armazenadas em dezenas de bancos de sangue de cordão umbilical em vários países do mundo. Extraída de: da Silva Junior et al, 2009.

Sem dúvida, cautela ainda é necessária quando nos voltamos para o enfoque terapêutico, mesmo diante dos avanços que temos observado. A biologia das CT ainda é uma ciência em formação e a cada dia surgem novas evidências que refutam ou corroboram o conhecimento atual (DEL CARLO et al, 2009). Como a ciência se move da bancada ao leito, é importante dar séria atenção para as considerações sociais, éticas e políticas que as rodeiam. Resolver completamente todos os problemas que são levantados pode não ser praticável, mas mover a discussão e o trabalho em paralelo é necessário (McCORMICK & HUSO, 2010). Somente através da compreensão dos mecanismos moleculares que governam o equilíbrio da divisão celular os pesquisadores poderão interferir de uma forma mais ordenada no estímulo à regeneração tecidual – no equilíbrio entre autorrenovação e diferenciação celular. Como também é preciso a definição de diretrizes mais claras acerca da melhor maneira de se utilizar a terapia celular (e gênica) para a melhoria da qualidade de vida das pessoas (da SILVA JUNIOR et al, 2009). Contudo, espera-se que as novas terapias com CT substituam tratamentos atuais, mais caros e, muitas vezes, ineficientes. Além disso, acredita-se que as CT são um importante modelo experimental para o estudo dos mecanismos de diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e câncer, entre outros. Esses conhecimentos de biologia básica poderão proporcionar, a médio prazo, uma melhora das abordagens terapêuticas atuais às doenças humanas e animais (DEL CARLO et al, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Estabelecer uma rotina de isolamento e manutenção de populações de células-tronco que possam ser diferenciadas em células osteogênicas visando sua futura aplicação na reconstituição de fraturas ósseas e tratamentos odontológicos.

3.2 Específicos:

- Estabelecer um método padrão para isolar grandes quantidades de células-tronco a partir de cordão umbilical humano;
- Estabelecer condições para expansão e estabilidade das células-tronco “*in vitro*”;
- Realizar a fenotipagem e a seleção das células-tronco através de marcadores fluorescentes com citometria de fluxo;
- Induzir a diferenciação osteogênica.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEJAZ H.M., ALEEM A.K., PARVEEN N., KHAJA M.N., LAKSHMI NARUSU M., HABIBULLAH C.M. Stem Cell Therapy – Present Status. **Transplantation Proceedings**, 39, 694–699, 2007;

AL-AWQATI Q., OLIVER J.A. Stem cells in the kidney. **Kidney International**, Vol. 61, 387–395, 2002;

BAKSH D., SONG L., TUAN R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **J. Cell. Mol. Med.** Vol 8, N. 3, pp. 301-316, 2004;

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: 1384 –1392, 2007;

BARRY F.P., MURPHY J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** Vol. 36 (4), Pages 568-584, 2004;

BAXTER M.A., WYNN R.F., JOWITT S.N., WRAITH J.E., FAIRBAIRN L.J., BELLANTUONO I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells, following in vitro expansion. **StemCells** 22, 675–682, 2004;

BERTINE M.A.H., ARAUJO F.S. Biologia e uso clínico das células-tronco mesenquimais: uma revisão concisa. **Investigação** v. 9, n. 2/3, p. 101–106, 2009;

BIANCO P., ROBEY P.G. SIMMONS P.J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, 313-319, 2008;

BJERKVIG R., JOHANSSON M., MILETIC H., NICLOU S.P. Cancer stem cells and angiogenesis. **Seminars in Cancer Biology**. 19, 279–284, 2009;

BYDŁOWSKI, S.P., DEBES, A.A., MASELLI, L.M.F., JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, Vol. 31(Supl. 1), 25-35, 2009;

CAN A., KARAHUSEYINOGLU S. Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. **STEM CELLS** 25:2886 –2895, 2007;

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 AND DEVELOPMENT** Vol. 18, Num 8, 1211-1220, 2009;

CHAMBERLAIN G., FOX J., ASHTON B., MIDDLETON J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **STEM CELLS** 25: 2739 – 2749, 2007;

CHEN J.C.J., GOLDHAMER D.J. Skeletal muscle stem cells. **Reproductive Biology and Endocrinology** 1-7, 2003;

CHEN Y., SHAO J.Z., XIANG L.X., DONG X.J., ZHANG G.R. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 40, 815–820, 2008;

CHOUMERIANOU D.M., DIMITRIOU H., KALMANTI M. Stem cells: promises versus limitations. **Tissue Eng Part B Rev.**, 14(1):53-60, 2008;

CLARKE D.L., JOHANSSON C.B., WILBERTZ J., VERESS B., NILSSON E., KARLSTRÖM H., LENDAHL U., FRISÉN J. Generalized Potential of Adult Neural Stem Cells. **SCIENCE** Vol. 288. no. 5471, pp. 1660 – 1663, 2000;

da SILVA JUNIOR F.C., ODONGO F.C.A., DULLEY F.L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 31(Supl.1):53-58, 2009;

da SILVA MEIRELLES L., CHAGASTELLES P.C., NARDI N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science** 119, 2204-2213, 2006;

DALERBA P., CHO R.W., CLARKE M.F. Cancer Stem Cells: Models and Concepts. **Annu. Rev. Med.**, 58:267–84, 2007;

DE COPPI P., BARTSCH G., SIDDIQUI 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. **Nature Biotechnology** 25, 100 – 106, 2007;

DEL CARLO R.J., MONTEIRO B.S., ARGÔLO NETO N.M. Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. **Ciênc. vet. tróp.**, v. 11 (1), p.167-169, 2008;

DEL CARLO R.J., MONTEIRO B.S., NETO N.M.A. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. **Ceres.** 56(4): 446-450, 2009;

DOMINICI M., LE BLANC K., MUELLER I., SLAPER-CORTENBACH I., MARINI F., KRAUSE D., DEANS R., KEATING A., PROCKOP DJ, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy** 8(4):315-7, 2006;

FAVALLI P.P.S. Aplicação da hidroxipropilmetilcelulose na síntese de biomateriais para regeneração e engenharia de tecidos e análise de sua toxicidade em cultura de células adiposo-derivadas humanas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – **PUCRS**, 2009;

FERRAZ U.C. Tempo coleta/processamento e qualidade da amostra de sangue de cordão umbilical. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - **Unicamp**, 2009;

FRIEDENSTEIN A. Stromal-Hematopoietic Interrelationships: Maximov's Ideas and Modern Models. **Cellular Therapy and Transplantation (CTT)**, Vol. 1, No. 3, 25-30, 2009;

FRIEDMAN R., BETANCUR M., BOISSEL L., TUNCER H., CETRULO C., KLINGEMANN H. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: Adjuvants for Human Cell Transplantation. **American Society for Blood and Marrow Transplantation** 13:1477-1486, 2007;

FOLHA. EUA liberam em humanos teste com células-tronco embrionárias. São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/775527-eua-liberam-em-humanos-teste-com-celulas-tronco-embrionarias.shtml>>. Acesso em: 1 agosto, 2010;

FUCHS, E., SEGRE J.A. Stem Cells: A New Lease on Life. **CELL**, Vol. 100, 143–155, 2000;

FUCHS E., TUMBAR T., GUASCH G. Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. **CELL**, Vol. 116, 769–778, 2004;

FU-JIANG C., SHI-QING F. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. **Chinese Medical Journal** 122(2):225-231, 2009;

GOLDMAN S., WINDREM M. Cell replacement therapy in neurological disease. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 361(1473),1463-1475, 2006;

GUAN K., NAYERNIA K., MAIER L.S., WAGNER S., DRESSEL R., LEE J.H., NOLTE J., WOLF F., LI M., ENGEL W., HASENFUSS G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. **NATURE** 440, 1199-1203, 2006;

IN'T ANKER P.S., NOORT W.A., SCHERJON S.A., DER KEUR C.K., KRUISSELBRINK A.B., VAN BEZOOIJEN R.L., BEEKHUIZEN W., WILLEMZE R., KANHAI H.H., FIBBE W.E. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. **Haematologica** Vol. 88, Issue 8, 845-852, 2003;

ISHIGE I., INOUE T.N., 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** 90:261–269, 2009;

IWASAKI H., SUDA T. Cancer stem cells and their niche. **Cancer Sci**. Vol. 100, nº 7, 1166–1172, 2009;

JAENISCH R., YOUNG R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. **CELL**, 132, 567–582, 2008;

JAHODA C.A.B., WHITEHOUSE C.J., REYNOLDS A.J., HOLE N. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. **Experimental Dermatology** Vol 12 (6), 849 – 859, 2003;

JIANG Y., JAHAGIRDAR B.N., REINHARDT R.L., SCHWARTZ R.E., KEENE C.D., ORTIZ-GONZALEZ X.R., REYES M., LENVIK T., LUND T., BLACKSTAD M., DU J., ALDRICH S., LISBERG A., LOW W.C., LARGAESPADA D.A., VERFAILLIE C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow **NATURE** 418, 41-49, 2002;

JOHNSTON N. Skin stem cells. **Drug Discovery Today** Vol. 9, Issue 23, Page 994, 2004;

KANG X.Q., ZANG W.J., BAO L.J., LI D.L., XU X.L., YU X.J. Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. **Cell Biology International** Vol. 30, Issue 7, Pages 569-575, 2006;

KARAHUSEYINOGLU S., CINAR O., KILIC E., KARA F., AKAY G.G., DEMIRALP D.Ö., TUKUN A., UCKAN, D. CAN A. Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. **STEM CELLS** 25:319–331, 2007;

KAWASAKI-OYAMA R.S., BRAILE D.M., CALDAS H.C., LEAL J.C.F., GOLONI-BERTOLLO E.M., PAVARINO-BERTELLI E.C., ABBUD FILHO M., SANTOS I. Blood mesenchymal stem cell culture from the umbilical cord with and without Ficoll-Paque density gradient method. **Rev Bras Cir Cardiovasc** 23(1): 29-34, 2008;

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 Biology International** 32, 724-732, 2008;

KIM C.F.B., JACKSON E.L., WOOLFENDEN, A.E., LAWRENCE S., BABAR I., VOGEL S., CROWLEY D., BRONSON R.T., JACKS T. Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. **CELL**, Vol. 121, 823–835, 2005;

KIM J., KANG J.W., PARK J.H., CHOI Y., CHOI K.S., PARK K.D., BAEK D.H., SEONG S.K., MIN H.K., KIM H.S. Biological Characterization of Long-term Cultured Human Mesenchymal Stem Cells. **Arch Pharm Res** Vol 32, No 1, 117-126, 2008;

KOCH U., KRAUSE M., BAUMANN M. Cancer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures – Radiation oncology perspective. **Seminars in Cancer Biology**. 1-9, doi:10.1016/j.semcancer.2010.02.003, 2010;

KOLF C.M., CHO E., TUAN R.S. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy** Vol 9 No 1, 1-10, 2007;

KUCI S., KUCI Z., LATIFI-PUPOVCI H., NIETHAMMER D., HANDGRETINGER R., SCHUMM M., BRUCHELT G., BADER P., KLINGEBIEL T. Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine. **Current Stem Cell Research & Therapy** Vol 4(2),107-17, 2009;

KRUSE C., KAJAHN J., PETSCHNIK A.E., MAAß A., KLINK E., RAPOPORT D.H., WEDEL T. Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. **Annals of Anatomy** Vol 188(6), 503-517, 2006;

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** 131:267–282, 2009;

LEE O.K., KUO T.K., CHEN W.M., LEE K.D., HSIEH S.L., CHEN T.H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood** 103:1669-1675, 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 Z.Z., HAN Z.C. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. **Haematologica** 91:1017-1026, 2006;

MANO J.F., SILVA G.A., AZEVEDO H.S., MALAFAYA P.B., SOUSA R.A., SILVA S.S., BOESEL L.F., OLIVEIRA J.M., SANTOS T.C., MARQUES A.P., NEVES N.M., REIS R.L. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. **J. R. Soc. Interface** 4, 999-1030, 2007;

MATTHEWS V.B; YEOH G.C. Liver Stem Cells. **IUBMB Life**, 57: 549-553, 2005;

MCCORMICK J.B. & HUSO H.A. Stem Cells and Ethics: Current Issues. **J. of Cardiovasc. Trans. Res.** 3:122–127, 2010;

MENG X., ICHIM T.E., ZHONG J., ROGERS A., YIN Z., JACKSON J., WANG H., GE W., BOGIN V., CHAN K.W., THÉBAUD B., RIORDAN N.H. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. **Journal of Translational Medicine** 5:57, 1-10, 2007;

MESSINA E., DE ANGELIS L., FRATI G., MORRONE S., CHIMENTI S., FIORDALISO F., SALIO M., BATTAGLIA M., LATRONICO M.V.G., COLETTA M., VIVARELLI E., FRATI L., COSSU G., GIACOMELLO A. Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine Heart. **Circulation Research** 95:911-921, 2004;

MIURA M., GRONTHOS S., ZHAO M., LU B., FISHER L.W., ROBEY P.G., SHI S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **PNAS**, Vol. 100 (10), 5807–5812, 2003;

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. Matrix Cells from Wharton’s Jelly Form Neurons and Glia. **Stem Cells** 21:50-60, 2003;

MOORE K.A., LEMISCHKA I.R. Stem Cells and Their Niches. **SCIENCE** Vol 311, 1880-1885, 2006;

MOORE K.E., MILLS J.F., THORNTON M.M. Alternative Sources of Adult Stem Cells: A Possible Solution to the Embryonic Stem Cell Debate. **Gender Medicine** 3: 161-168, 2006;

MURAGLIA A., CANCEDDA R., QUARTO R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of Cell Science** 113, 1161-1166, 2000;

NOVIK A.A., IONOVA T.I., GORODOKIN G., SMOLYANINOV A., AFANASYEV B.V. The Maximow 1909 centenary: A reappraisal. **Cellular Therapy and Transplantation (CTT)**, Vol. 1, No. 3, 1-7, 2009;

OKAMOTO O.K., CAMPOS A.H. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. **Einstein**. 2(4):355-358, 2004;

PAYÃO S.L.M., SEGATO R., SANTOS R.R. Controle genético das células-tronco humanas cultivadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 31(Supl. 1): 15-18, 2009;

PEREIRA L.V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, 13(1): 7-14, 2008;

PERES C.M., CURI R. Como Cultivar Células. **Editores Guanabara Koogan**, 2005;

PHINNEY D.G., PROCKOP D.J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair – Current Views. **STEM CELLS** 25:2896–2902, 2007;

POTTEN C.S., LOEFFLER M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties Lessons for and from the Crypt. **Development** 110, 1001-1020, 1990;

REYA T., CLEVERS H. Wnt signalling in stem cells and cancer. **NATURE**. Vol. 434, 843-850, 2005;

REYA, T., MORRISON S.J., CLARKE .F., WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **NATURE**, Vol. 414, 105-111, 2001;

ROCHA V., GLUCKMAN E., Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group. Clinical Use of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells. **Biology of Blood and Marrow Transplantation** 12:34-41, 2006;

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**, v. 21, p. :105-110, 2003;

SALEM H.K., THIEMERMANN C. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status **STEM CELLS** 28:585–596, 2010;

SARUGASER R., LICKORISH D., BAKSH D., HOSSEINI M.M., DAVIES J.E. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. **Stem Cells** 23:220–229, 2005;

SCHWINDT T.T., BARNABÉ G.F., MELLO L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **J Bras Neurocirurg**, 16(1), 13-19, 2005;

SECCO M., MOREIRA Y.B., ZUCCONI E., VIEIRA N.M., JAZEDJE T., MUOTRI A.R., OKAMOTO O.K., VERJOVSKI-ALMEIDA S., ZATZ M. Gene Expression Profile of Mesenchymal Stem Cells from Paired Umbilical Cord Units: Cord is Different from Blood. **Stem Cell Rev and Rep.** 5:387-401, 2009;

SECCO M., ZUCCONI E., VIEIRA N.M., FOGAÇA L.L.Q., CERQUEIRA A., CARVALHO M.D.F., JAZEDJE T., OKAMOTO O.K., MUOTRI A.R., ZATZ M. Mesenchymal stem cells from umbilical cord: Do not discard the cord! **Neuromuscular Disorders** 18, 17–18, 2008(a);

SECCO M., ZUCCONI E., VIEIRA N.M., FOGAÇA L.L.Q., CERQUEIRA A., CARVALHO M.D.F., JAZEDJE T., OKAMOTO O.K., MUOTRI A.R., ZATZ M. Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! **STEM CELLS** 26:146–150, 2008(b);

SOARES A.P., KNOP L.A.H., JESUS A.A., ARAÚJO T.M. Células-tronco em Odontologia. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial** , v. 12, n. 1, p. 33-40, 2007;

SOBOLEWSKI K., MAIKOWSKI A., BANKOWSKI E., JAWORSKI S. Wharton's Jelly as a Reservoir of Peptide Growth Factors. **Placenta**, 26, 747-752, 2005;

SUDO K., KANNO M., MIHARADA K., OGAWA S., HIROYAMA T., SAIJO K., NAKAMURA Y. Mesenchymal Progenitors Able to Differentiate into Osteogenic, Chondrogenic, and/or Adipogenic Cells In Vitro Are Present in Most Primary Fibroblast-Like Cell Populations. **STEM CELLS** 25:1610–1617, 2007;

THOMSON J.A., ITSKOVITZ-ELDOR J., SHAPIRO S.S., WAKNITZ M.A., SWIERGIEL J.J., MARSHALL V.S., JONES J.M. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts **SCIENCE** 282, 1145-1147, 1998;

TROYER D.L., WEISS M.L. Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. **STEM CELLS** 26:591–599, 2008;

WAGERS A.J., WEISSMAN I.L. Plasticity of Adult Stem Cells Review. **CELL** Vol. 116, 639–648, 2004;

WANG H.S., HUNG S.C., PENG S.T., HUANG C.C., WEI H.M., GUO Y.J., FU Y.S., LAI M.C., CHEN C.C. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. **Stem Cells** 22:1330–1337, 2004;

WATT, F.M., DRISKELL, R.R. The therapeutic potential of stem cells. **Phil. Trans. R. Soc. B**, Vol. 365, 155–163, 2010;

WATT, F.M. Stem cell manifesto. Book review. **CELL**, Vol. 96, 470–473, 1999; (doi:10.1016/S0092-8674(00)80643-1)

WEISS M.L., ANDERSON C., MEDICETTY S., SESHAREDDY K.B., WEISS R.J., VANDERWERFF I., TROYER D., MCINTOSH K.R. Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Cells. **STEM CELLS** 26:2865–2874, 2008;

WEISS M.L., TROYER D.L. Stem Cells in the Umbilical Cord. **Stem Cell Reviews** 155-162, 2006;

WEISS M.L., 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** 24:781–792, 2006;

WONG D.J., SEGAL E., CHANG H.Y. Stemness, cancer and cancer stem cells. **Cell Cycle**. 7:23, 3622-3624, 2008;

YEN B.L., HUANG H.I., CHIEN C.C., JUI H.Y., KO B.S., YAO M., SHUN C.T., YEN M., LEE M.C., CHEN Y.C., M.D. Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta. **STEM CELLS** Vol. 23 Issue 1, Pages 3 – 9, 2005;

ZHAO L.R., DUAN W.M., REYES M., KEENE C.D., VERFAILLIE C.M., LOW W.C. Human Bone Marrow Stem Cells Exhibit Neural Phenotypes and Ameliorate Neurological Deficits after Grafting into the Ischemic Brain of Rats. **Experimental Neurology** Vol. 174, Issue 1, Pages 11-20, 2002;

ZAGO M.A., COVAS D.T. Células-Tronco, a Nova Fronteira da Medicina. Editora ATHENEU 1º reimpressão, 1º edição, 2007;

ZHAO Y., GLESNE D., HUBERMAN E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. **PNAS**, Vol. 100, no. 5, 2426–2431, 2003;

ZUK P.A., ZHU M., ASHJIAN P., DE UGARTE D.A., HUANG J.I., MIZUNO H., ALFONSO Z.C., FRASER J.K., BENHAIM P., HEDRICK M.H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell** Vol. 13, 4279–4295, 2002;

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo em forma de manuscrito a ser submetido na revista:



Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord

Aldenise Lizandra de Miranda Oliveira¹, Darlene Paiva Bezerra¹, Lindalva Layse de Lima Malagueta Vieira¹, Gisely Juliane Barbosa de Albertim¹, Williamis do Nascimento¹, Jéssica Varão Vasconcelos¹, Elga Bernardo Bandeira de Melo¹, Valeria Rego Alves Pereira³, Reginaldo Pereira da Silva², Cláudio Gabriel Rodrigues¹, Liliya N. Yuldasheva¹, Márcia Bezerra da Silva¹ e Oleg V. Krasilnikov¹

¹Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ²Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ³Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FioCruz, Recife, Brazil.

CORRESPONDING AUTHOR: Oleg V. Krasilnikov, Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, S/N. Cidade Universitaria, Recife, Pernambuco, Brazil. CEP: 50670-901. Email: kras@ufpe.br

Key words: Wharton's jelly; Spontaneous migration; Stem cell; RVD; Positive selection; Cell differentiation.

ABSTRACT

Introduction: Mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of the human umbilical cord (hwMSCs) are believed to be an important cell source for cell therapy. Their ability to differentiate into several cell lines was demonstrated already. However, diversity of ion channels and their participation in maintenance of hwMSCs homeostasis is not well understood.

Objectives: Establish a simple method of isolation of hwMSCs and their expansion *in vitro* and study of the diversity of ion channels and their participation in maintenance of cell homeostasis.

Methods and results: hwMSCs were isolated by spontaneous migration followed with CD44/CD90 positive selection. The effectiveness of the isolation of stem cells was confirmed by flow cytometry (FACSCalibur). The isolated cells were expanded. More when 90% of the cells were positive for markers of mesenchymal stem cells (CD90, CD44 and CD29), negative for markers of hematopoietic stem cells (CD45, CD34 and CD31) and possessed pronounced differentiation potential. Expression of potassium-, sodium-, calcium and chloride ion channels in cultured hwMSCs was determined with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The presence of different functional potassium channels was further confirmed by whole-cell patch clamp and RVD studies.

Conclusions: These results demonstrate that all main ion channel types, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and Cl^- are expressed in hwMSCs. Functional expression some of them and their participation in cell volume homeostasis was shown for the first time.

INTRODUCTION

The mesenchymal stem cells (MSCs) can be grown and expanded with high efficiency *in vitro* and induced to differentiate into multiple lineages: mesenchymal (adipocytes, osteocytes, chondrocytes) and other cell types such as neurons, hepatocytes (Park et al., 2006; Lee et al., 2004; Hou et al., 2003) cardiomyocytes (Wang et al., 2004), endothelial cells (Kestendjieva et al., 2008), insulin-producing cells (Wu et al., 2009), germ-like cells (Huang et al., 2010) under defined conditions. The human umbilical cord (HUC) has been widely explored in recent years as alternative source of mesenchymal stem cells because they are functionally similar to stem cells derived from bone marrow (BM), regarded as a classic source. HUC collection is not invasive and less expensive than cells obtaining from the BM aspirate (where the method may cause infection, bleeding and chronic pain), moreover it is free from the ethical issues being an extra-embryonic organ usually discarded after birth without harm to mother or baby (Weiss and Troyer, 2006; Can and Karahuseyinoglu, 2007; Secco et al., 2008b). MSCs like the other stem cells are believed to help to cure diseases incurable in our days. What is why the deep study of stem cell biology essential.

The ion channels are membrane protein structures responsible for ion exchange between the cytoplasm and the extracellular environment. Its activity is crucial for such important cellular functions, as synaptic transmission, muscle contraction, hormone secretion, regulation of cell volume, activation of enzymes, cell proliferation and even differentiation. Most experimental data were obtained from the study of immortal tumor cells (Nilius, 2001; Lang, 2007; Okada, 2006; Wehner, 2006; Marcia B.da Silva et al., 2009a). It was established that the concurrent activation of potassium and chloride channels occurs during cell cycle progression (Nilius, 2001; Lang et al., 1998; Lang et al., 2000; Shen et al., 2000) while the their block can interrupt the process (Ullrich and Sontheimer, 1997; Li et al., 2008; Miyazaki et al., 2008; Marcia B.da Silva et al., 2009b) (Nilius and Wohlrab, 1992; Rouzair-Dubois and Dubois, 1998; Wang et al., 2008; Beeton et al., 2008). However, there are few data about ion channels, and their function in stem cells (Li et al., 2006; Park et al., 2007; Heubach et al., 2002; Heubach et al., 2004; Park et al., 2008) and there is no report of ion channels in mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of the human umbilical cord (hwMSCs).

There are numerous methods of isolation depending on both the origin of the tissue and the procedures adopted by laboratories (Secco et al., 2008a; Wang et al., 2004; Weiss and Troyer, 2006; Weiss et al., 2006; Can and Karahuseyinoglu, 2007; Karahuseyinoglu et al., 2007). In this work we aimed to establish a simple method of isolation of hwMSCs and their expansion *in*

in vitro; the study of the diversity of ion channels and their participation in maintenance of cell homeostasis. The latter was achieved by analysis of the expression of ion channels (RT-PCR), whole-cell patch clamp and RVD studies.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and Primary Culture of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of the human umbilical cord

The research protocol was approved by the Human Ethics Committee beings of the Center for Health Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil (n°.420/2007). Informed consent was obtained from mothers planning on cesarean sections. The cords (n = 30) were transported to laboratory in sterile recipient containing cold (4 °C) PBS (pH 7.2), EDTA (2 mM), streptomycin (150 µg/mL), penicillin (150 U/mL) and amphotericin (5 mg/mL) and were processed within few hours from partum. To perform cellular isolation, the cord was rinsed and vessels were perfused in fresh PBS. Then the cord was cut into small pieces (about 1.5 cm length), which were sectioned longitudinally to expose the Wharton jelly and vessels were removed from the matrix. Wharton's jelly tissue was then minced into small fragments to expose a wider area of tissue to the contact with culture medium and transferred to a sterile flask cultured in growth medium containing DMEM low-glucose (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; LGC Biotecnologia), 20% Ham's F-12 - Mixture of Nutrients (Gibco), and penicillin-streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively; Gibco) at 37°C in a humidified (80%) atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. The isolation method made no use of proteases to detach cells from the embedding matrix and based on the "mesenchymal" migratory capability of cells. After 24 hours the entire medium was changed and the flasks were left undisturbed for 7 days. Then 70% of the culture medium was changed twice a week thereafter keeping Wharton's jelly tissue to allow cell migration. Cellular exit from the cord and attachment to the plastic surface of the tissue culture slide was monitored by phase-contrast microscopy. Finally, after 21 days of culture, when fibroblast-like adherent cells (**Figure 1**) covered ~80% of flask surface, the remnants of the jelly fragments were removed. The adherent cells were detached with 0.05% trypsin/0.02% EDTA in phosphate buffer saline (PBS) The cell suspension was washed with growth medium to remove trypsin-EDTA solution and passaged at ratio of 1:3 plates to new flask for expansion. The P3 passage cells (hwMSCs) were used for subsequent studies.

Isolation of mesenchymal stem cells by magnetic sorting

The isolated of stem cell was done from the population of primary mesenchymal cell (PMC). Single-cell suspensions were prepared as described above and suspended in DMEM. The stem cells were isolated through positive selection, with CD44 or CD90, by use of magnetic microbeads according as instruction of manufacturer (StemCell Technologies). Briefly, the PMC (maximal concentration of 100 million cells/mL) was incubated (24°C, 15 minutes) with the positive selection cocktail (100 μ L/mL). After the addition of magnetic microbeads (50 μ L/mL), cells were recovered by successive magnetic sorting steps. The effectiveness of the isolation of stem cells was confirmed using flow cytometry by use of a FACSCalibur flow cytometer and the CellQuest Pro software (BD Biosciences) and typically resulted in $\geq 90\%$ positive population. The selected cells (positive for stem cells markers) were resuspended in growth medium, plated in a sterile flask and kept in at 37°C in a humidified (80%) atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

FACS Analysis

Standard flow cytometry techniques were used to determine the typical cell surface epitope profiles and to characterize them as mesenchymal stem cell. FACS analysis was performed with freshly harvested cells. At least 50000 cells (in 100 μ L PBS/0.5% BSA/2 mMol/L EDTA) were incubated with the respective isotype control (1/1000 diluted, 4°C, 30 min) following with one of the fluorescence-labeled monoclonal antibodies CD90 (eBioscience), CD44 and CD29 (SouthernBiotech); CD45, CD34 and CD31 (FK Biotec) (1/2000 diluted, 4°C, 60 min). To define this profile made simultaneous readings of antibodies associated with different fluorochromes, analysis paired with the positive (FITC) and negative with phycoerythrin (PE) - FITCxPE for reading. The cells without incubation with fluorescence-labeled monoclonal antibodies were used as negative control. 10000 events were collected for each sample.

Growth curves

Population-doubling assay was performed on hWMSCs from passage 3 (P3) in 96-well tissue culture plates (TPP®, Switzerland). The cells were seeded (~500 cells/well). The culture medium was changed twice a week. Cell density was determined using a video imaging system consisting of a CCD video camera (Moticam 2000, Quimis, Diadema, SP, Brazil) attached to Leica DMIL inverted microscope (Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany). Five pre-determined areas at each well were photographed and the images were

collected once per day. Each image was then analyzed off-line using a freeware image analysis program (ImageJ, NIH, USA). The mean number of cells in every three wells was counted daily for 7 days. The cell growth curve was then drawn according to these numbers.

Osteogenic differentiation

To promote osteogenic differentiation, subconfluent P3 to P4 hWMSCs were treated with osteogenic medium, consist in growth medium supplemented with 10 mM β -glycerophosphate, 0.1 μ M dexamethasone, and 200 μ M ascorbic acid-2-phosphate (Sigma). Medium was refilled every 3 days and parallel hWMSCs cultures were maintained in growth medium as controls. Throughout the 3 weeks after induction, the cells were inspected under an optical microscope and their osteogenesis was assessed by von Kossa stain. Briefly, cells were fixed with methanol and stained with 1% silver nitrate (Sigma-Aldrich) for 45 minutes under ultraviolet light, followed by 3% sodium thiosulfate (Sigma-Aldrich) for 5 minutes, and then counterstained with hematoxylin - eosin. Cells control (cultures without the factors of differentiation) were treated the same way.

Two-step real-time TaqMan PCR

The expression pattern of ion channel mRNA in undifferentiated hWMSCs was investigated. The cells were obtained from different donors. The representative of all main groups of ion channels (three types of potassium channels: MAXIK, KCNS1 and hEAG1; sodium channel: SCN1A; calcium channel: CACNA1A; anion channels: p1-VDAC1 and CLCA1) were studied. The specific primers were purchased from Applied Biosystems. Real-time RT-PCR was used. The expression of the housekeeping gene, GAPDH, was used as internal control. The overall RNA was extracted from hWMSCs (P3) using RNAeasy mini kit following the manufacturer's instructions (QIAGEN). RNA yield was evaluated spectrophotometrically (A260/280) and RNA aliquots were stored at -80°C until use. Total RNA fractions were used for subsequent experiments only if the A260/A280 ratio exceeded 1.8. The RNA was transcript to cDNA with superScript reverse (Invitrogen). Shortly, the total RNA (64 ng) was re-suspended in 20 μ l 2X RT Reaction Mix and 2X RT enzyme mix, transferred to the thermocycler, preheated to 25°C for 10 min, incubated at 50 °C for 20 min and inactivated at 85 °C for 5 min. Then 1 μ l of RNase H (2U/ μ l) was added and incubated at 37°C for 20 minute.

The relative quantity from selected transcripts of three independent cDNA samples was assayed by quantitative Real-time TaqMan RT-PCR. Platinum® Quantitative PCR

SuperMix-UDG, magnesium chloride (50mM) and ROX Reference Dye (50X) (Invitrogen) was incubated with cDNA (25 µl) TaqMan PCR assays for each gene target were performed in triplicate on cDNA samples on an Rotor Gene 7000 (Applied Biosystems). For each 25 µl TaqMan reaction, 1 µl cDNA was mixed with 11.25 µl PCR-grade water, 11.25 µl 2x TaqMan Universal PCR Master Mix, 1.25 µl TaqMan Gen Expression Assays, 20x Mix (primer, antisense primer and FAM) (Applied Biosystems). PCR parameters were 50°C for 2 min, 95°C for 2 min, 40-45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 sec. Every time a batch of cDNA was synthesized, parallel TaqMan assays were run for a housekeeping gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), in order to subsequent normalization of cDNA quality and quantity.

The primers used are described in **table 1**. Were studied the expression gene of the followed ion channels: MAXIK (potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1), KCNS1 (Potassium voltage-gated channel, delayer-rectifier, subfamily S), hEAG1 (Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related) member 2), SCN1A (sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit), CACNA1A (calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1^a subunit), pl-VDAC1 (Voltage-dependent anion channel 1) e CLCA1 (Chloride channel, calcium activated). The expression of the GAPDH (gliceroaldeido-3-fosfato-desidrogenase) was used with internal control.

Relative quantification.

A standard curve based on cycle threshold values was used to evaluate gene expression. The relative amount of gene expression for each sample was normalized by dividing the value obtained for the analyzed gene by the value obtained for control gene. Results were analyzed as gene expression relative to the housekeeping gene expression.

Experiments with RVD

hwMSCs cultured in the flasks were harvested with 0.25% trypsin (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) and 1 mM EDTA solution (Sigma) from passages P3 through P4, centrifuged and re-suspended in the medium. The cell suspension was kept at 25°C and used at the same day. For recordings an aliquot of the suspension was transferred to a chamber mounted on the inverted microscope (Leica DMIL; Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany) for 15–20 minutes. After that time, the cells attached to the bottom of the chamber, were subsequently superfused with the Ringer solution containing (mMol/l): 130 NaCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 2.8 KCl and 10 HEPES, with the pH adjusted to 7.4 with Tris-OH mixed with mannitol (300 mOsm/L) at the ratio of 2/1 (v/v). The hyposmotic solution used in RVD

experiments was a mixture only of the control Ringer solution and water with final osmolarity of 200mOsm.

To study the cation channels involved in the mechanism of RVD, inhibitors of ion channels (GB, 100 μ M and TEA, 10mM) were placed in 200 mOsm-Ringer solution.

Cell volume was measured using a video imaging system consisting of a CCD video camera (Moticam 2000, Quimis, Diadema, SP, Brazil) attached to Leica DMIL inverted microscope (Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany). Cell images were collected once per minute during the 30-minute recording. Each image was then analyzed off-line using a freeware image analysis program (ImageJ, NIH, USA). The cross-sectional area of single cells was measured and their volume approximated assuming spherical geometry. Cell volume was calculated using the below equation:

$$V = 4/3 \times S \times (S/\pi)^{1/2}$$

Where S is the area (μm^2). The larger volume found in hypotonic solution was assigned as maximum volume (V_{max}).

Electrophysiology

The analyse electrophysiology of the ionic channel in hwMSCs was done measured the current in the whole cell configuration with patch clamp technique at 25°C. Borosilicate glass electrodes (1.2-mm outer diameter) were pulled with a Narishige puller (modelo PP-830) and had tip resistances of 3-5 m Ω when filled with pipette solution in contact with bath solution. The pipette solution contained (mM): KCl 30; AspK 110; Tris 1; MgCl₂ 5; ATP-Na₂ 4; CaCl₂ 2; EGTA 5; GTP-Na₂ 0.1. The bath solution contained (mM): NaCl 130; KCl 2.8; CaCl₂ 2; MgCl₂ 2; HEPES 10; manitol 18.4. The tip potentials were compensated before the pipette touch the cell. After a gigaohm-seal was obtained by negative suction, the cell membrane was ruptured by gentle suction to establish the whole-cell configuration. Membrane currents were recorded in hwMSCs (third passage) with 300-ms voltage steps from -60 to +60 mV in the absence and in the presence of classical channel blockers, TEA (10 mM) e 4-AP (5 mM). Data were acquired with an EPC8 amplifier (Heka, Lambrecht, Germany). Membrane currents were low-pass filtered at 2 kHz and stored on the hard disk of an IBM-compatible computer.

Data analysis

Nonlinear curve-fitting programs (Origin 8.1 Pro, OriginLab Corporation) were used to perform curve-fitting procedures. Results are presented as means \pm SEM at least three separate experiments. Paired and unpaired Student's *t* tests were used as appropriate to evaluate the statistical significance of differences between two group means, and analysis of variance was used for multiple groups. Values of $p < 0.05$ were considered to indicate statistical significance. Data obtained with FACSCalibur flow cytometer were analyzed with the CellQuest Pro software (BD Biosciences).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and immunophenotyping of adherent cells

We have tested several methods of isolation until we reached the conclusion that the method of "spontaneous migration" of cells is more appropriate as a first step for obtaining mesenchymal cells from Wharton's jelly of human umbilical cord (hwMSCs). As we shown in Methods. The best method was do use no proteases to detach cells from the embedding matrix and to give a possibility to mesenchymal cells spontaneously migrate out of the tissue. With this approach, we regularly obtained a cell population in which we observed cells with fibroblastic, elongated, spindle-shaped morphology with a single nucleus. Images of cells from hwMSCs on the third passage are shown in **Figure 1 (A,B)**. The curve showed that the number of cells increased as the culture time passed. A characteristic growth pattern of a homogeneous cell phenotype (hwMSCs of third passage) was demonstrated a population doubling of 60 ± 10 hours (**Figure 2**).

Flow cytometry analysis showing the immunophenotype of hwMSCs that were obtained from the homogeneous 70-80%-confluent monolayers at the end of the third passage.

Immunophenotyping of these cells by FACS showed that the hwMSCs are positive for specific mesenchymal antigens such as adhesion molecules (CD44), integrin markers (CD29), and extracellular matrix protein (CD90), and were negative for hematopoietic (CD34, CD45), endothelial (CD31) markers in flow cytometry analysis. The hwMSCs phenotype has thus been defined as hwMSCs CD44+, CD90+, CD29+ and CD45-, CD34-, CD31-. The symbol (-) indicates the negative expression for a marker while the symbol (+) indicates the positive expression of a marker. **Figure 3** summarizes the results of immunophenotyping of hwMSCs by FACS analysis for mesenchymal, endothelial and hematopoietic markers and shows mean values of the percentage of positive isolated cells \pm standard error to the total number of cells

analyzed. The results are in general agreement with the data available for mesenchymal stem cells (Dominici, 2006; Can & Karahuseyinoglu, 2007; La Rocca et al., 2009).

In vitro differentiation osteogenic

hwMSCs were differentiated in vitro using osteogenic induction media. Three-four weeks after the osteogenic induction, the cells showed calcification stained Von Kossa; Von Kossa/Hematoxylin and Von Kossa/Hematoxylin/Eosin. All confirmed the osteogenic differentiation which is characterized by the presence of mineralization (**Figure 4 B, D and F**) in cultures of hMSC compare with controls (**Figure 4 A, C and E**).

Hydroxyapatite crystals were found deposited in the extracellular matrix. Moreover, we note that the differentiated cells are able to create bone nodules (**Figure 5**).

Expression ionic channels

Figure 6 displays the mRNA expression for ion channel subunits associated with ion channels. High mRNA level of MAXIK (potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1, responsible for iberitoxin-sensitive outward current) was detected. Very small expression was established for potassium delayer-rectifier voltage-gated channel (KCNS1). The expression of potassium outward rectifying voltage-gated channel, subfamily H member 2 (human ether-a-go-go K⁺ channel, hEAG1) was, to our surprise, not determined at all, although it was detected in mesenchymal-like stem cells from human bone marrow hMSC (Heubach et al., 2004;Li et al., 2005) and from human umbilical cord vein (Park et al., 2007). The expression of voltage-gate sodium channel (type I, SCN1A) was ~100 times lower than MAXIK but >10 times higher than KCNS1. Significant mRNA levels of SCN2 and SCN1 (likely responsible for TTX-sensiviel Na-current) and very small expression of other isoform (SCN5) of voltage-gate sodium channel was shown for human bone marrow stem cells (Li et al., 2005;Heubach et al., 2004).

Voltage dependent calcium-channel (P/Q type, CACNA1A/ CaV2.1) was found to be highly (comparable to MAXIK) expressed in our hwMSCs. The presence of L-type of Ca-channels was early demonstrated in bone marrow stem cells (Heubach et al., 2004;Li et al., 2005). Thereby our data expand the knowledge about diversity of voltage-dependent Ca-channels presented in stem cells. hwMSCs possessed a considerable level of expression of voltage-dependent anion channel (pl-VDAC 1). On the other hand, the expression of calcium

activated chloride channel (CLCA1) noted for embryonic multipotent stem cells (Cai et al., 2004) was undetectable in hwMSCs.

RVD

There are growing numbers of observations showing that progression through the cell cycle is linked with ion permeability of the plasma membrane and that pharmacological blockage of ion channels may lead to inhibition of cell proliferation (Villaz et al., 1995; Czarnecki et al., 2000; Chen et al., 2007; Lang, 2007; Klausen et al., 2007; Burg et al., 2008; Spitzner et al., 2008). The data indicate that the effect may be caused by disruption of cell volume control. Participation of ion channels in cell volume regulation is most prominent in the recovery of volume by swollen cells (Okada, 2004; Okada, 2006). It is believed that during this process, called regulatory volume decrease (RVD), swollen cells lose water by expelling intracellular solutes via Cl^- and K^+ channels. Use the inhibitor of ion channels allow to identify functional ion channels involved in RVD and, therefore, presented in plasma membrane of the examined cells.

We for the first time demonstrated that hwMSC are able to undergo RVD. The examination of RVD was done with single cells with simple geometry (N=41). To characterize RVD, we used the relative units to determine the maximal swollen volumes, V_{max} , (a few minutes after osmotic shift), the rates of cell shrinkage, and the end volumes attained by the end of the measuring period (30 min after the osmotic shift). Under influence of 200 mOsm hypotonic solution the cells initially swelled to $117 \pm 4\%$ (V_{max}) of its pre-swelling volume and then gradually recovered their volume. The characteristic time of the process was 15 ± 2 min (**Figure 7**).

We have found that Tetraethylammonium (TEA) and Glibenclamide (GB), classical blockers of voltage-gated potassium channels (Kv) and ATP-sensitive K^+ channels (Kir6.x) and chloride channels (CFTR – cystic fibrosis transmembrane regulator), correspondingly, inhibit RVD and cells remained swollen for the entire recording period (30 min). Results show the presence of (and participation in RVD) K^+ channels in plasma membrane of mesenchymal stem cells of Wharton's jelly. Interestingly, the peak volume in hypotonic solution (V_{max}) was dependent on the type of inhibitor. In the presence of TEA the initial volume increase under osmotic challenge was smaller ($108 \pm 2.6\%$) than Control, $117 \pm 4\%$. However, it reached the larger value ($121 \pm 3\%$) at 20 min and continues to be at this level for the entire recording period. In the presence of GB the cells initially swollen more $111 \pm 2.8\%$ and then

slowly increased to the value ($116\pm 3\%$) (equal to V_{max} observed for the control cells) at the end of the observation period.

The decrease in the amplitude of the initial cell swelling in the presence of TEA and GB indicates the ability of the cation channel blockers to decrease water influx. This suggestion is consistent with the observation that TEA can block the water flux through aquaporin-1 channels (Yool et al., 2002; Yool, 2007). GB is not absolutely specific to ATP-dependent K⁺ channels. It is known as a potent blocker of Cl⁻ channels including CFTR (Liu et al., 1998). Moreover, there is evidence that aquaporin function may be affected by GB (Schreiber et al., 1999; Ford et al., 2005) and that water transport may be structurally coupled to other membrane transport processes (Blank and Ehmke, 2003). It seems that plasma membrane proteins involved in cell volume homeostasis of hwMSC cells are assembled in a functional platform where ion channels can physically interact with each other and with important effectors of physiologically relevant processes as it has been suggested for some other cells (Rurak et al., 2007; Lu et al., 2007; Kagan et al., 2002; Nitabach et al., 2002; Arcangeli and Becchetti, 2006).

Electrophysiology

Whole cell patch-clamp recordings were made from hwMSCs of *passage 3* (Fig. 3) from three umbilical cords. Electrophysiological recordings were performed using ball-shaped cells obtained after trypsin-EDTA treatment of the cultures shown in the inset of Figure 8A. The membrane currents were elicited by 300-ms voltage steps between -60 and +60 mV from a holding potential of -40 mV. All cells recorded in this study demonstrated outward currents. Most hwMSCs showed a slowly activating, delayed rectifier-like K⁺ current. In some cells, a transient outward K⁺ current was detected. **Figure 8A** illustrates two components of ionic currents activated by the depolarizing voltage steps in a representative hwMSC at isosmotic conditions. One component showed a gradual activating current at potentials between -20 and +30 mV (that is, a delayed rectifier K⁺ current) and another was a rapidly activating current with noisy oscillation at +40 to +60 mV, similar to a voltage-activated and Ca²⁺-activated K⁺ current, reported recently by Heubach and colleagues (Heubach et al., 2004). All of the cells investigated demonstrated outward currents activated by the voltage protocols.

Figure 8B shows current traces recorded in a representative cell with the voltage protocol shown in the inset. The noisy oscillation current was remarkably reduced, and the total

membrane current was partially inhibited by 10 mM TEA. The effect was reversed by washout (**Figure 8C**). Qualitatively similar results were obtained under influence of 4-AP (Data not shown). Inhibition fraction of the membrane current was % by TEA and 50% (at 40 mV) by 4-AP (n =3).

CONCLUSION

The spontaneous migration is a relatively simple method that requires less processing time. The cells were fibroblastoid (fusiform), exhibited more than 90% for the markers found in mesenchymal stem cells and were negatives for hematopoietic and endothelial origin. The hwMSC isolated possessed potential for osteogenic differentiation. Study the response of hwMSC to hypo-osmotic challenge revealed the presence of voltage-gated potassium channels (Kv) and ATP-sensitive K⁺ channels (Kir6.x) in plasma membrane of mesenchymal stem cells of Wharton's jelly. The data of electrophysiology are consistent with the results of RVD experiments and may suggest the presence of at least two types of voltage dependent and ATP-dependent K⁺ channels in plasma membrane of hwMSC. RT-PCR data, in addition, indicate at the presence of voltage-gated potassium channel with inwardly rectifying properties (HERG/ **Kv11.x**), voltage dependent calcium-channel (P/Q type, CACNA1A/ CaV2.1) and voltage-gate sodium channel (type I, SCN1A/ NaV1.1). Thus results demonstrate that all main ion channel types, K⁺, Na⁺, Ca²⁺ and Cl⁻ are expressed in hwMSCs.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil). To Hospital DeÁvila and Hospital das Clínicas de Pernambuco for their assistance with the donation of umbilical cords. To Aggeu Magalhães Research Center for technical support.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Morphology of cultured mesenchymal cells from Wharton jelly of human umbilical cord. The phase contrast microscopic picture of hwMSCs shows the fibroblast-like spindle morphology. Scale bar: 100 μ m.

Figure 2. Cell growth curve of hwMSCs over 7 days. Cells were counted at each time point as described in materials and methods section. Data are shown as mean \pm SE from three separate experiments.

Figure 3. Flow cytometry analysis showing the immunophenotype of hwMSCs that were obtained from the homogeneous confluent monolayer at the end of the third passage. The table shows mean values of the percentage of positive cells \pm standard error to the total number of cells analyzed. Abbreviations: FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin.

Figure 4. Phase contrast microscopy of control hwMSCs (A, C, E) and hwMSCs stimulated (B, D, F) for osteogenic differentiation. Staining was done by: **A e B.** Von Kossa; **C e D.** Von Kossa/Hematoxylin; **E e F.** Von Kossa/Hematoxylin/Eosin. Scale bar: 20 μ m.

Figure 5. Formation of bone nodules in culture of hwMSCs after osteogenic differentiation. **A** - Von Kossa/Hematoxylin; **B** - Von Kossa/Hematoxylin/Eosin. Amplification 200 \times .

Figure 6. Summary of amplification of cDNA derived from message RNA (mRNA) of ion channels with human mesenchymal stem cells of Wharton's jelly of human umbilical cord isolated by our group ($n= 3-5$ donors) (hwMSCs) relative to the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

Figure 7. RVD in proliferating hwMSC in control conditions and in the presence of inhibitors of ion channels. GB and TEA were used in concentration of 100 μ M and 10 mM, correspondingly. N is a number of cells in the experimental groups. The osmolality of the extracellular solution was switched from 300 to 200 mOsm/L after a few minutes of recording at iso-osmotic condition. Note the changes in RVD induced by pharmacological blockade of the cell membrane permeability. The data are presented as mean \pm SE.

Figura 8. Families of cationic ion channel currents in hwMSC. **A.** The upper traces in response to 300-ms voltage steps from a holding potential of -40 mV to test potentials ranging from -60 to $+60$ mV in increments of 10 mV at 0.2 Hz in a representative cell, showing that two components of outward currents are present: one is a slowly activating current like delayed rectifier K^+ current at potentials from -30 to $+30$ mV, and the other is a rapidly activating current with noisy oscillation like Ca^{2+} -activated K^+ current at potentials from $+40$ to $+60$ mV. **B.** The lower traces show the effect of TEA. **C.** The current-voltage relationship in the absence and presence of 10 mM TEA. Ito was substantially inhibited by TEA ($p < .05$ or $p < .01$ at -20 to -60 mV vs. control), and the effect was reversed by washout.

REFERENCES

1. Arcangeli, A. and A. Becchetti. 2006. Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends in Cell Biology* 16:631-639.
2. Beeton, C., B. J. Smith, J. K. Sabo, G. Crossley, D. Nugent, I. Khaytin, V. Chi, K. G. Chandy, M. W. Pennington, and R. S. Norton. 2008. The D-diastereomer of ShK toxin selectively blocks voltage-gated K⁺ channels and inhibits T lymphocyte proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 283:988-997.
3. Blank, M. E. and H. Ehmke. 2003. Aquaporin-1 and HCO₃⁻-Cl⁻ transporter-mediated transport of CO₂ across the human erythrocyte membrane. *J. Physiol* 550:419-429.
4. Burg, E. D., C. V. Remillard, and J. X. J. Yuan. 2008. Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications. *British Journal of Pharmacology* 153:S99-S111.
5. Cai, J., A. Cheng, Y. Luo, C. Lu, M. P. Mattson, M. S. Rao, and K. Furukawa. 2004. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J. Neurochem.* 88:212-226.
6. Can, A. and S. Karahuseyinoglu. 2007. Concise review: Human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 25:2886-2895.
7. Chen, L. X., L. Y. Zhu, T. J. C. Jacob, and L. W. Wang. 2007. Roles of volume-activated Cl⁻ currents and regulatory volume decrease in the cell cycle and proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Proliferation* 40:253-267.
8. Czarnecki, A., S. Vaur, L. Dufy-Barbe, B. Dufy, and L. Bresson-Bepoldin. 2000. Cell cycle-related changes in transient K⁺ current density in the GH3 pituitary cell line. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 279:C1819-C1828.
9. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, Dj, Horwitz, E. 2006 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7.
10. Ford, P., V. Rivarola, O. Chara, M. Blot-Chabaud, F. Cluzeaud, N. Farman, M. Parisi, and C. Capurro. 2005. Volume regulation in cortical collecting duct cells: role of AQP2. *Biology of the Cell* 97:687-697.
11. Heubach, J. F., J. Daniel, M. Bock, E. M. Graf, E. Wettwer, S. Boxberger, M. Bornhauser, and U. Ravens. 2002. Electrophysiological properties of mesenchymal stem cells obtained from human bone marrow. *Circulation* 106:68.
12. Heubach, J. F., E. M. Graf, J. Leutheuser, M. Bock, B. Balana, I. Zahanich, T. Christ, S. Boxberger, E. Wettwer, and U. Ravens. 2004. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Journal of Physiology-London* 554:659-672.

13. Hou, L. L., H. Cao, D. M. Wang, G. R. Wei, C. X. Bai, Y. Zhang, and X. T. Pei. 2003. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *International Journal of Hematology* 78:256-261.
14. Huang, P., L. M. Lin, X. Y. Wu, Q. L. Tang, X. Y. Feng, G. Y. Lin, X. B. Lin, H. W. Wang, T. H. Huang, and L. Ma. 2010. Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Into Germ-Like Cells In Vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* 109:747-754.
15. Kagan, A., Y. F. Melman, A. Krumerman, and T. V. McDonald. 2002. 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K⁺ channel activity. *Embo Journal* 21:1889-1898.
16. Karahuseyinoglu, S., O. Cinar, E. Kilic, F. Kara, G. G. Akay, D. O. Demiralp, A. Tukun, D. Uckan, and A. Can. 2007. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: In situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 25:319-331.
17. Kestendjieva, S., D. Kyurkchiev, G. Tsvetkova, T. Mehandjiev, A. Dimitrov, A. Nikolov, and S. Kyurkchiev. 2008. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biology International* 32:724-732.
18. Klausen, T. K., A. Bergdahl, C. Hougaard, P. Christophersen, S. F. Pedersen, and E. K. Hoffmann. 2007. Cell cycle-dependent activity of the volume- and Ca²⁺-activated anion currents in Ehrlich Lettre Ascites cells. *Journal of Cellular Physiology* 210:831-842.
19. 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. 2009. 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* 131:267-282.
20. Lang, F. 2007. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *Journal of the American College of Nutrition* 26:613S-623S.
21. Lang, F., A. Lepple-Wienhues, M. Paulmichl, I. Szabo, D. Siemen, and E. Gulbins. 1998. Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*. 8:285-292.
22. Lang, F., M. Ritter, N. Gamper, S. Huber, S. Fillon, V. Tanneur, A. Lepple-Wienhues, I. Szabo, and E. Gulbins. 2000. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*. 10:417-428.
23. Lee, O. K., T. K. Kuo, W. M. Chen, K. D. Lee, S. L. Hsieh, and T. H. Chen. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103:1669-1675.
24. Li, G. R., X. L. Deng, H. Sun, S. S. Chung, H. F. Tse, and C. P. Lau. 2006. Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow. *Stem Cells* 24:1519-1528.
25. Li, G. R., H. Sun, X. Deng, and C. P. Lau. 2005. Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells* 23:371-382.

26. Li, M., B. Wang, and W. Lin. 2008. Cl-channel blockers inhibit cell proliferation and arrest the cell cycle of human ovarian cancer cells. *European Journal of Gynaecological Oncology* 29:267-271.
27. Liu, Y., S. Oiki, T. Tsumura, T. Shimizu, and Y. Okada. 1998. Glibenclamide blocks volume-sensitive Cl⁻ channels by dual mechanisms. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 44:C343-C351.
28. Lu, L., Q. Zhang, V. Timofeyev, Z. Zhang, J. N. Young, H. S. Shin, A. A. Knowlton, and N. Chiamvimonvat. 2007. Molecular coupling of a Ca²⁺-activated K⁺ channel to L-type Ca²⁺ channels via alpha-actinin2. *Circulation Research* 100:112-120.
29. Marcia B.da Silva, V. R. A. P. Maria Assis Costa, E. B. B. d. M. D. P. B. Gisely Juliane Barbosa da Silva, C. G. R. C. M. M. C. Reginaldo Pereira da Silva, Liliya N.Yuldasheva, and Oleg V.Krasilnikov. 2009a. Ion Channels In Volume Regulation And Cell Cycle Progression Of Clonal Kidney Cells. Submitted.
30. Marcia B.da Silva, V. R. A. P. Maria Assis Costa, E. B. B. d. M. D. P. B. Gisely Juliane Barbosa da Silva, C. G. R. C. M. M. C. Reginaldo Pereira da Silva, Liliya N.Yuldasheva, and Oleg V.Krasilnikov. 2009b. Ion Channels In Volume Regulation And Cell Cycle Progression Of Clonal Kidney Cells. Submitted.
31. Miyazaki, H., A. Shiozaki, N. Niisato, R. Ohsawa, H. Ito, Y. Ueda, E. Otsuji, H. Yamagishi, Y. Iwasaki, T. Nakano, T. Nakahari, and Y. Marunaka. 2008. Chloride ions control the G(1)/S cell-cycle, checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human gastric cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366:506-512.
32. Nilius, B. 2001. Chloride channels go cell cycling. *J. Physiol* 532:581.
33. Nilius, B. and W. Wohlrab. 1992. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J. Physiol* 445:537-548.
34. Nitabach, M. N., D. A. Llamas, I. J. Thompson, K. A. Collins, and T. C. Holmes. 2002. Phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent modes of modulation of Shaker family voltage-gated potassium channels by Src family protein tyrosine kinases. *Journal of Neuroscience* 22:7913-7922.
35. Okada, Y. 2004. Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell Biochem. Biophys.* 41:233-258.
36. Okada, Y. 2006. Cell volume-sensitive chloride channels: Phenotypic properties and molecular identity. *Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation. Contrib Nephrol.* 152:9-24.
37. Park, K. S., M. R. Choi, K. H. Jung, S. Kim, H. Y. Kim, K. S. Kim, E. J. Cha, Y. Kim, and Y. G. Chai. 2008. Diversity of Ion Channels in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 12:337-342.

38. Park, K. S., K. H. Jung, S. H. Kim, K. S. Kim, M. R. Choi, Y. Kim, and Y. G. Chai. 2007. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. *Stem Cells* 25:2044-2052.
39. Park, K. S., Y. S. Lee, and K. S. Kang. 2006. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Journal of Veterinary Science* 7:343-348.
40. Rouzair-Dubois, B. and J. M. Dubois. 1998. K⁺ channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J. Physiol* 510 (Pt 1):93-102.
41. Rurak, J., G. Noel, L. Lui, B. Joshi, and H. Moukhles. 2007. Distribution of potassium ion and water permeable channels at perivascular glia in brain and retina of the Large(myd) mouse. *Journal of Neurochemistry* 103:1940-1953.
42. Schreiber, R., R. Nitschke, R. Greger, and K. Kunzelmann. 1999. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 274:11811-11816.
43. Secco, M., E. Zucconi, N. M. Vieira, L. L. Q. Fogaca, A. Cerqueira, M. D. F. Carvalho, T. Jazedje, O. K. Okamoto, A. R. Muotri, and M. Zatz. 2008a. Mesenchymal stem cells from umbilical cord: Do not discard the cord! *Neuromuscular Disorders* 18:17-18.
44. Secco, M., E. Zucconi, N. M. Vieira, L. L. Q. Fogaca, A. Cerqueira, M. D. F. Carvalho, T. Jazedje, O. K. Okamoto, A. R. Muotri, and M. Zatz. 2008b. Multipotent stem cells from umbilical cord: Cord is richer than blood! *Stem Cells* 26:146-150.
45. Shen, M. R., G. Droogmans, J. Eggermont, T. Voets, J. C. Ellory, and B. Nilius. 2000. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *Journal of Physiology-London* 529:385-394.
46. Spitzner, M., J. R. Martins, R. B. Soria, J. Ousingawat, K. Scheidt, R. Schreiber, and K. Kunzelmann. 2008. Eag1 and bestrophin 1 are up-regulated in fast-growing colonic cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 283:7421-7428.
47. Ullrich, N. and H. Sontheimer. 1997. Cell cycle-dependent expression of a glioma-specific chloride current: proposed link to cytoskeletal changes. *Am. J. Physiol* 273:C1290-C1297.
48. Villaz, M., J. C. Cinniger, and W. J. Moody. 1995. A voltage-gated chloride channel in ascidian embryos modulated by both the cell cycle clock and cell volume. *J. Physiol* 488 (Pt 3):689-699.
49. Wang, H. S., S. C. Hung, S. T. Peng, C. C. Huang, H. M. Wei, Y. J. Guo, Y. S. Fu, M. C. Lai, and C. C. Chen. 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22:1330-1337.
50. Wang, S. P., J. A. Wang, R. H. Luo, W. Y. Cui, and H. Wang. 2008. Potassium channel currents in rat mesenchymal stem cells and their possible roles in cell proliferation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35:1077-1084.

51. Wehner, F. 2006. Cell volume-regulated cation channels. *Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation* 152:25-53.
52. Weiss, M. L., S. Medicetty, A. R. Bledsoe, R. S. Rachakatla, M. Choi, S. Merchav, Y. Q. Luo, M. S. Rao, G. Velagaleti, and D. Troyer. 2006. Human umbilical cord matrix stem cells: Preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 24:781-792.
53. Weiss, M. L. and D. L. Troyer. 2006. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Reviews* 2:155-162.
54. Wu, L. F., N. N. Wang, Y. S. Liu, and X. Wei. 2009. Differentiation of Wharton's Jelly Primitive Stromal Cells into Insulin-Producing Cells in Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A* 15:2865-2873.
55. Yool, A. J. 2007. Functional domains of aquaporin-1: Keys to physiology, and targets for drug discovery. *Current Pharmaceutical Design* 13:3212-3221.
56. Yool, A. J., O. H. Brokl, T. L. Pannabecker, W. H. Dantzler, and W. D. Stamer. 2002. Tetraethylammonium block of water flux in Aquaporin-1 channels expressed in kidney thin limbs of Henle's loop and a kidney-derived cell line. *BMC Physiol* 2:4.

FIGURES

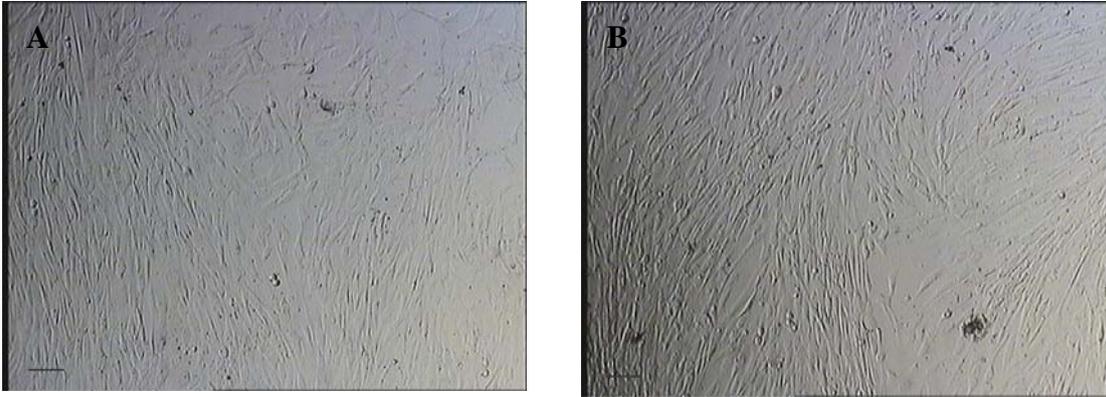


Figure 1.

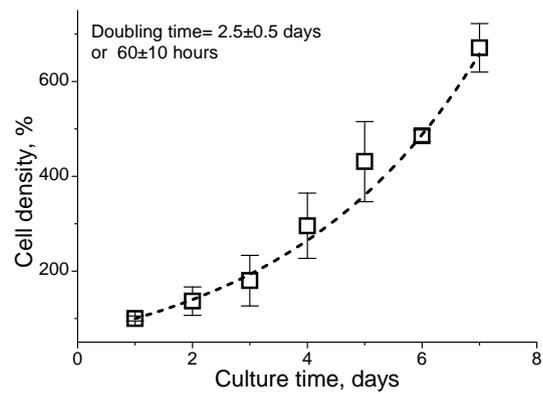


Figure 2.

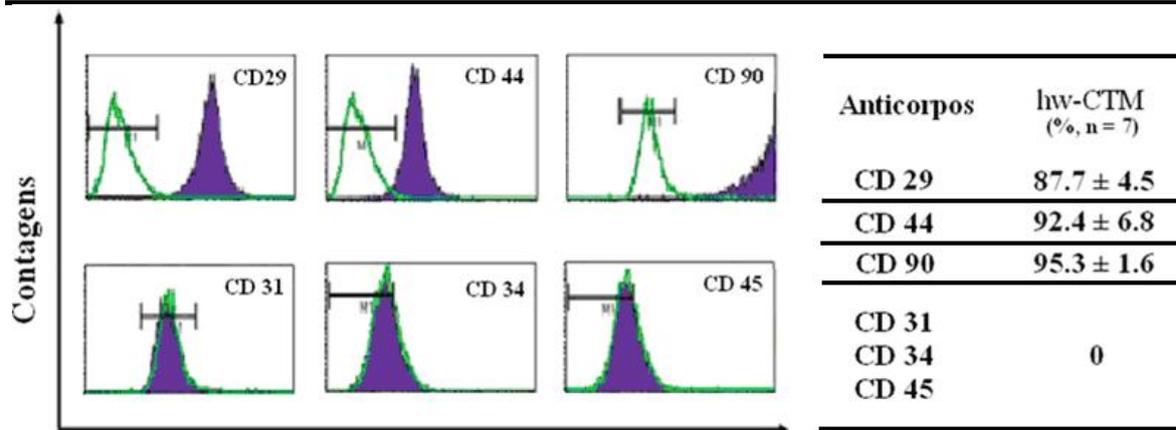


Figure 3.

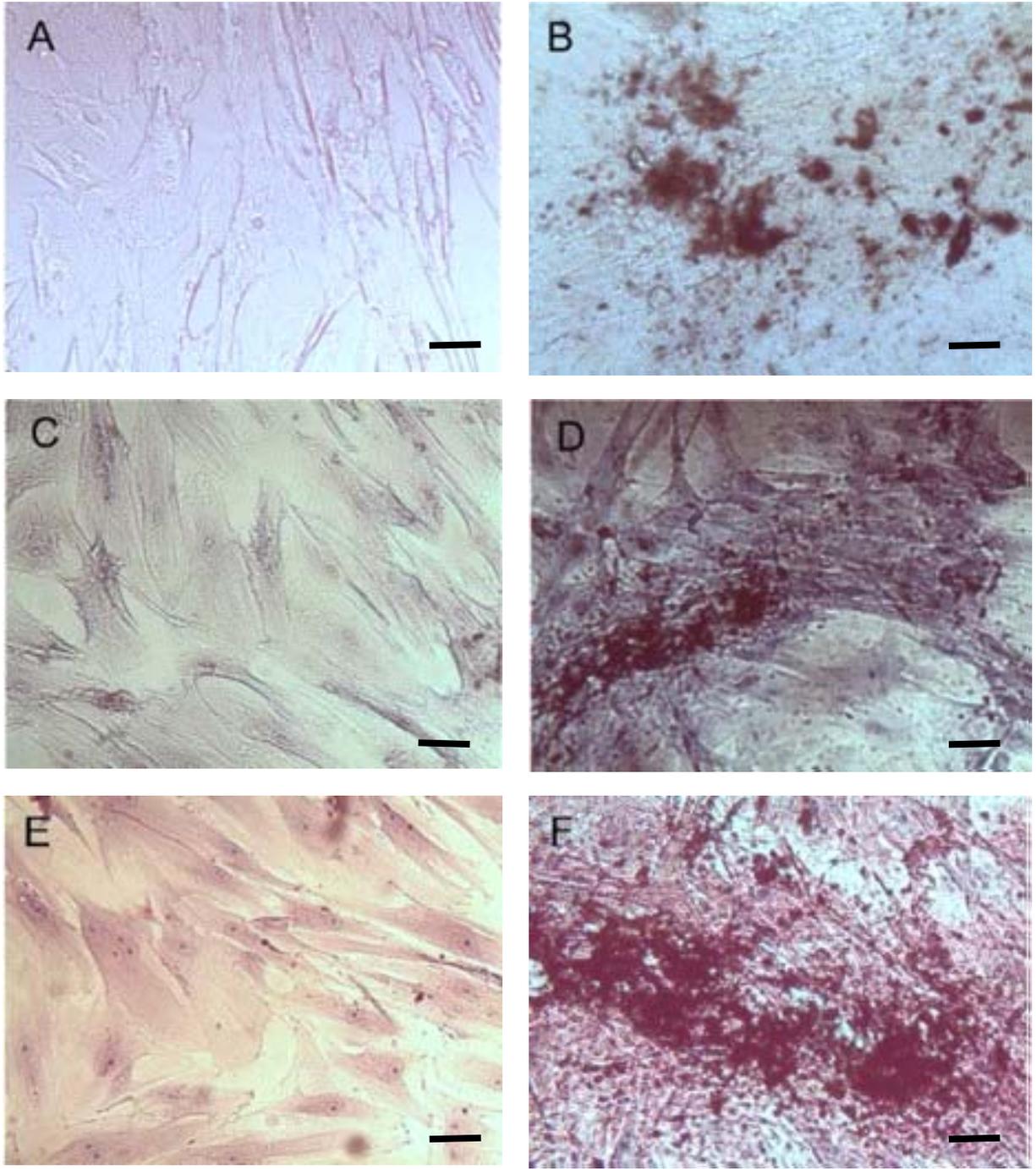


Figure 4.

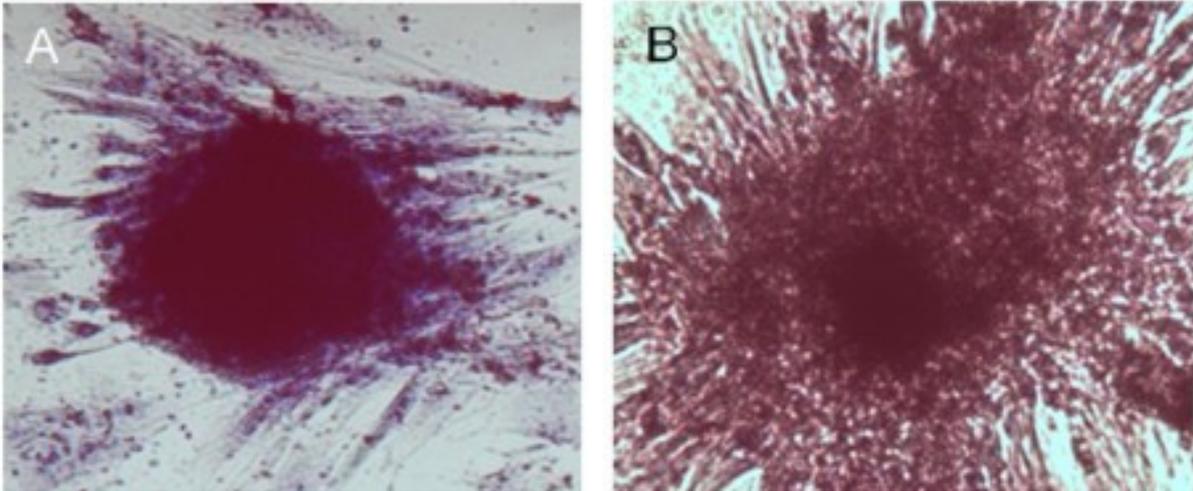


Figure 5.

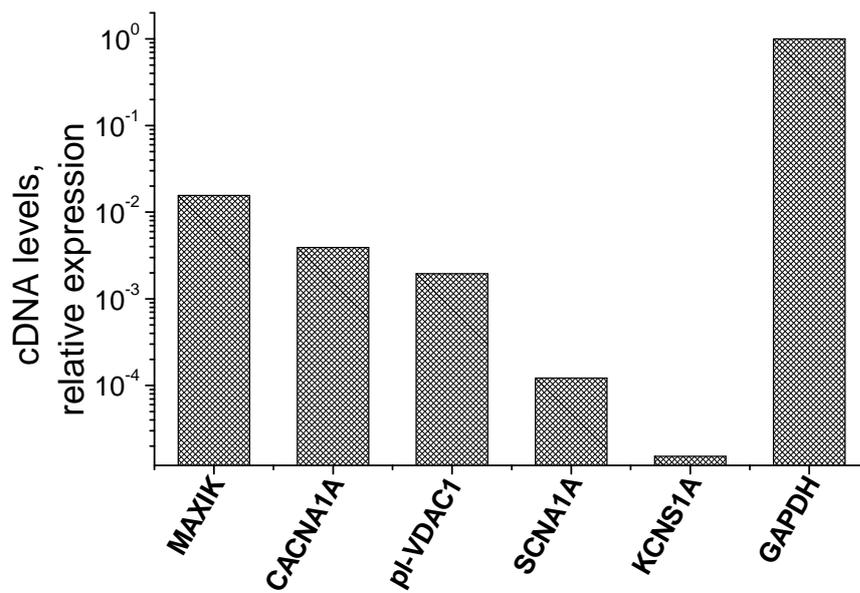


Figure 6.

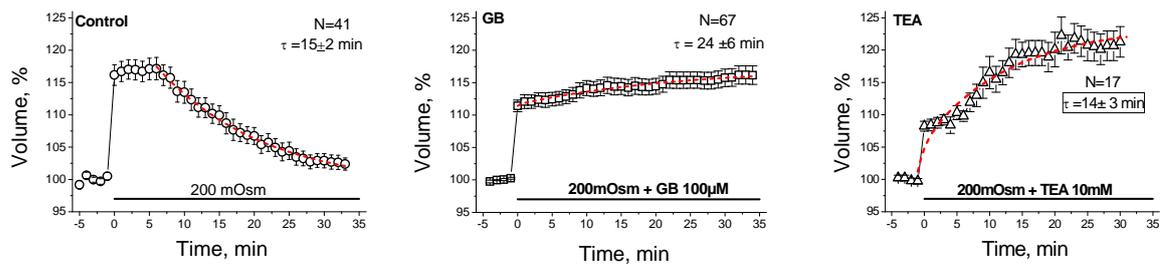


Figure 7.

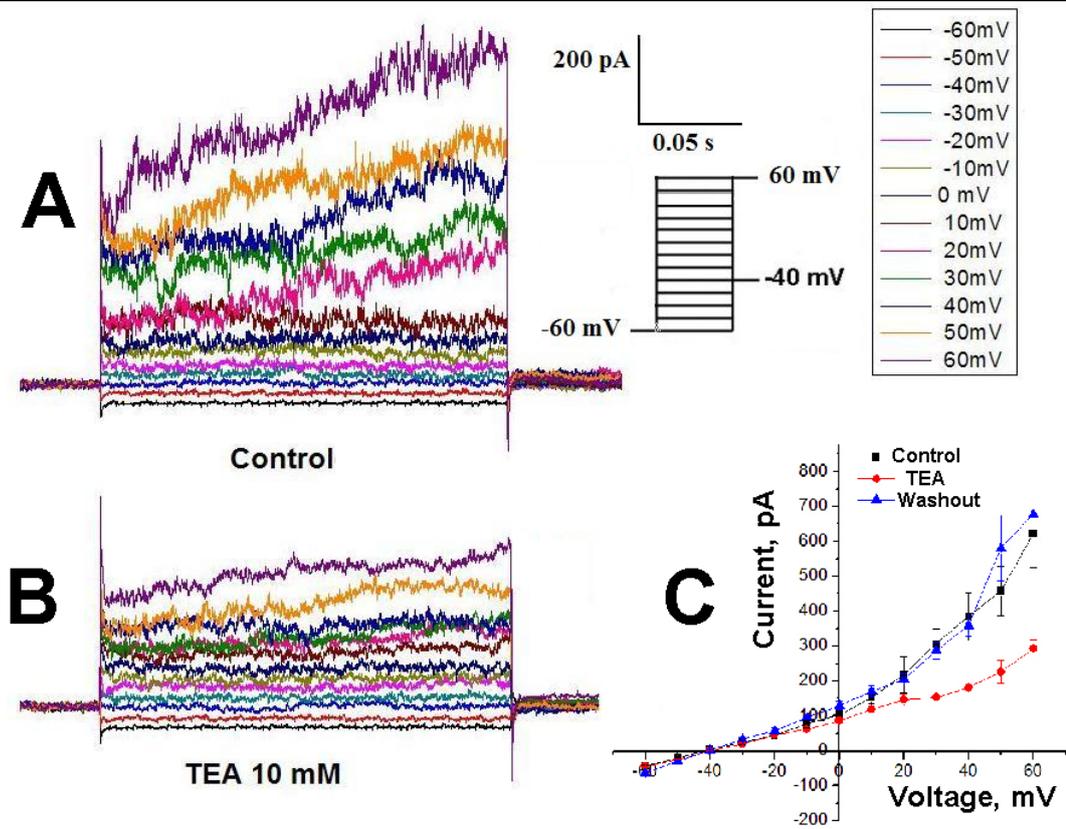


Figure 8.

Table 1. Primers used at PCR in real time.

<i>Gene</i>	Applied Biosystems Access Number
MAXIK	651539
hEAG1	637756
KCNS1	441423
SCN1A	635565
pl-VDAC 1	548775
CLCA1	590233
CACNA1A	629122

6. CONCLUSÕES

A “migração espontânea” é um método relativamente simples que requer menos tempo de processamento. As células isoladas por migração espontânea apresentam um grande índice de marcadores específicos (70-80%) das células-tronco já na cultura primária. Os resultados obtidos indicam que seleção positiva aplicada como a segunda etapa da purificação aumenta adicionalmente a pureza das células-tronco até 90-95%. As células foram positivas para os marcadores das células-tronco mesenquimais (CD90+; CD44+; CD29+) e negativas para os de origem hematopoéticas e endoteliais (CD45-; CD34- e CD31-). As células tiveram morfologia fibroblastóide (fusiforme), possuíram bom tempo de duplicação e o potencial de diferenciação osteogênico pronunciado.

7. PERSPECTIVAS

- Testar células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano e/ou células diferenciadas na reconstituição de osso *in vitro*;
- Realizar outras diferenciações, tais como: adipogênese, condrogênese e neurogênese;
- Construir linhagem imortalizada de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano, caracterizá-las e certificar de sua segurança em estudos *in vitro*;
- Utilizar as tecnologias de pinças ópticas e *quantum dots* como ferramentas de estudo junto às células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano, imortalizadas ou não.

8. ANEXOS

Anexo I: Parecer do comitê de ética em pesquisa da UFPE:



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 100/2007 - CEP/CCS

Recife, 14 de maio de 2007

Registro CONEP: 13473

Registro do SISNEP FR – 82101

CAAE – 1467.0.172.000-06

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 001/06

Título: “Canais Iônicos na Regulação da Proliferação e Diferenciação de Células-Troncos”

Pesquisador Responsável: Oleg Vladimirovich Krasilnikov

Senhor Pesquisador:

Informamos que a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, analisou o protocolo em epígrafe e emitiu o seguinte parecer: **PROTOCOLO APROVADO.**

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

ANEXO: Parecer CONEP Nº: 420/2007

Atenciosamente

Prof. Gerardo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao
Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov
Dep. de Biofísica e Radiobiologia – CCB /UFPE



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 420/2007

Registro CONEP: 13473 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 1467.0.172.000-06

Processo nº 25000.172291/2006-61

Projeto de Pesquisa: "Canais iônicos na regulação da proliferação e diferenciação de células-troncos".

Pesquisador Responsável: Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov

Instituição: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco

CEP de Origem: Centro de Ciências da Saúde – CCS/UFPE

Área Temática Especial: Novos procedimentos.

Patrocinador: CNPq

Sumário Geral do Protocolo

Trata-se de estudo que buscará investigar o papel dos canais iônicos na regulação da proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais de veias de cordão umbilical humano.

Serão usados 40 cordões umbilicais com 30 a 40 semanas de gestação. O processamento dos cordões ocorrerá 12 horas após o parto normal. Os critérios de inclusão e exclusão são bem explicitados. Há descrição das técnicas de laboratório a serem empregadas.

Considerações

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1371/2006, cabem as seguintes considerações:

- a) O pesquisador apresentou cronograma atualizado e Folha de Rosto com as informações completas.
- b) Informações sobre as técnicas descritas no protocolo com as respectivas referências foram adicionadas.
- c) Não haverá armazenamento de material biológico, mas guarda provisória até o seu descarte.
- d) A nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contempla as informações necessárias à participação voluntária do sujeito da pesquisa.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 10 de maio de 2007.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora Interina da CONEP/CNS/MS

Anexo II: Termo de consentimento livre e esclarecido:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E
RADIOBIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Canais iônicos na Regulação da Proliferação e Diferenciação de Células-tronco.

Local do estudo: Laboratório de Biofísica das Membranas do Departamento de Biofísica e Radiobiologia /CCB da Universidade Federal de Pernambuco.

Av. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife, PE. 50670-901. Fone: 2126 8535

Coordenador da pesquisa: Professor Dr. Oleg Vlademirovich Krasilnikov.

Parturiente convidada: você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa que tem como objetivo estudar e descrever as mudanças de tamanho das células de cordão-umbilical humano (células-tronco) e se estas mudanças influenciarão na divisão e formação de novas células. Sua participação, caso seja concedida será a de doadora do cordão umbilical após o parto.

Descrição do trabalho: o cordão umbilical doado será coletado no Setor da Obstetria do Hospital D'Ávila-Recife. Após a coleta do cordão umbilical, o mesmo será transportado de forma adequada para o Laboratório de Cultura de células do Depto. de Biofísica, onde será processado para a retirada das células. Os restos do cordão serão levados para o sistema rotineiro de descartes de excedentes biológicos do Hospital das Clínicas. As células retiradas serão depositadas em garrafas de cultura. Alíquotas destas células serão analisadas individualmente em um equipamento específico (citômetro de fluxo) do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife. Paralelamente no Departamento de Biofísica estas células serão analisadas quanto as mudanças de volume em soluções fisiológicas com diferentes concentrações do soluto.

Riscos e benefícios: A doação do cordão umbilical não trará quaisquer complicações para a paciente visto que o cordão é normalmente descartado e incinerado como lixo biológico. Depois da retirada das células o processo de incineração (queimado) será realizado no Hospital das Clínicas por tratar-se do Hospital mais próximo.

Na condição de doadora de cordão umbilical você não terá benefícios diretos com essa pesquisa, mas estará contribuindo para os estudos científicos que visam no futuro próximo, utilizar células-tronco para tratar pacientes que precisam utilizar esta terapia na tentativa de uma vida saudável.

A sua participação como paciente doadora de cordão umbilical é voluntária: Você é livre para escolher se quer fazer a doação e também pode a qualquer momento pedir para parar de participar da pesquisa; será necessário apenas fazer uma comunicação verbal ou escrita ao responsável pela pesquisa.

Termo de Confidencialidade: As informações obtidas através desta pesquisa serão tratadas com rigoroso sigilo. Os resultados obtidos poderão ser utilizados para fins de ensino e pesquisa, no entanto, sua identidade como doadora do cordão umbilical será preservada.

Consentimento da Paciente: Este termo de consentimento tem duas (02) vias assinadas pela doadora do cordão umbilical e pela pesquisadora responsável pela coleta do cordão umbilical. Uma das vias ficará com a doadora do cordão umbilical.

Este termo de consentimento convida-me como parturiente, a participar de uma pesquisa na qual doarei o cordão umbilical para retirada de células. Sinto-me devidamente esclarecida em relação ao seu conteúdo. Decido por livre e espontânea vontade participar desta pesquisa, assinando o presente documento. Reservo-me o direito de a qualquer momento que julgar conveniente, interromper a minha participação na pesquisa sem qualquer penalização.

Nome do Paciente LETRA DE FORMA	Assinatura do Paciente	Data
Nome do Responsável	Assinatura do Responsável	Data
Nome da Testemunha	Assinatura da Testemunha	Data
Nome da Testemunha	Assinatura da Testemunha	Data
Nome da Testemunha	Assinatura da Testemunha	Data
Nome do Pesquisador	Assinatura do Pesquisador	Data

Anexo III: Trabalho enviado à FeSBE 2009:

ESTUDO COMPARATIVO DO ISOLAMENTO E EXPANSÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL.

MIRANDA-OLIVEIRA, A.L., BEZERRA, D.P., SILVA, M.B., YULDASHEVA, L.N., KRASILNIKOV, O.V. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, Recife/PE.

Objetivos

Tecido de cordão umbilical humano tem sido muito explorado nos últimos anos como fonte de células-tronco, as quais podem ser expandidas em cultura e dar origem a múltiplas linhagens. Neste trabalho testamos diferentes métodos para isolamento de células de cordão umbilical e cultivo *in vitro* visando estabelecer condições ótimas de obtenção e expansão destas células.

Métodos

Comparamos um método convencional enzimático com a “migração espontânea”. Cordões umbilicais de partos cesários (n=30, com 36 a 38 semanas de idade gestacional) foram coletados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (no.420/2007). Os cordões foram depositados em um recipiente estéril contendo PBS (pH=7,2), EDTA (2 mM), estreptomicina (150 µg/mL), penicilina (150 U/mL) e anfotericina (5 µg/mL), a 4°C e foram utilizados entre 2-8 horas após a coleta. Os vasos foram perfundidos com PBS, retirados do cordão, cortados em fragmentos (5-10 mm). Tecido remanescente (geléia de Wharton) também foi fragmentado em pequenos pedaços. Fragmentos de vasos e da geléia foram divididos em duas partes. Uma delas foi tratada com colagenase tipo IV (250U/mL; 20 min, 25°C) ou tripsina (1000U/mL; 20 min, 25°C), as células liberadas foram centrifugadas e transferidas para placas de Petri contendo DMEM-LG suplementado com 20% de soro fetal bovino, 20% F-12 (Ham), estreptomicina (50 µg/mL), penicilina (50 U/mL) e anfotericina (2,5 µg/mL) e cultivadas em estufa de CO₂ a 37°C. A outra parte foi transferida diretamente para placas de Petri sem tratamento enzimático, complementado com mesmo meio de cultura. Os fragmentos foram deixados em repouso por 3-5 dias, para permitir migração de células do explante. As culturas tiveram seus meios trocados a cada 3 dias.

Resultados

Observamos que as células migraram espontaneamente dos vasos e da geléia de Wharton para a superfície da placa de cultura e com cerca de 20 dias atingiram uma confluência de 100%. As células fusiformes foram predominantes nestas culturas. As células provenientes da geléia demoraram mais dias para atingir uma confluência quando comparadas às dos vasos. Diferentemente do esperado, as células dos tecidos tratados com enzimas apresentaram expansão lenta.

Conclusão

A “migração espontânea” é um método relativamente simples que demanda menos tempo e resulta em mais células quando comparada com o método enzimático.

Apoio Financeiro: CNPq, Capes, FACEPE.

Anexo IV: Trabalho enviado ao IV Simpósio Internacional de Terapias Avançadas e Células-Tronco:

ISOLAMENTO RÁPIDO E EFICAZ DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL

MIRANDA-OLIVEIRA, A.L., MALAGUETA-VIEIRA L.L.L, FRAGOSO, A.S., SILVA, M.B., YULDASHEVA, L.N., KRASILNIKOV, O.V. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, Recife/PE.

Objetivos

Todos os tecidos de adultos podem ser usados como fonte de células-tronco, as quais podem ser expandidas em cultura e dar origem a múltiplas linhagens. Neste trabalho testamos diferentes métodos para escolher um que demanda menos tempo para isolamento e resulta em mais células utilizando geléia de Wharton de cordão umbilical humano como um exemplo.

Métodos

Comparamos um método convencional enzimático (tratamento com tripsina e/ou colagenase) com a “migração espontânea”. O isolamento de células-tronco foi feito a partir da população primária de células mesenquimais. Utilizamos, para isso uma nova metodologia da seleção celular imunomagnética “column-free” conhecida como “*EasySep Magnet - EMA*”. Este método (compatível com “*Fluorescence Activated Cell Sorting*” – FACS) utiliza anticorpos específicos associados com fluorocromo e nanopartículas magnéticas para a seleção de células. Foi escolhido o modo de seleção positiva. As células primeiramente foram tratadas com anticorpos específicos para células-tronco mesenquimais (CD44-FITC, CD29-FITC...) e, em seguida, foram submetidas à seleção. A eficácia do isolamento das células-tronco foi comprovada por citometria de fluxo (FACSCalibur). A expressão dos marcadores específicos nas células foi comprovada por imunofluorescência. A diferenciação osteogênica foi induzida durante seis semanas com meio de cultura (DMEM+F12+SFB) suplementado com indutores: ácido ascórbico, dexametasona e β -glicerofosfato. Todos experimentos foram realizados de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (nº.420/2007).

Resultados

A quantidade das células obtidas de tecidos tratados com enzimas foi menor do que às obtidas por “migração espontânea”. Além disso, elas apresentaram expansão mais lenta. As células primárias da “migração espontânea” mostraram presença de ~15% de células positivas aos marcadores das células-tronco mesenquimais. As células selecionadas, que foram obtidas da suspensão por seleção positiva, tiveram morfologia fibroblastóide e possuíram potencial de diferenciação. Especificamente, o estímulo osteogênico originou características osteocíticas que foi comprovada por coloração citohistoquímica (Von Kossa) onde se observou o aparecimento de cristais de hidroxapatita na matriz extracelular. Os dados comprovam tal diferenciação.

Conclusão

A “migração espontânea” é um método relativamente simples que demanda menos tempo e resulta em mais células do tecido adulto testado e com maior índice com marcadores específicos das células-tronco quando comparada com o método enzimático. A seleção positiva com nanopartículas magnéticas é um método eficaz e rápido para obtenção de células enriquecidas com células-tronco.

Financiadores: CNPq; Capes; FACEPE.

Anexo V: Instruções da revista aos autores do periódico do trabalho:

CELL PROLIFERATION – Author Guidelines:

Manuscript Format

The manuscript should bear the title of the paper and name and address and email address of each author, together with the name of the hospital, laboratory or institution where the work has been carried out. The name, full postal address, telephone and fax numbers and e-mail address of the author for correspondence, who will be responsible for reading the proofs, should be given on the first page. An informative abstract must be included. For original research papers, the abstract must be structured as follows: *Objectives, Materials and methods, Results and Conclusions*. Please do not justify the text. Particular attention should be taken to ensure that any articles submitted should adhere exactly to the Journal style in all respects. The author must keep a copy of the manuscript. The Editorial board reserves the right to make literary corrections.

Spelling should conform to The Concise Oxford Dictionary of Current English; Full names with uncommon abbreviations must be given with the first mention; new abbreviations should be made only for long or unwieldy names and should not be used at all unless the name occurs frequently. In the title and abstract unusual abbreviations should be avoided; in the introduction and discussion they should be used sparingly. SI (Systeme International) units and abbreviations should be used for all units; other abbreviations should conform with those shown below.

LI - labelling index
 MI - mitotic index
 GF - growth fraction
 BrdUrd - bromodeoxyuridine
 IdUrd - iododeoxyuridine
 [³H]dT - tritiated thymidine
 G0, G1, G2, M, S - phases of the cell cycle
 TC, TCO - duration of the cell cycle
 TG1, TS - durations of the phases of the cell cycle

Illustrations

Charts, diagrams, photographs and photomicrographs should be uploaded electronically, as separate files, as described above. Where there is any possible doubt as to the orientation of an illustration, the top should be marked with an arrow. Each figure should be numbered corresponding with the numbering given in the text. Photographs and photomicrographs should be unmounted glossy prints and should be indicated on a transparent overlay. Colour illustrations will be accepted when found necessary by the Editor, although the author will be expected to contribute to the cost. Please fill out a Colour Work Agreement form and send it to the Production Office with your copyright license form. This can be downloaded from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf

In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in the printed version of the journal, *Cell Proliferation* offers authors the opportunity to reproduce colour figures for free in the online version of the article (but in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should indicate this clearly in the Colour Work Agreement form.

Artwork should be supplied electronically, of appropriate size and with line thickness sufficient for suitable reproduction: photographs as TIFF or EPS files, line art as EPS files or embedded in a word processor document. Full details can be found at <http://www.authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>. Each illustration should be accompanied by a legend clearly describing it; these legends should be grouped on a separate sheet of paper.

There should be as few tables as possible and these should include only essential data; they should be presented on separate sheets and should be given Arabic numbers.

References

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>. Identify references in text, tables and legends by Arabic numerals in parentheses. References must be listed in Vancouver style, and the references list should be numbered consecutively in the order in which the references are first mentioned in the text. Only papers closely related to the author's work should be referred to; exhaustive lists should be avoided. References to articles and papers should give: name(s) followed by the initials of the author(s); title of paper; abbreviated title of the journal as shown in Index Medicus; year of publication in parentheses; volume; first and last pages referred to. References to books and monographs should include: author(s); title; edition; year of publication; publisher(s); place of publication; first and last pages referred to. For articles with more than 6 authors, only the first 6 authors should be listed, followed by *et al.* Reference to chapters in edited compilations should include: name(s) of authors of the chapter; title of the chapter; name of the book; edition; date of publication; name(s) of the editor(s); publisher(s); place of publication; first and last pages referred to.

Examples:

1. Watkins SJ, Norbury CJ (2004) Cell cycle-related variation in subcellular localization of eIF3e/INT6 in human fibroblasts. *Cell Prolif.* **37**, 149-160.
2. Alison MR, Sarraf CE (1997) *Understanding Cancer*, pp. 99-101. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
3. Maurer HR (1992) Towards chemically defined serum-free media for mammalian cell culture. In: Fersheny RI, ed. *Animal Cell Culture-A Practical Approach*, 2nd edn, pp. 15-46. Oxford, UK: I.R.L. Press.