

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

DANIEL RODRIGO MARINOWIC

**AVALIAÇÃO DA INDIFERENCIAÇÃO CELULAR E INDUÇÃO DE NEURODIFERENCIAÇÃO
EM CO-CULTIVO DE FIBROBLASTOS NIH 3T3 COM CÉLULAS MONONUCLEARES DO
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL**

Porto Alegre

2011

DANIEL RODRIGO MARINOWIC

**AVALIAÇÃO DA INDIFERENCIAÇÃO CELULAR E INDUÇÃO DE NEURODIFERENCIAÇÃO
EM CO-CULTIVO DE FIBROBLASTOS NIH 3T3 COM CÉLULAS MONONUCLEARES DO
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Neurociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa DaCosta

Porto Alegre

2011

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

M339a Marinowic, Daniel Rodrigo

Avaliação da indiferenciação celular e indução de neurodiferenciação em co-cultivo de fibroblastos NIH 3T3 com células mononucleares do sangue de cordão umbilical / Daniel Rodrigo Marinowic. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

99 f.: gráf. il. tab. Inclui um artigo científico submetido para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Neurociências.

1. CORDÃO UMBILICAL. 2. SANGUE FETAL. 3. CÉLULAS-TRONCO. 4. TERAPIA TECIDUAL. 5. REPROGRAMAÇÃO NUCLEAR. 6. DIFERENCIAÇÃO CELULAR. 7. FIBROBLASTOS. 8. ADIPOGENIA. 9. OSTEOGENESE. 10. HUMANO. 11. CÉLULAS NIH 3T3. 12. CAMUNDONGOS. 13. ESTUDOS PROSPECTIVOS. 14. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Título.

C.D.D. 574.87
C.D.U. 618.38-018.5:57.086.83(043.3)
N.L.M. W 20.5

Dedico essa dissertação a todos que acompanharam minha formação. Em especial ao meu pai Waldemar pelo exemplo de empenho e trabalho, minha mãe Liria, pelo seu amor, carinho e educação, ao meu porto seguro e irmão Marcio, por ser o meu ídolo de personalidade, minha cunhada Graciela, pelo companheirismo e simplicidade, minha noiva e futura esposa Bárbara, por sua cumplicidade em todos os momentos de nossas vidas. A uma pessoa que ainda está por vir, meu amado sobrinho e afilhado Vicente, seja bem vindo!!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Jaderson pelos seus exemplos e brilhantes ensinamentos que sempre serviram de incentivo e determinação em toda minha trajetória na instituição, desde minha iniciação científica, até o presente momento. Obrigado por me ensinar a sempre buscar responder perguntas e despertar em mim a insaciedade da ciência

Aos meus queridos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Bruna, Juliano, Miguel, Michelle, Vanessa Esteves, Vanessa Fey, Ricardo Zalewski, Liana Antunes. Obrigado por toda força e ajuda dedicada ao Laboratório, vocês são muito especiais e extremamente importantes para mim e para o perfeito andamento do Laboratório 16. Como diz a Bruna, vocês são top da balada!!

A minha querida amiga, professora e co-orientadora Dra. Denise. Não tenho palavras para agradecer toda força e companheirismo. Uma pessoa muito rara que não mede esforços para ajudar aos outros e comigo não foi diferente. Obrigado pelos ensinamentos, pelas trocas de experiências e pela confiança.

A minha colega de trabalho e grande amiga Simone Salamoni por toda ajuda e cooperação, obrigado pelo apoio no início da minha trajetória, você foi essencial para minha permanência no Laboratório de Neurociências.

Ao meu amigo e colega Ricardo Breda por toda ajuda, obrigado por estar sempre disposto a me auxiliar.

A minha grande amiga Mari, um verdadeiro cometa que nosso instituto teve a felicidade de contemplar. Obrigado pela sua presença, pela simpatia e por sempre estar refletindo o bem!

Ao Dr. Paulo Pitrez pelos seus exemplos, por depositar em mim sua confiança e me auxiliar sempre, oportunizando minha formação.

Ao Dr. Alexandre Ayoub, diretor do Centro de Criogenia Brasil, pelo apoio fundamental em forma de bolsa, pela qual esse trabalho pode ser realizado.

A toda equipe do Centro Obstétrico do Hospital São Lucas da PUC, em especial a Enf. Lisiane pela paciência e por todas as coletas que voluntariamente realizaram. Vocês forneceram nossa matéria prima!

*“Temos o destino que merecemos,
nosso destino está de acordo com os nossos méritos”*

Albert Einstein

RESUMO

As terapias celulares representam uma nova fronteira para o tratamento de diversas doenças, inclusive patologias relacionadas ao sistema nervoso central. O sangue de cordão umbilical humano é uma atrativa fonte de células-tronco, porém, apresenta uma população heterogênea com pouca quantidade de células-tronco mesenquimais. Atualmente, a reprogramação celular induzida através de metodologias distintas, pode conferir pluripotência às células adultas diferenciadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de reprogramação de fibroblastos e a diferenciação neural após co-cultivo com fração mononuclear de sangue de cordão umbilical.

Foram obtidas células da fração mononuclear de quatro cordões umbilicais humanos de pacientes atendidas no Centro Obstétrico do Hospital São Lucas da PUCRS. As suspensões celulares foram fracionadas em gradiente de densidade 1077. A fração mononuclear de cada amostra foi cultivada por sete dias e após, contaminada com 10^5 células da linhagem de fibroblasto de camundongos NIH 3T3 e co-cultivadas por 6 dias. Para avaliação da pluripotência, foi realizada extração de RNA e posterior amplificação utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes de pluripotência Oct3/4, Sox2 e KLF4. O fenótipo mesenquimal foi confirmado pela diferenciação adipogênica e osteogênica. A neurodiferenciação das células reprogramadas seguiu o método descrito por Song *et. al* (2008) e foi avaliada por imunofluorescência. O crescimento populacional foi quantificado em hemocitômetro.

Todas as células co-cultivadas mostraram capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica. Após o co-cultivo, as células passaram a transcrever o gene de pluripotência KLF4. Diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros área, diâmetro, densidade óptica e dimensão fractal foram observadas por microscopia confocal nas células reprogramadas e neurodiferenciadas. A população de células reprogramadas duplicou a cada três dias até o momento da adição do último meio de neurodiferenciação, quando as culturas tornaram-se quiescentes até o final do período de neurodiferenciação.

O contato em forma de co-cultivo dos fibroblastos com a fração mononuclear de cordão umbilical por seis dias promoveu a reprogramação dessas células a um estágio com certa plasticidade, permitindo a indução posterior de neurodiferenciação.

ABSTRACT

Cellular therapy represent a new frontier for the treatment of several diseases, including diseases related to central nervous system. Human umbilical cord blood is an attractive source of stem cells; however, it has a heterogeneous population with a small amount of mesenchymal stem cells. Currently, cell reprogramming induced by different methodologies can confer pluripotency to differentiated adult cells.

The objective of the study was to evaluate the reprogramming potential of fibroblasts and neural differentiation after co-culture with umbilical cord blood mononuclear cells.

This study was approved by the Ethics Committee of PUCRS (CEP 11/05504). Cells were obtained from four human umbilical cord blood. Cell suspensions were fractionated at gradient of density 1077. The mononuclear cells of each sample were cultured for 7 days and later, the culture was infected with 10^5 cells of mouse fibroblast cell line NIH 3T3 and co-cultured for 6 days. To evaluate the pluripotency it was performed RNA extraction and later, amplification using primers specific for pluripotency genes. The differentiation was also confirmed by the adipogenic and osteogenic differentiation. Neural differentiation of the reprogrammed cells was obtained by the method described by Song et. al (2008) and evaluated by immunofluorescence. Population growth was quantified by hemocytometer.

All co-cultured cells showed adipogenic and osteogenic differentiation capacity. After co-cultivation cells began transcribing the pluripotency gene KLF4. Statistically significant differences in the parameters area, diameter, optical density and fractal dimension were observed by confocal microscopy in reprogrammed and neural differentiated cells. The population of reprogrammed cells doubled every three days until the addition of the last medium of neural differentiation, when cultures became quiescent until the end of the neural differentiation.

The contact in form of co-cultivation of fibroblasts with umbilical cord blood mononuclear fraction for six days promoted the reprogramming of these cells to a indifferentiation stage, allowing the induction of neural differentiation later.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fatores parácrinos das células-tronco mesenquimais.....	24
Figura 2 – Fotografia da punção de um cordão umbilical para obtenção do sangue.....	31
Figura 3 – Fotografia das diferentes fases obtidas após a centrifugação do sangue de cordão umbilical em gradiente de histopaque.....	31
Figura 4 – Fotografia mostrando o preparo do cultivo da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical.....	31
Figura 5 – Fotografia dos produtos da PCR para os genes IL-2 e β -actina após eletroforese em gel de agarose 2%.....	37
Figura 6 – Captura de imagem da diferenciação mesodérmica.....	38
Figura 7 – Fotografia dos produtos da PCR para o gene KLF-4 após eletroforese em gel de agarose 2%.....	39
Figura 8 – Captura de imagem do grupo 3T3 por microscopia confocal.....	40
Figura 9 – Captura de imagem do grupo 3T3D por microscopia confocal.....	41
Figura 10 – Captura de imagem do grupo CC(ND) por microscopia confocal.....	41
Figura 11 – Captura de imagem do grupo PCT1 por microscopia confocal.....	42
Figura 12 – Captura de imagem do grupo PCT2 por microscopia confocal.....	43
Figura 13 – Captura de imagem do grupo PCT3 por microscopia confocal.....	44
Figura 14 – Captura de imagem do grupo PCT4 por microscopia confocal.....	44
Figura 15 – Histogramas representando os valores de área, diâmetro, densidade óptica e dimensão fractal das células co-cultivadas e neurodiferenciadas.....	46
Figura 16 – Histograma representando o crescimento populacional do protocolo de neurodiferenciação.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-NeuN – Anti-núcleo neuronal (do inglês: *anti-neuronal nuclei*)

Anti-NFH – Anti-neurofilamento H

BDNF – Fator neurotrófico derivado de cérebro (do inglês: *Brain Derived Neurotropic Factor*)

bFGF – Fator básico de crescimento de fibroblastos (do inglês: *Basic Fibroblast Growth Factor*)

CTA – Células-tronco adultas

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

ESC – Células-tronco embrionárias (do inglês: *Embryonic Stem Cell*)

FITC – Isotiocinato de fluoresceína (do inglês: *fluorescein isothiocyanate*)

GCSF – Fator estimulador de colônia de granulócitos (do inglês: *Granulocyte Colony Stimulating Factor*)

GMCSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (do inglês: *Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor*)

HGF – Fator de crescimento de hepatócitos (do inglês: *Hepatocyte Growth Factor*)

hMSC – Células-tronco mesenquimais humanas (do inglês: *Human mesenchymal Stem Cell*)

IDO – Idoleamina 2-3 desoxigenase

IFN- γ – Interferon- γ

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

iPS – Células-tronco pluripotente induzidas (do inglês: *Induced Pluripotent Stem Cells*)

ISCT – Sociedade Intenacional de Terapia Celular (do inglês: *International Society for Cellular Therapy*)

LIF – Fator inibidor de leucemia (do inglês: *Leukemia Inhibitory Factor*)

MCP1 – Proteína quimiotática de monócitos 1 (do inglês: *Monocyte Chemotactic Protein 1*)

MCSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos (do inglês: *Macrophage Colony Stimulating Factor*)

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês *major histocompatibility complex*)

MSC – Célula-tronco mesenquimal (do inglês: *Mesenchymal Stem Cell*)

NIH – *National Institutes of Health*

NK – Células *Natural Killer*

NO – Óxido nítrico

PLGF – Fator de crescimento placentário (do inglês: *Placental Growth Factor*)

SCF – Fator de células-tronco (do inglês: *Stem Cell Factor*)

SDF1 – Fator derivado de estroma 1 (do inglês: *Stromal-Derived Factor 1*)

T_H – Linfócito T Helper

TLR – Receptor semelhante ao Toll (do inglês: *Toll Like Receptor*)

TNF-R1 – Receptor de necrose tumoral 1 (do inglês: *Tumor Necrosis Factor – Receptor 1*)

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α (*tumor necrosis factor*)

T_{reg} – Linfócito T regulatório

UFC – Unidades formadoras de colônias

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: *Vascular Endothelial Growth Factor*)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1.	CÉLULAS-TRONCO	14
1.1.1.	Conceito Geral	14
1.1.2.	Terapias com Células-tronco	14
1.1.3.	Células-tronco embrionárias	15
1.1.4.	Células-tronco adultas	16
1.1.5.	Células-tronco da medula óssea	17
1.1.6.	Células-tronco de cordão umbilical	17
1.1.7.	Células-tronco mesenquimais	18
1.2.	FIBROBLASTOS.....	26
1.3.	REPROGRAMAÇÃO CELULAR	27
1.3.1.	Transferência Nuclear	27
1.3.2.	Fusão Celular	27
1.3.3.	Cultivo com extrato embrionário	28
1.3.4.	Células-tronco Pluripotente Induzidas (iPS)	28
	OBJETIVOS	29
2.1.	OBJETIVO GERAL	29
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3.	METODOLOGIA.....	30
3.1.	ASPECTOS ÉTICOS	30
3.2.	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS E SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR	30
3.3.	CULTURA DA FRAÇÃO MONONUCLEAR.....	30
3.4.	CO-CULTURA COM FIBROBLASTOS	32
3.5.	DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA	32
3.6.	PROTOCOLO DE NEURODIFERENCIAÇÃO.....	32
3.7.	MARCAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA	33
3.8.	AVALIAÇÃO DO DOMÍNIO CELULAR APÓS O CO-CULTIVO	33
3.9.	EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR	34
3.10.	IMUNOCITOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA PARA MARCAÇÃO NEURAL	35
3.11.	AVALIAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	36
3.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4.	RESULTADOS	37

4.1.	DOMÍNIO DO CO-CULTIVO PELOS FIBROBLASTOS	37
4.2.	DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA	37
4.3.	PLURIPOTÊNCIA DAS CÉLULAS CO-CULTIVADAS	38
4.4.	IMUNOCITOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA.....	39
4.5.	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	47
5.	DISCUSSÃO	48
6.	CONCLUSÃO.....	55
7.	PERSPECTIVAS	56
8.	BIBLIOGRAFIA.....	57
9.	ANEXOS	63
9.1.	CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....	63
9.2.	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	64
9.3.	ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA A REVISTA CELL RESEARCH	
	65	

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÉLULAS-TRONCO

1.1.1. Conceito Geral

As células-tronco são classificadas como células imaturas que possuem a habilidade de auto-renovação por um longo período e de se diferenciar, sob condições apropriadas, em células especializadas de diferentes tecidos. De uma maneira geral, as células-tronco podem ser classificadas como células-tronco embrionárias e células-tronco adultas (1).

1.1.2. Terapias com Células-tronco

Em modelos animais, diferentes estratégias de aplicação de células-tronco têm mostrado grande eficácia no tratamento de vários tipos de danos ao sistema nervoso central. As células-tronco mesenquimais podem ser utilizadas no transplante autólogo para o reparo de diversas lesões, contornando as complicações como rejeição e resposta imunológica, que podem ser associadas às terapias alogênicas. Estas células podem ser consideradas multipotentes não hematopoiéticas e, possuem grande capacidade de diferenciação. De fato, além de tecido ósseo, cartilaginoso, adipócitos e miócitos, tem sido demonstrado nas células-tronco mesenquimais a capacidade de se diferenciar em neurônios e astrócitos, *in vitro* e *in vivo*. (2).

Um estudo realizado por Jiang *et al.* (3) mostrou que as células-tronco da medula óssea de camundongos e ratos podem-se diferenciar em células com características do neuroectoderma. Um estudo realizado por Streckfuss-Bömeke *et al.* (2009) utilizando células progenitoras germinativas adultas, mostrou com sucesso a diferenciação dessas células em linhagens neurais, apresentando marcações específicas de células progenitoras neurais, neurônios imaturos, astrócitos,

oligodentrócitos e neurônios maduros funcionais, confirmando essa funcionalidade através da medida da eletroatividade das células neurodiferenciadas (4). Chan *et al.* (2008) utilizando células multipotentes derivadas de cordão umbilical, aplicando protocolo de diferenciação para células neurais, apresentaram evidências morfológicas e expressão de proteínas neuronais e de células gliais após 30 dias em cultura sob indução a neurodiferenciação. A porcentagem de células com características neurais positivas foi de aproximadamente 30% (5).

Um estudo realizado por Koh *et al.* (2008) utilizando células-tronco neuronais diferenciadas a partir de sangue de cordão umbilical em modelo de hipóxia/isquemia em ratos, mostrou uma redução da área de infarto e redução do déficit neurológico (6). As linhagens neurais derivadas de células-tronco podem ser utilizadas na terapia celular para o tratamento de diversos danos ao sistema nervoso central (5). O transplante de células expressando marcadores neurais pode ser uma estratégia eficaz para reparação e recuperação funcional em modelos animais de doenças neurodegenerativas (4).

1.1.3. Células-tronco embrionárias

As células tronco embrionárias (*Embryonic Stem Cells* – ESC) são células derivadas da massa celular interna dos blastocistos, caracterizadas pela auto-renovação, imortalidade e pluripotência, sendo capazes de se diferenciar em células das três camadas germinativas, mesoderma, ectoderma e endoderma (7). Muitos estudos têm mostrado que as células-tronco embrionárias podem derivar células progenitoras neurais, neurônios maduros, células gliais, podendo ser utilizadas como fonte na terapia celular de doenças neurodegenerativas (8-10). Apesar do potencial das células-tronco embrionárias e de sua ampla aplicação terapêutica, as questões éticas e imunológicas estão relacionadas diretamente com o seu uso, limitando assim a sua aplicação nas terapias celulares (11).

Devido ao potencial que as células-tronco embrionárias apresentam, correlacionando com suas barreiras éticas e religiosas, atualmente buscam-se identificar, ou gerar populações alternativas de células-tronco com potencial de diferenciação semelhante às ESC. As populações até hoje produzidas são caracterizadas por um padrão específico de expressão de genes e proteínas de pluripotência (4).

1.1.4. Células-tronco adultas

As células-tronco adultas (CTA) constituem uma alternativa de células para abordagem terapêutica, possuindo capacidade de se diferenciar em diferentes tecidos. Elas podem ser encontradas e isoladas de diversas fontes como pele, músculo, ossos, tecido adiposo, entre outros. As células-tronco adultas enfrentam poucas barreiras éticas; sua coleta é relativamente simples e sem riscos. As células-tronco, depois de separadas, podem ser mantidas e expandidas quando colocadas em meio e condições de cultivo adequados (12), podendo passar a expressar até mesmo marcadores de células neurais (13).

Dois tecidos amplamente utilizados para a coleta de células-tronco adultas são a medula óssea e o sangue de cordão umbilical. As células-tronco do sangue de cordão umbilical e da medula óssea encontram-se na fração mononuclear e a separação dessa fração mononuclear permite obter um conjunto de células indiferenciadas que expressam marcadores de pluripotência como *Oct3/4*, *Sox2* e *NANOG* (11).

1.1.5. Células-tronco da medula óssea

A medula óssea é composta por uma mistura heterogênea de diferentes populações celulares hematopoiéticas e estromais, incluindo células reticulares. Desde a introdução da cultura celular em meio semi-sólido, tornou-se possível o cultivo de células precursoras de granulócitos e macrófagos. Outras técnicas de cultivo foram desenvolvidas para estudos morfológicos de células murinas e humanas (14).

1.1.6. Células-tronco de cordão umbilical

O sangue de cordão umbilical humano é uma atrativa fonte de células-tronco adultas para transplantes, apresentando fácil coleta e um alto índice de tempo de sobrevivência devido à possibilidade de criopreservação. Por outro lado, o sangue de cordão umbilical possui, além de células-tronco e células progenitoras, populações celulares sanguíneas maduras e em processo de maturação, resultando em uma população heterogênea, que quando colocada em cultura, apresenta uma característica de multicelularidade (15, 16).

Na fração mononuclear do sangue de cordão umbilical, as células tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells* – MSC's) são extremamente raras, apresentando proporções de uma para cada 10^8 células mononucleares (15, 17, 18). Células-tronco multipotentes derivadas de cordão umbilical possuem propriedades similares às células-tronco multipotentes derivadas da medula óssea. Foi demonstrado tanto *in vivo* quanto *in vitro* que essas células multipotentes possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos como neurônios e glias (17).

1.1.7. Células-tronco mesenquimais

A aplicação de células-tronco na medicina regenerativa representa uma nova fronteira para o tratamento de diversas doenças, inclusive patologias relacionadas ao sistema nervoso central. As células-tronco mesenquimais humanas (*Human Mesenchymal Stem Cell* – hMSC) adultas podem ser isoladas da medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, músculo, pele e outras fontes, possuindo várias propriedades para o tratamento de diversas doenças (19).

O conceito de célula-tronco mesenquimal surgiu a partir de experimentos realizados por Friedenstein *et al.* há mais de quatro décadas (20). Eles observaram uma adesão à superfície plástica de uma população celular da fração das células mononucleares da medula óssea quando colocadas em cultura e mantidas sob condições adequadas. Essa fração rara de células aderentes formou as chamadas unidades formadoras de colônias (UFC), sendo isoladas das demais células que compõem a fração mononuclear da medula óssea. A expansão da cultura, a partir de clones das UFC da fração mononuclear da medula óssea, permitiu estudos em câmaras de difusão, onde foi possível observar a formação de elementos de osso, cartilagem e de estroma ósseo (14).

As hMSC têm gerado grande expectativa em relação às estratégias terapêuticas devido a sua capacidade intrínseca de auto-renovação e diferenciação em diversos tecidos. Elas são consideradas células-tronco potencialmente funcionais por já demonstrarem eficácia no tratamento de diversas doenças, como osteogênese imperfeita, recuperação hematopoiética e regeneração de tecido ósseo (21). Apesar das múltiplas informações a respeito das hMSC, seu uso terapêutico, seus mecanismos de auto-renovação, diferenciação e influência parácrina não são bem compreendidos e são alvos de investigação ativa.

A comprovação de existência e funcionalidade das células mesenquimais pode ser observada durante o desenvolvimento embrionário e em todo crescimento tecidual pós-natal, reparo e regeneração ao longo da vida, além do seu papel na manutenção do nicho apropriado que é essencial para a hematopoiese em adultos normais (21-23). Uma das características hMSC é serem imunologicamente privilegiadas em relação às outras células e tecidos do organismo, pois não expressam o complexo de histocompatibilidade principal de classe II (*Major Histocompatibility Complex* – MHC-II), a não ser que fatores específicos estejam presentes no cultivo (24, 25).

Ao longo de uma vida, ocorre um dramático decréscimo das MSC. Foi observada por décadas a substituição das MSC's de medula óssea por outras células nucleares. Em seres humanos, após o nascimento até a adolescência, ocorre um decréscimo de aproximadamente 10 vezes o número de células tronco mesenquimais da medula óssea. Da adolescência até a senectude, ocorre um novo decréscimo de aproximadamente 10 vezes o número das MSC's da medula óssea (24).

Dependendo do estímulo e das condições de cultivo aplicadas, as MSC podem se diferenciar em células sanguíneas, cartilagem, músculo, gordura e outros tecidos conectivos. Essas observações inicialmente sugeriram que as células-tronco mesenquimais eram responsáveis por toda renovação e suporte dos tecidos mesenquimais adultos; porém, no final do ano 2000 foi levantada a possibilidade de que todas as células mesenquimais seriam derivadas de pericitos e estariam presentes em todos os tecidos vascularizados, uma vez que a densidade vascular decresce de uma a duas ordens de magnitude ao longo da vida de um indivíduo (26). O mecanismo de ação e migração celular seria através da liberação do pericito de sua interação com o endotélio vascular local. A origem e o número de células mobilizadas de diferentes locais são temas que cursam na atualidade científica (26-28).

1.1.7.1. Mecanismos parácrinos

Atualmente, atribui-se às hMSC fatores parácrinos com potencial de promover melhora no estado geral de um determinado dano ou a recuperação tecidual em lesões de diversas ordens (Figura1). Esses efeitos parácrinos são descritos como: efeito imunomodulador, efeito anti-apoptótico, efeito pró-angiogênico, efeito quimioatratante, efeito anti-fibrose e o suporte para o crescimento e diferenciação de células progenitoras endógenas (29, 30).

1.1.7.1.1. Efeito Imunomodulador

Os efeitos das hMSCs na proliferação de células T possuem dois componentes distintos: um componente dependente de contato e um componente independente de contato. Essa conclusão resulta de estudos sobre os nutrientes e condições de cultura, à ativação das hMSCs em combinação com citocinas como interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor* - TNF- α) e IFN- γ , assim como a co-cultura da fração mononuclear de sangue periférico e hMSC, em todos os casos reduzindo a proliferação de células T (27, 28). Estudos mostraram os efeitos das hMSCs sobre a proliferação das células T sensibilizadas com fitohemaglutinina, obtidas da fração mononuclear de sangue periférico, através da análise com anticorpos para as moléculas CD3 e CD28 (31-33). O mecanismo anti-inflamatório das hMSCs ocorre por meio de uma série de eventos após um dano ou decorrentes de apoptose, ativando os receptores semelhantes ao Toll (*Toll Like Receptor* - TLR) 1, 2 e 4 nas hMSC's. Essa ativação reduz a expressão do gene *Notch1* que interfere na produção de óxido nítrico (*Nitric Oxide* - NO), de idoleamina 2-3 desoxigenase (IDO) e a ativação de receptores TLR1,2 e 4 pelas hMSC diminuindo a proliferação das células T por meio da ativação do fator de transcrição do gene *FoxP3* em células T reguladoras (T_{reg}), levando à redução da proliferação das células T e aumento nos

níveis de interleucina-10 (IL-10), uma citocina que reduz a maturação e ativação das células dendríticas e reduz os níveis de TNF-R1 e IFN- γ . A produção de IDO pelas hMSC, causa a degradação do triptofano e com isso a ativação do fator de transcrição do gene *ROR γ T* em linfócitos T_H17 e ativação do fator de transcrição do gene *Tbet* em linfócitos T_H1, diminuindo assim os níveis de IFN- γ . A ativação dos receptores TLR1, 2 e 4 também diminuem a proliferação de células natural killer (NK), sua citotoxicidade e a produção de IFN- γ , reduzindo também a diferenciação de macrófagos (24).

1.1.7.1.2. Efeito anti-formação de fibrose

Os efeitos das MSC na anti-formação de fibrose estão bem elucidados em diferentes modelos experimentais; porém, os mecanismos moleculares envolvidos ainda não são totalmente compreendidos. A aplicação de MSC após uma lesão é eficaz na redução de fibrose se ocorrer antes da formação de fibrose maciça (34). O fator básico de crescimento de fibroblastos (*Basic Fibroblast Growth Factor* – bFGF) e o fator de crescimento de hepatócitos (*Hepatocyte Growth Factor* – HGF) são atualmente conhecidos como os fatores envolvidos na prevenção da fibrose em um modelo de isquemia e reperfusão de tecido adiposo. O bloqueio de bFGF no tecido adiposo ferido gera uma diminuição da produção de células CD34+ e CD31- (estroma perivascular) e uma redução da fibrogênese após uma lesão grave. O bloqueio do HGF no tecido lesado, não impede a proliferação das células CD34+ e CD31-, resultando em uma formação fibrótica evidente. Em situações de lesão tecidual, as células tornam-se perivascularres proliferativas e secretam HGF, que atua como mediador anti-fibrose. A administração da MSC pode ser vista como uma forma de aumentar a produção local de HGF e provavelmente de outros fatores, evitando assim a formação de fibrose (30, 35, 36).

1.1.7.1.3. Efeito de estímulo a células precursoras endógenas

As MSC promovem a hematopoiese *in vitro* por meio da secreção de alguns fatores solúveis específicos que são fator de células-tronco (*Stem Cell Factor* – SCF), fator inibidor de leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor* – LIF), interleucina-6 (IL-6) e fator estimulador de colônia de macrófagos (*Macrophage Colony Stimulating Factor* – MCSF). A hematopoiese pode ainda ser intensificada pelo aumento da produção de IL1- α , fator estimulador de colônia de granulócitos (*Granulocyte Colony Stimulating Factor* – GCSF) e fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (*Granulocyte Colony Stimulating Factor* – GMCSF) (37, 38). *In vivo*, as MSC's possuem o papel de sustentar as células hematopoiéticas através da secreção de fator derivado de estroma 1 (*Stromal-Derived Factor 1* – SDF1), o que sugere que o suporte hematopoiético, observado *in vitro*, mimetiza alguns aspectos observados em condições fisiológicas *in vivo* (39). Em um estudo utilizando modelo de lesão isquêmica no cérebro de camundongos, as células do parênquima dos vasos sanguíneos passaram a expressar SDF1 e angiopoetina 1, recrutando e precursoras neurais e promovendo neurogênese. A expressão desses fatores é uma característica das células do pericito, indicando que essas células podem ser responsáveis pelo recrutamento e suporte de células precursoras (40).

1.1.7.1.4. Efeito pró-angiogênico e anti-apoptótico

O efeito pró-angiogênico atribuído às MSC exerce um grande efeito na manutenção do local da lesão, uma vez que o restabelecimento do fornecimento sanguíneo é fundamental para a recuperação de um tecido lesado (30). O efeito pró-angiogênico das MSC foi demonstrado em um modelo de isquemia de membro em camundongos. Nesse estudo, os autores detectaram os fatores bFGF, fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF), fator de crescimento placentário (*Placental Growth Factor* – PIGF) e proteína quimiotática de

monócitos (*Monocyte Chemotactic Protein - MCP*) uma hora após a aplicação local das células. Outros estudos demonstraram que as MSC em cultivo produzem altas concentrações de fatores pró-angiogênicos e anti-apoptóticos, que são capazes de inibir a morte de células endoteliais cultivadas sob condições de hipóxia e ativam a formação de vasos, fornecendo os componentes da matriz extra-celular que atuam como substrato para células endoteliais (41-43).

1.1.7.1.5. Efeito de quimioatração

Culturas de MSC secretam diversas moléculas com potencial de quimioatração, são elas: CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP 3), CCL20 (MIP-3a), CCL26 (eotaxina-3), CX3CL1 (fractalquine), CXCL5 (ENA-78), CXCL11 (i-TAC), CXCL1 (GROa), CXCL12 (SDF-1), CXCL8 (IL-8), CXCL2 (GROb) and CXCL10 (IP-10). As moléculas atuam sobre os eosinófilos, neutrófilos, monócitos, basófilos, células T, células B, células dendríticas, células progenitoras hematopoiéticas e progenitoras endoteliais (30). O padrão de expressão dessas moléculas quimioatratoras pode ser modificado pela exposição a outros tipos celulares, especialmente células do sistema imune (44).

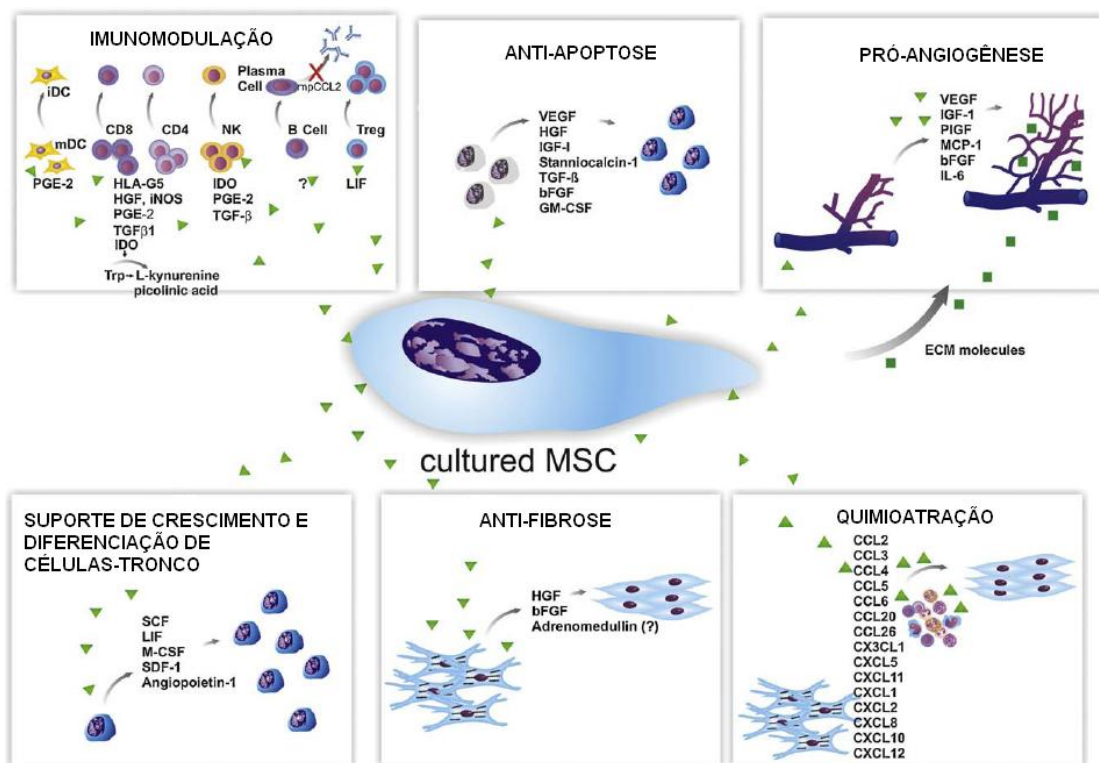


Figura 1 – Fatores parácrinos das células-tronco mesenquimais. com potencial de promover melhora no estado geral de uma determinada injúria ou a recuperação tecidual em lesões de diversas ordens associados às células-tronco mesenquimais. Modificado de Meirelles *et. al* (30)

1.1.6.2. Caracterização das células-tronco mesenquimais

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy* - ISCT) propôs em 2006 alguns critérios básicos para definição das hMSC com base em investigações científicas e estudos pré-clínicos. Os critérios que definem as hMSC são: a) aderência em plástico, quando mantidas em condições de cultura; b) expressão dos antígenos específicos de superfície, em que pelo menos 95% da população de hCTM devem expressar os antígenos CD105, CD73 e CD90 e, no máximo, 2% expressando os antígenos de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA classe II; c) potencial multipotente de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, utilizando meios indutores de diferenciação. Considerando o grande número de pesquisas envolvendo células-tronco mesenquimais nas últimas duas décadas, o grande interesse clínico ao uso dessas células e a necessidade de estabelecer um padrão de definição de células da linhagem mesenquimal, tornou-se necessário o estabelecimento desses critérios (45).

1.2. FIBROBLASTOS

Os fibroblastos são encontrados no estroma de diferentes tecidos; eles desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade e homeostase do tecido conjuntivo, sendo as principais células envolvidas no processo de reparo tecidual (46). Fibroblastos NIH 3T3 são derivados de células embrionárias de camundongos e foram descritos pela primeira vez em 1963 por Tonaro e Green. Em seu estudo, foram avaliadas quantitativamente o crescimento de células embrionárias de camundongos em cultura para o estabelecimento de linhagens padrão a partir de diferentes densidades de inoculação iniciais e diferentes períodos de transferência.

As células-tronco mesenquimais e fibroblastos maduros compartilham diversas características morfológicas e funcionais, até mesmo características peculiares de classificação estabelecidas pela ISCT, como a adesão ao plástico, expressão de moléculas CD73 e CD75 e ausência de expressão das moléculas CD14, CD34 e CD45, além da diferenciação induzida para linhagem osteogênica e adipogênica (47, 48). Diversas similaridades entre os fibroblastos e as células-tronco mesenquimais já foram descritas, como a localização dessas células em todos os órgãos do corpo, sendo de origem endotelial, epitelial e hematopoiético, com capacidade de sintetizar e remodelar a matriz extra celular (49, 50). Características de células indiferenciadas já foram atribuídas aos fibroblastos maduros, como por exemplo, em resposta a ferimentos, mecanismos de estresse tecidual e inflamação. Alguns fibroblastos atuam no local de ferimentos através de migração, proliferando para restabelecer a homeostasia dos tecidos reduzindo a inflamação local (50, 51). Porém, o reparo associado aos fibroblastos em um eventual insulto continuado, pode causar inflamação crônica e a formação de fibrose (52), diferente do que é associado ao tratamento de lesões utilizando células-tronco mesenquimais (29).

1.3. REPROGRAMAÇÃO CELULAR

A reprogramação de células somáticas adultas é uma abordagem atraente e promissora para a medicina regenerativa, possibilitando também o estudo *in vitro* de doenças genéticas complexas que ainda não são bem compreendidas. O objetivo da reprogramação é gerar células-tronco pluripotentes isogênicas derivadas de células adultas somáticas, de modo que não ocorra rejeição do enxerto após o transplante para o hospedeiro. As células somáticas podem ser reprogramadas através da transferência nuclear, em ovócitos anucleados, pela fusão celular entre células somáticas e células embrionárias, indicando que ovócitos anucleados e células embrionárias podem conferir totipotência ou pluripotência às células somáticas (53) ou então transfecção gênica (53).

1.3.1. Transferência Nuclear

A transferência nuclear entre células somáticas foi um dos primeiros métodos para reprogramar as células terminalmente diferenciadas. Este método consiste em transferir núcleos de células doadoras para o interior de oócitos anucleados, resultando na produção de células com características geneticamente idênticas ao doador do núcleo, denominados de clones terapêuticos (54).

1.3.2. Fusão Celular

A reprogramação através da fusão celular ocorre entre células somáticas e células tronco embrionárias, as quais são capazes de produzirem células reprogramadas após hibridização celular, denominadas hibridomas (55).

1.3.3. Cultivo com extrato embrionário

Já foi demonstrado que fibroblastos da linhagem NIH-3T3, após a exposição a extratos de células embrionárias de camundongos, foram capazes de se reprogramar, retornando a um estágio de pluripotência, o qual foi comprovado pela expressão do gene Oct3/4. Além disso, após a indução ou por estímulos, estas células foram capazes de se diferenciarem em diferentes tipos celulares, como células endoteliais, neuronais, adipócitos e cardiomiócitos. Quando transplantadas em modelos animais de isquemia ou infarto agudo do miocárdio induzidos cirurgicamente, funções fisiológicas e anatômicas no sítio da lesão melhoraram significativamente, demonstrando uma capacidade de reparação tecidual (56).

1.3.4. Células-tronco Pluripotente Induzidas (iPS)

As células somáticas podem ser reprogramadas pela adição de genes, os quais ativam seletivamente fatores de transcrição, em células somáticas. Em 2006, os pesquisadores japoneses Takahashi e Yamanaka, apresentaram esta técnica de produção de células pluripotentes através da reprogramação de fibroblastos de camundongos e, em 2007, em células humanas. Estas células foram reprogramadas pela adição de quatro genes: Oct3/4, SOX-2, KLF-4 e c-Myc, por meio de vetores virais, e esta reprogramação pode ocorrer em diferentes tipos celulares. As células produzidas por esse método são chamadas de células-tronco de pluripotência induzidas (*Induced Pluripotent Stem Cells* - iPS) e são muito similares às células-tronco embrionárias, apresentando as mesmas características de auto-renovação e potencial de diferenciação (53, 57)

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de reprogramação de fibroblastos e a diferenciação neural após co-cultivo com células da fração mononuclear de sangue de cordão umbilical humano.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a possível transcrição de genes de pluripotência nas células diferenciadas em contato direto com células indiferenciadas;
- Avaliar o nível de indiferenciação de fibroblastos após co-cultivo com células da fração mononuclear de cordão umbilical utilizando de indicadores mesodérmicos;
- Analisar o potencial de diferenciação neural de fibroblastos co-cultivados induzidos à neurodiferenciação identificando marcadores específicos por imunofluorescência.

3. METODOLOGIA

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão Científica e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CEP11/05504). As células da fração mononuclear de cordão umbilical humano foram obtidas de quatro pacientes no Hospital São Lucas da PUCRS após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS E SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR

A coleta foi realizada através de punção das artérias e veias do cordão umbilical e placenta utilizando seringas de 20 ml com 5.000 U de heparina (Figura 2). Para a separação da fração mononuclear, as células foram diluídas em meio RPMI 1640 (1:1) (Gibco). As suspensões foram fracionadas em um gradiente de densidade gerado por centrifugação sobre Histopaque na densidade de 1,077 g/mL (Sigma-Aldrich) a 400 g durante 30 minutos a 25°C. A fração mononuclear, situada sobre a interface com o Histopaque, foi coletada e lavada duas vezes com solução salina 0,9% estéril através de centrifugação a 400 g por 5 minutos (Figura 3). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com azul de tripan 0,4%.

3.3. CULTURA DA FRAÇÃO MONONUCLEAR

A fração mononuclear foi colocada em cultura em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com L-glutamina, 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de gentamicina, com densidade de 10^7 células por frasco. A cultura foi mantida em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂ por seis dias (Figura 4).



Figura 2 – Fotografia da punção de um cordão umbilical para obtenção do sangue. (Fonte: Michele Domingues)



Figura 3 – Fotografia das diferentes fases obtidas após a centrifugação sobre histopaque. A seta indica a localização das células mononucleares. (Fonte: Michele Domingues)



Figura 4 – Fotografia mostrando o preparo do cultivo da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical. (Fonte: Michele Domingues)

3.4. CO-CULTURA COM FIBROBLASTOS

No sexto dia de incubação, as culturas da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical foram contaminadas com células de fibroblasto de camundongo da linhagem NIH 3T3 (American Type Culture Collection - ATCC n° CRL-1658™ Rockville, MD) a uma densidade de cultivo de 10^5 células por garrafa de 75 cm². Após seis dias de cultivo, as células alcançaram confluência superior a 80% e foram removidas com 8 mL de Tripsina/EDTA 0,25% (GIBCO). Foi realizada estimativa da densidade celular e teste de viabilidade com câmara de Neubauer. Esta etapa foi caracterizada como fase I do experimento.

3.5. DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA

Após seis dias de co-cultivo dos fibroblastos com as células mononucleares do sangue de cordão umbilical, o sobrenadante foi retirado e os fibroblastos passaram pelos protocolos de diferenciação adipogênica e osteogênica previamente descritos por Phinney et al. 1999 (58). A diferenciação adipogênica foi induzida nas culturas durante quatro semanas, através da suplementação do meio DMEM com 10^{-8} mol/L de dexametasona e 5 µg/mL de insulina. A diferenciação osteogênica foi induzida durante quatro semanas de cultura através da suplementação do meio DMEM com 10^{-8} mol/L de dexametasona, 5 µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato e 10 mmol/L β-glicerolfosfato.

3.6. PROTOCOLO DE NEURODIFERENCIAÇÃO

O método de neurodiferenciação utilizado foi adaptado a partir daquele descrito por Song *et al.* 2008 (59). As células foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,001% de β-mercaptoetanol (Gibco), 10% de soro fetal bovino, 100 U.I./mL de penicilina, 100 U.I./mL de estreptomicina e 100 µg/mL de gentamicina.

As células foram cultivadas por um período de três dias a 37°C com 5% CO₂. O término desse período caracteriza a fase II. A seguir, as culturas foram novamente tratadas com tripsina/EDTA 0,25% e as células foram então cultivadas em meio DMEM/F12 (Gibco), 10% soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e gentamicina nas mesmas concentrações por um período de três dias, estabelecendo assim ao término desse período a fase III. As culturas foram novamente tratadas com tripsina/EDTA 0,25% e as células foram cultivadas em placas de seis poços em meio Neurobasal Medium N5 (Gibco) suplementado com 20 ng/mL de fator neurotrófico derivado de cérebro (*Brain Derived Neurotropic Factor* - BDNF) (Sigma-Aldrich), 20 ng/mL de fator de crescimento de granulócitos (*Granulocyte Colony Stimulating Factor* - GCSF) (Bergamo), soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e gentamicina. As culturas foram mantidas sob as mesmas condições por um período de sete dias, estabelecendo a fase final do experimento (fase IV).

3.7. MARCAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA

Para confirmação da diferenciação em células da linhagem de adipócitos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% a temperatura ambiente e coradas com solução de Oil Red O (Sigma-Aldrich). Para a diferenciação osteogênica, as culturas foram lavadas com DPBS e coradas por cinco minutos a temperatura ambiente com Alizarin Red S (Nuclear) observação do depósito de cálcio.

3.8. AVALIAÇÃO DO DOMÍNIO CELULAR APÓS O CO-CULTIVO

O domínio do cultivo (fibroblastos e/ou fração mononuclear de sangue de cordão umbilical) foi identificado pela técnica de PCR. Após os sete dias de co-cultivo, o DNA das amostras foi extraído com fenol/clorofórmio. O material foi macerado em microtubos contendo os 300µl do tampão PBS. Foram adicionados 600µl de Trizol

(Sigma-Aldrich) e 120µl de clorofórmio (Merk), o conteúdo foi homogeneizado utilizando vortex (Genie) e centrifugado a 14000 RPM por 10 minutos (Eppendorf 5417). O sobrenadante foi preservado e adicionado a ele 70% de seu volume de álcool isopropílico (Merk). O conteúdo foi ressuspendido e armazenado a -20°C *overnight*. O material foi novamente centrifugado a 1400 RPM por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet formado foi ressuspendido em 40 µl de água ultra pura. O DNA extraído foi amplificado em termociclador (PTC-200/MJ Research) empregando oligonucleotídeos complementares a seqüência do gene IL-2 de camundongo (D – 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3' / R – 5'GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATC-3') e β-actina humano (D – 5'-TCCCTGTACGCCTCTGGXCATA-3' / R – 5'-CCTTCTGCATCCTGTTGGTGATGCTA-3'. Como controle positivo e controle de especificidade de cada par de oligonucleotídeos utilizados na amplificação, foram ensaiados juntamente com cada reação, amostras de DNA humano extraído de sangue periférico e amostras de DNA extraídas de tecido de camundongo C57/BL6.

3.9. EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR

A extração de RNA foi realizada utilizando kit RNA SV-Total (Promega), conforme orientação do fabricante. Os RNAs foram extraídos ao final da etapa de co-cultivo das células NIH-3T3 com a fração mononuclear das células do sangue de cordão umbilical. A síntese de cDNA foi realizada utilizando kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) conforme orientação do fabricante. Para avaliação do potencial de indiferenciação das células 3T3 em co-cultivo com a fração mononuclear do sangue de cordão umbilical foram utilizados primers complementares a sequencia dos mRNAs transcritos pelos genes KFL4 (D – 5'-CCGTTGGCGTGAGGAACTCT-3" / R – 5'-ATACTGGGTCCAACCTCCGGC-3'), SOX2 (D – 5'- AGACCGAGAAGCGGCCGTTCA-3' / R – 5'- ATGCGCTGGTTCACGCCCGC)

e OCT3/4 (D – 5'- TACGAGTTCTGCGGAGGGAT / R – 5'- TCATTGTTGTCGGCTTCCTC).

3.10. IMUNOCITOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA PARA MARCAÇÃO NEURAL

O meio de cultura foi aspirado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos. As culturas foram lavadas com tampão Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) e foi adicionado 1 mL por poço de solução de bloqueio (Soro Fetal Bovino e Albumina Sérica Bovina) e incubado por uma hora a temperatura ambiente. Após, foi adicionado o anticorpo Fluoropan Neuronal Marker (Chemicon) conjugado com isotocinato fluoresceína isothicyanate (FITC) diluído em tampão de bloqueio (1:100). Esse anticorpo é composto de um conjunto de anticorpos formado por anti-núcleo neuronal (NeuN), anti-citoesqueleto neuronal (NFL), anti-microtubulo neuronal (MAP2) e anti microtubulo neuronal (β -tubulina III) para caracterização da citoarquitetura e polarização neuronal. As células foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas. A seguir, foi adicionado 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI) a 0,01% para marcação nuclear. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão DPBS. As células foram analisadas utilizando microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter. Para análise quantitativa, foram selecionados, aleatoriamente, 10 campos visuais utilizando lentes objetivas de 20X, respeitando o número mínimo de 20 células analisadas a partir da marcação de DAPI. Para avaliação qualitativa das marcações, foram realizadas capturas tridimensionais através da ferramenta Z-stack do software Zeen (Carl Zeiss).

3.11. AVALIAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para avaliação da proliferação celular em cada etapa do protocolo de neurodiferenciação, as células foram cultivadas em placas de 24 poços com densidade inicial de 2×10^4 células por poço. Ao final de cada etapa da neurodiferenciação, as células foram tripsinizadas e a densidade celular foi estimada pela técnica de contagem em câmara de Neubauer com método de exclusão por azul de tripan 0,4%.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA de uma via (software PRISM, Inc.) através do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de múltipla comparação de Dunn's, considerando resultados estatisticamente significativos se $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. DOMÍNIO DO CO-CULTIVO PELOS FIBROBLASTOS

Após os seis dias de contaminação dos fibroblastos com as células mononucleares de cordão umbilical, as culturas adquiriram confluência superior a 80%, perfazendo um domínio das células de fibroblastos sobre as mononucleares de cordão umbilical. Esse domínio da linhagem dos fibroblastos sobre os co-cultivos foi confirmado pela técnica de PCR, apresentando resultados positivos para o gene IL2 (camundongo) e negativo para o gene β -actina (humano) (Figura 5)

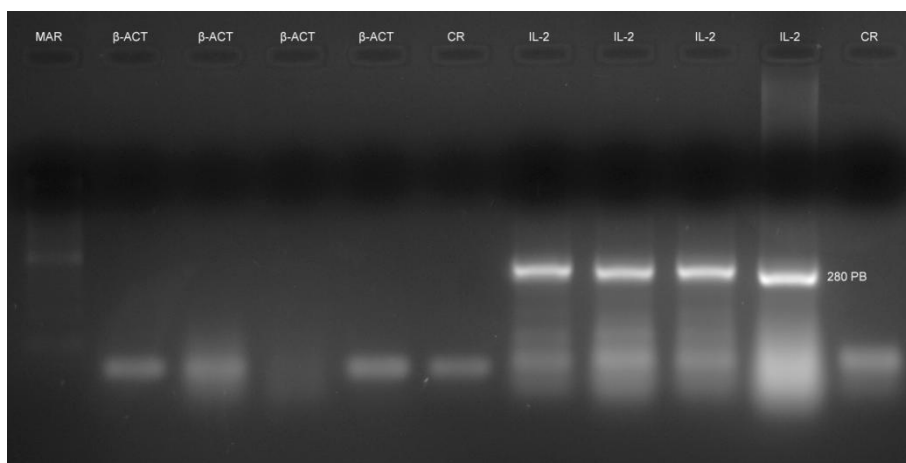


Figura 5 – Fotografia dos produtos da PCR para os genes IL-2 e β -actina após eletroforese em gel de agarose 2%. Marc: Marcador de peso molecular de 100 pb; β -act: produto da PCR com iniciadores para um segmento do gene da β -actina humana; CR: Controle da reação sem presença de DNA; IL-2: produto da PCR com iniciadores para um segmento do gene IL-2 de camundongo.

4.2. DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA

A diferenciação adipogênica e osteogênica induzida segundo Phinney *et al.* 1999 foi caracterizada positivamente através dos corantes Oil Red e Alizarin Red (Figura 6). Todas as células analisadas apresentaram positividade para a coloração com Oil Red, caracterizada pela coloração do citosol, evidenciando a diferenciação adipogênica induzida. A coloração com Alizarin também pode ser observada em todas

as células que passaram pelo protocolo de diferenciação osteogênica, caracterizando a presença de depósito de cálcio no citosol das células.

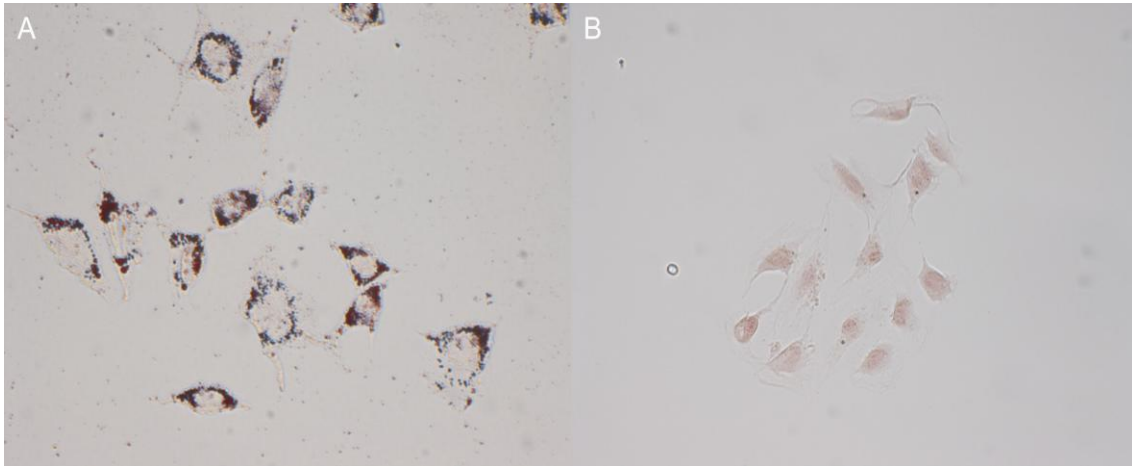


Figura 6 – Captura de imagem da diferenciação mesodérmica. A: Diferenciação adipogênica caracterizada pela marcação com Oil Red. B: Diferenciação osteogênica caracterizada pela marcação com Alizarin Red.

4.3. PLURIPOTÊNCIA DAS CÉLULAS CO-CULTIVADAS

Os fibroblastos NIH 3T3 após sete dias em co-cultivo com a fração mononuclear do sangue de cordão umbilical passaram a expressar o gene KLF4 (Figura 7). Os mRNAs dos genes Oct3/4 e Sox2 não foram detectados a partir da técnica de RT-PCR. Houve detecção dos transcritos do gene KLF4 nas amostras dos quatro grupos co-cultivados PCT(1,2,3,4)F4 antes da neurodiferenciação. O grupo 3T3 não apresentou expressão de nenhum dos primers testados exceto ao controle endógeno IL2 de camundongo.

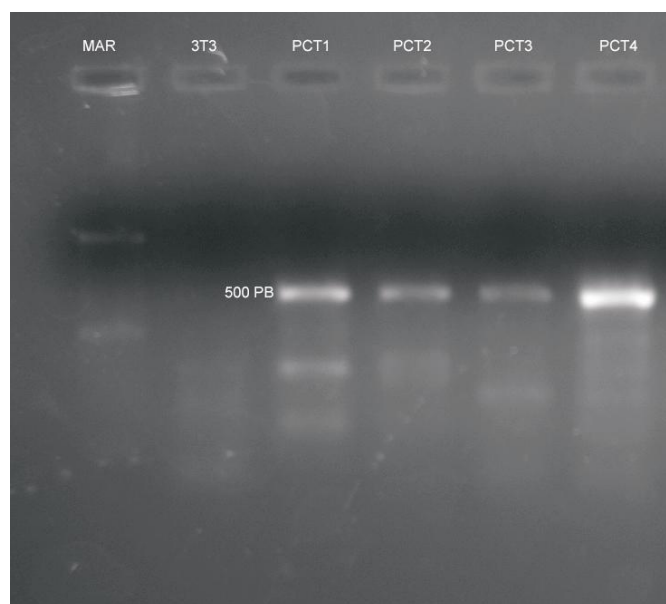


Figura 7 – Fotografia dos produtos da PCR para o gene KLF-4 após eletroforese em gel de agarose 2%. Marc: Marcador de peso molecular de 100 pb; 3T3: produto da PCR com iniciadores para um segmento do gene da KLF-4 em fibroblastos sem co-cultivo; PCT 1, 2, 3 e 4: produtos da PCR com iniciadores para um segmento do gene KLF-4 nos fibroblastos co-cultivados com a fração mononuclear do sangue de cordão umbilical de quatro pacientes.

4.4. IMUNOCITOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA

A avaliação da neurodiferenciação através foi realizada em cultivo de fibroblastos de camundongo linhagem NIH 3T3 que não passaram por co-cultivo com células mononucleares de cordão umbilical e não passaram por protocolo de neurodiferenciação (3T3), em fibroblastos de camundongo NIH 3T3 que passaram pelo co-cultivo com células mononucleares de cordão umbilical e não passaram pelo protocolo de neurodiferenciação (CC-ND), em fibroblastos de camundongos NIH 3T3 que não passaram pelo co-cultivo e foram submetidos ao protocolo de neurodiferenciação (3T3D) e em fibroblastos de camundongos NIH3T3 que foram co-cultivados separadamente com células da fração mononuclear de quatro diferentes pacientes (PCT1,2,3,4) F4.

Observou-se quase nula a marcação do anticorpo em células de fibroblastos que não passaram pelo co-cultivo (3T3) (Figura 8), em células que não passaram pelo co-cultivo e sim pelo protocolo de neurodiferenciação (3T3D) (Figura 9) e em células

que passaram pelo co-cultivo e não pelo protocolo de neurodiferenciação (CCND) (Figura 10) A marcação evidenciada nos grupos co-cultivados e neurodiferenciados foram distribuídas ao longo das células, indicando a positividade do conjunto de diferentes anticorpos utilizados no estudo (Figuras 11, 12, 13 e 14), podendo ser evidenciada marcação nuclear e ao longo dos prolongamentos celulares, indicando que as células passaram a expressar marcadores específicos de estruturas neuronais diferenciadas quando co-cultivadas com células mononucleares de cordão umbilical e aplicado protocolo de neurodiferenciação.

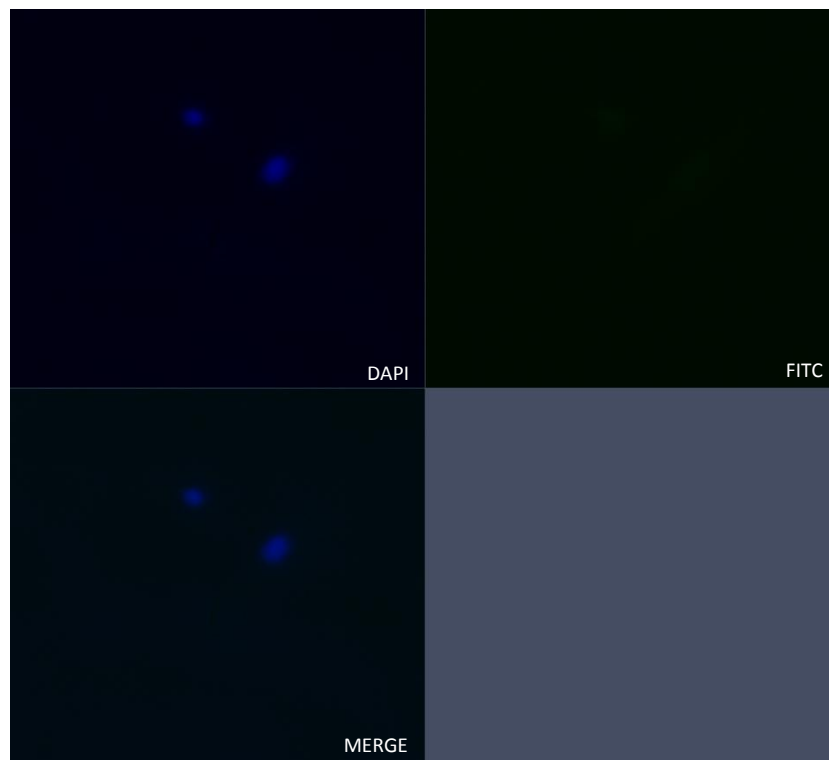


Figura 8 – Captura de imagem do grupo 3T3 por microscopia confocal. DAPI: marcação nuclear; FITC: marcação do anticorpo FluoroPan Neuronal; MERGE: co-localização das imagens.

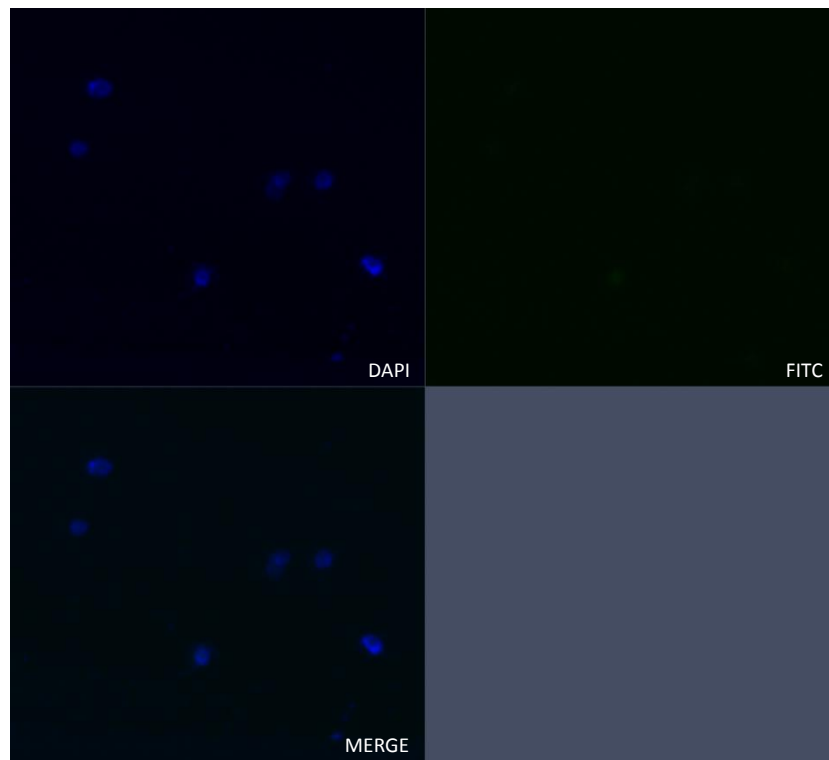


Figura 9 – Captura de imagem do grupo 3T3D por microscopia confocal. DAPI: marcação nuclear; FITC: marcação do anticorpo FluoroPan Neuronal; MERGE: colocalização das imagens.

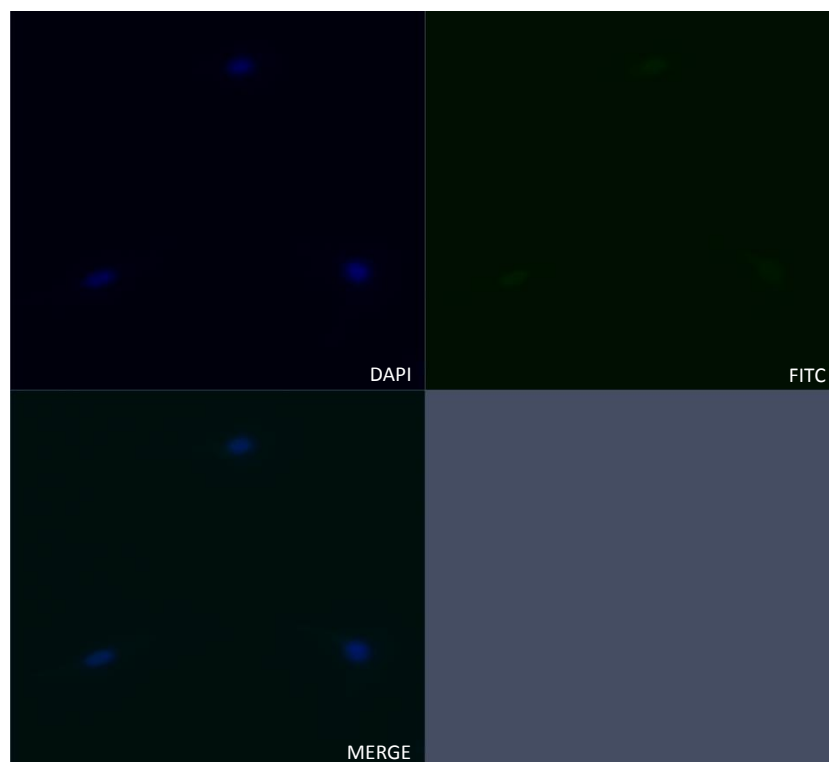


Figura 10 – Captura de imagem do grupo CC(ND) por microscopia confocal. DAPI: marcação nuclear; FITC: marcação do anticorpo FluoroPan Neuronal; MERGE: colocalização das imagens.

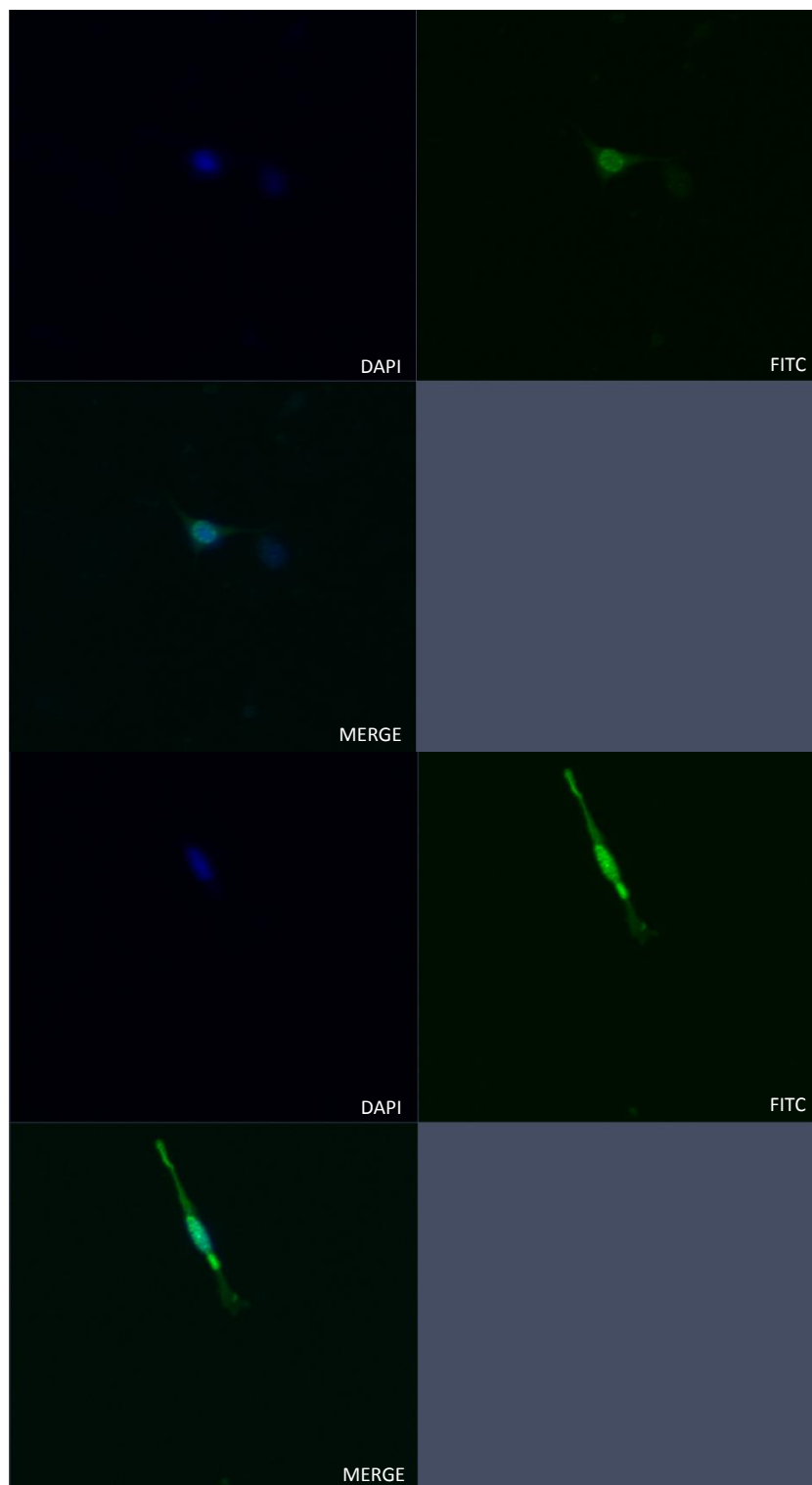


Figura 11 – Captura de imagem do grupo PCT1 por microscopia confocal. DAPI: marcação nuclear; FITC: marcação do anticorpo FluoroPan Neuronal; MERGE: colocalização das imagens.

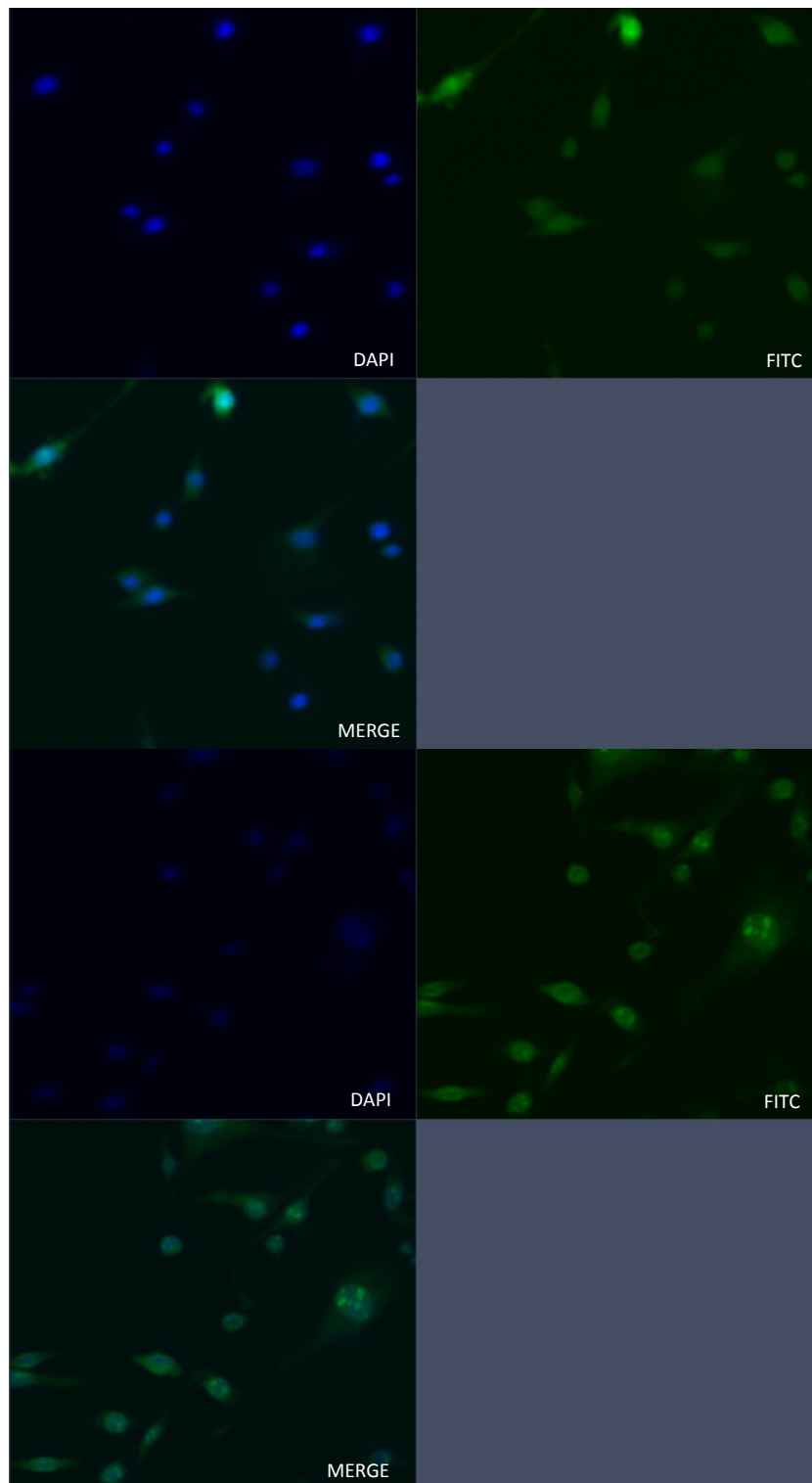


Figura 12 – Captura de imagem do grupo PCT2 por microscopia confocal. DAPI: marcação nuclear; FITC: marcação do anticorpo FluoroPan Neuronal; MERGE: colocalização das imagens.

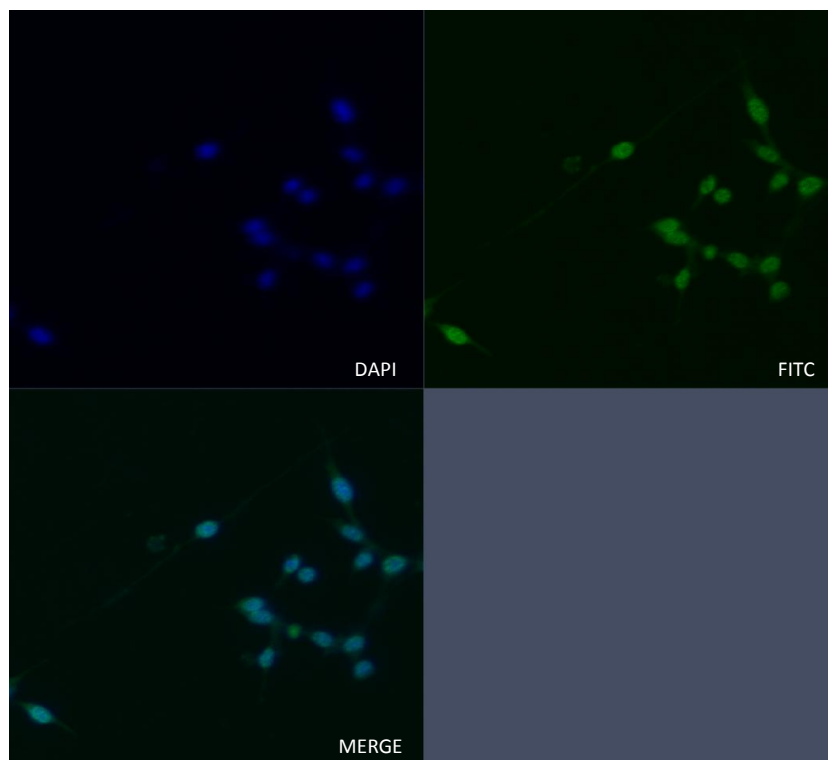


Figura 13 – Captura de imagem do grupo PCT3 por microscopia confocal. DAPI: marcação nuclear; FITC: marcação do anticorpo FluoroPan Neuronal; MERGE: colocalização das imagens.

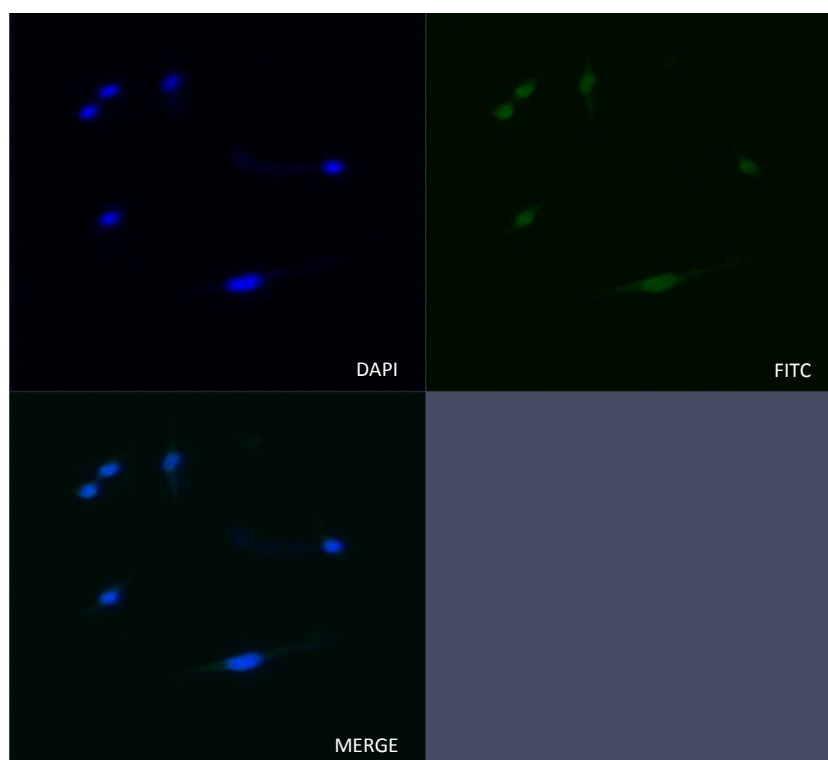


Figura 14 – Captura de imagem do grupo PCT4 por microscopia confocal. DAPI: marcação nuclear; FITC: marcação do anticorpo FluoroPan Neuronal; MERGE: colocalização das imagens.

Para avaliação quantitativa, foram selecionados os parâmetros de área, diâmetro, dimensão fractal e densidade óptica (Figura 15). Quando analisado o parâmetro área, que indica a quantificação espacial e bidimensional de superfície das culturas, o grupo 3T3, o grupo CC-ND e o grupo 3T3D apresentaram resultados estatisticamente significativos quando comparados aos quatro grupos co-cultivados e neurodiferenciados PCT(1,2,3,4)F4 ($p < 0,05$). Na análise do parâmetro diâmetro, os grupos 3T3, CC-ND e 3T3D apresentaram resultados estatisticamente significativos em relação aos co-cultivos neurodiferenciados ($p < 0,05$). Apenas o controle CC(ND) em relação ao grupo PCT1, não apresentou diferença estatística, pois houve um aumento do diâmetro de marcação no grupo CC(ND).

O parâmetro dimensão fractal, que elucida os níveis de irregularidades da marcação, apresentou resultados com diferença estatística em três grupos testados em relação aos três controles ($p < 0,05$), sendo o grupo PCT1 o único que não apresentou resultados estatisticamente significativos em comparação a nenhum controle. Na avaliação da densidade óptica, que indica o grau de intensidade de marcação, o grupo 3T3D apresentou resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparado com os quatro grupos de PCT(1,2,3,4)F4, os grupos 3T3 e CC-ND somente não apresentaram resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo PCT1F4.

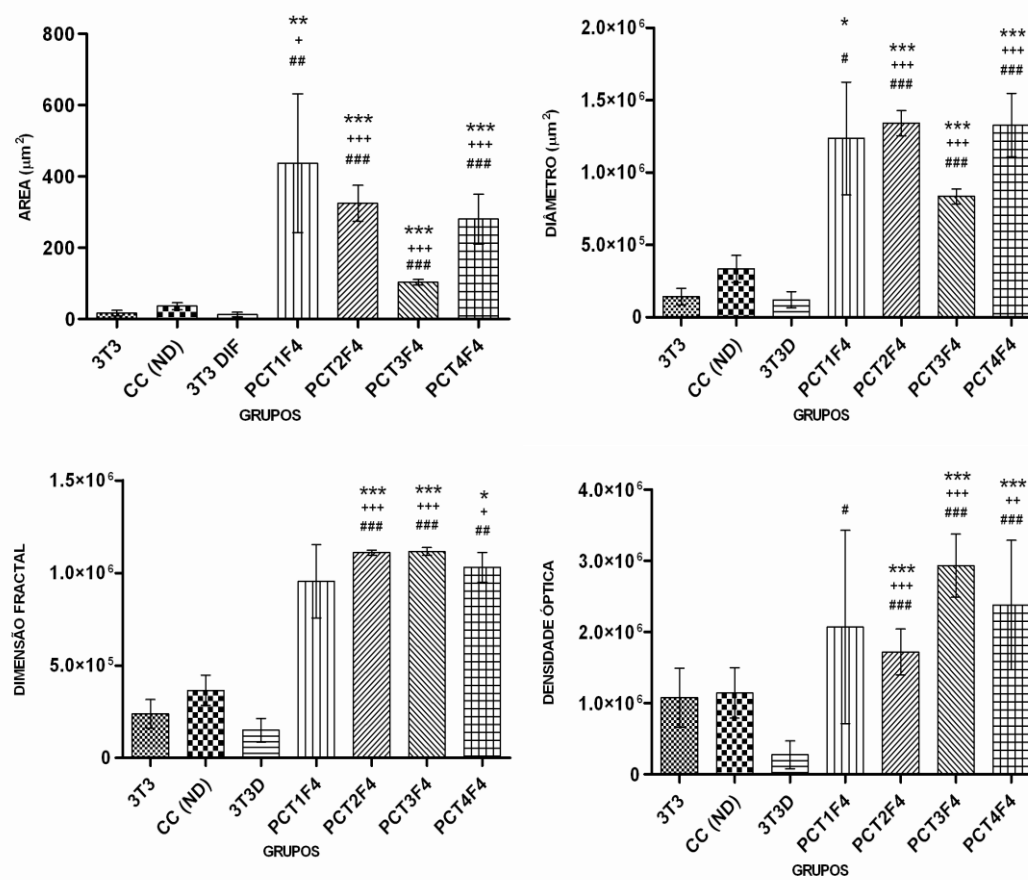


Figura 15 – Histogramas representando os valores de área, diâmetro, densidade óptica e dimensão fractal das células co-cultivadas e neurodiferenciadas. (*: 3T3 vs. PCT1, 2, 3 e 4 F4; +: CC(ND) vs. PCT1, 2, 3 e 4 F4; #: 3T3D vs. PCT1, 2, 3 e 4 F4).

4.5. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os fibroblastos inicialmente co-cultivados por sete dias com a fração mononuclear de cordão umbilical, cultivados em meio DMEM por três dias (3T3) apresentaram um crescimento populacional de 2×10^4 para $5,8 \times 10^4$. No protocolo de neurodiferenciação aplicado, as células cultivadas por três dias no meio suplementado com β -mercaptoetanol (FII) apresentaram um crescimento de 2×10^4 para $7,4 \times 10^4$. Essas células foram re-cultivadas por três dias em meio DMEM/F12 (FIII) e apresentaram um crescimento de 2×10^4 para $7,3 \times 10^4$ e quando cultivadas por sete dias em meio N5 suplementado com neurotrofinas e fatores de crescimento (FIV) as células passaram de 2×10^4 para $1,8 \times 10^4$ (Figura 16).

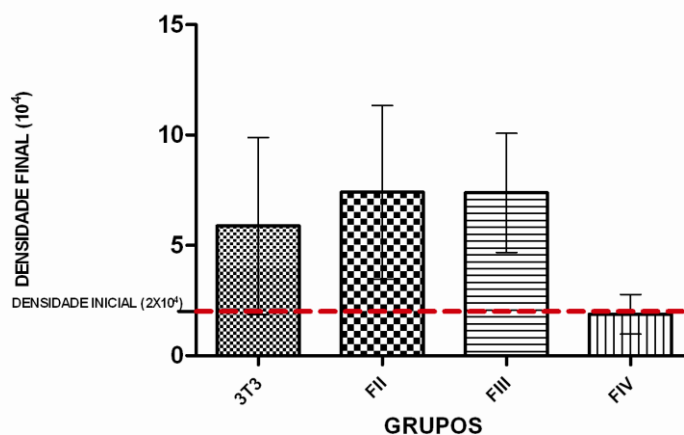


Figura 16 – Histograma representando o crescimento populacional do protocolo de neurodiferenciação. 3T3: fibroblastos cultivados por três dias em DMEM; FII, III e FIV: fibroblastos após o co-cultivo nas distintas fases da neurodiferenciação.

5. DISCUSSÃO

A reprogramação celular pode ser realizada por diferentes maneiras, entre elas transferência nuclear, fusão de células somáticas com células embrionária e a reprogramação por transfecção gênica (53, 54, 60, 61). Nossos resultados sugerem que o co-cultivo dos fibroblastos com células da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical por sete dias pode modular os fibroblastos em relação a sua plasticidade. Esse tempo de cultivo foi suficiente para que os fibroblastos tivessem domínio absoluto do cultura, confirmado pela técnica de PCR utilizando marcadores humanos e de camundongos. Esse domínio pode ser associado à pouca quantidade e a dificuldade de adesão das células mesenquimais presentes no sangue de cordão umbilical, sendo essas células uma população extremamente rara, alcançando proporções de 1 a cada 10^8 células da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical (18), bem como a taxa de crescimento exponencial das células da linhagem de fibroblastos de camundongo NIH 3T3 que se dá a cada $22,5 \pm 2,5$ horas (62), tornando esse co-cultivo altamente promissor ao domínio dos fibroblastos. A caracterização da homogeneidade dos cultivos pela técnica de PCR permite descrever os resultados de reprogramação e de neurodiferenciação, diretamente associados aos fibroblastos e não a uma fusão de células ou uma população de células mesenquimais de sangue de cordão umbilical e fibroblastos juntos, assim, as células em que a investigação de genes de pluripotência, a diferenciação mesodérmica e o protocolo de neurodiferenciação foram aplicados eram fibroblastos de camundongos NIH 3T3. A técnica de PCR aplicada nesse estudo utiliza componentes básicos e o complexo maquinário de replicação para amplificar um fragmento de DNA. Com um número baixo de moléculas presentes no início da reação de PCR pode-se amplificar um grande número de moléculas de DNA. A detecção de diferentes linhagens em co-cultivo pode ser determinada através da técnica de PCR em um curto espaço de

tempo com uma resposta segura e eficiente, sendo detectada com até 1% de nível de contaminação de linhagens co-cultivadas (63-66).

Após o co-cultivo das células 3T3 com as células mononucleares de sangue de cordão umbilical a verificação da transcrição do mRNA do gene KLF4 indica que esse processo pode promover fatores de transcrição para esse gene, não ocorrendo com os genes SOX2 e Oct3/4. O gene KLF4 junto com outros genes (KLF2, KLF5, Oct4, SOX2 e Nanog) formam o chamado circuito molecular essencial para auto-renovação das células pluripotentes. Cada gene da família dos KLFs pode desempenhar um papel diferente e específico na manutenção do estado de pluripotência das células embrionárias de ratos (67). Recentemente os genes da família KLF receberam atenção especial após a comprovação que células somáticas podem ser reprogramadas em células pluripotente induzidas, chamadas de iPS, através da transfecção de um coquetel de genes de pluripotência, entre eles o gene KLF4. Takahashi e Yamanaka em 2006 (53), mostraram que de uma seleção de 24 genes candidatos a promoção de pluripotência devido as suas importantes funções na manutenção e identidade das célula-tronco embrionárias, os genes Oct3/4, SOX2, cMyc e KLF4 foram essenciais e suficientes para promover pluripotências em fibroblastos adultos. Os KLFs e os genes Oct3/4, SOX2 e Nanog estão fortemente interligados uma vez que KLF2, KLF4 e KLF5 ativa a expressão de Nanog, Oct3/4 e SOX2, onde Oct3/4 ativa KLF2 e Nanog ativa KLF4 e KLF5 formando uma rede de retro-transcrição pois os promotores de cada um desses genes (Oct3/4, SOX2 e Nanog) possuem sítios de ligação para os três fatores de transcrição e interrupção (67-69). Na nossa amostra, a positividade para KLF4 em sete dias de co-cultivo pode ser relacionada com o início do processo de pluripotência nos fibroblastos, indicando uma reprogramação primária dessas células pois após a indução a diferenciação de células embrionárias de ratos em cultura, a transcrição de KLF4 diminuída muito inicialmente em relação a KLF2 e outros genes do circuito de pluripotência, indicando

uma desconstrução progressiva do circuito molecular da pluripotência iniciado pelo gene KLF4 (67, 69, 70).

A diferenciação mesodérmica é um dos três critérios mínimos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para caracterização de linhagem mesenquimal derivada de qualquer tecido em potencial (45). A caracterização mesodérmica das células-tronco mesenquimais juntamente com o perfil de marcação de imunofenotipagem específico e a adesão ao plástico permite a distinção das células-tronco mesenquimais das demais células com potencial de adesão quando colocado em cultura. Essa caracterização foi descrita devido ao grande número de pesquisas envolvendo células-tronco mesenquimais nas últimas duas décadas e o grande interesse clínico ao uso dessas células a fim de estabelecer um padrão de inclusão das células da linhagem mesenquimal (45). A diferenciação mesodérmica pode ser considerada um indício de classificação de células pluripotentes. O co-cultivo das células 3T3 com as células mononucleares de cordão umbilical permitiu a diferenciação mesodérmica dos fibroblastos após protocolo de diferenciação. Essa caracterização indica que o co-cultivo foi capaz de fazer os fibroblastos adquirirem características de células-tronco mesenquimais, colocando em um nível de plasticidade capaz de permitir a diferenciação osteogênica e adipogênica induzida após o co-cultivo. Por outro lado, as células-tronco mesenquimais e fibroblastos maduros dividem diversas características morfológicas e funcionais, até mesmo características peculiares de classificação estabelecidas pela Sociedade Internacional de Pesquisas com Células-tronco (ISSCR), como a adesão ao plástico, imunofenótipo positivo para CD73 e CD75, negativo para CD14, CD34 e CD45, além da diferenciação da induzida para linhagem osteogênica e adipogênica. (47, 48). Diversas similaridades entre os fibroblastos e as células-tronco mesenquimais já foram descritas até hoje, a localização dessas células em todos os órgãos do corpo, sendo de origem endotelial, epitelial e hematopoiético, com capacidade de sintetizar e remodelar a matriz extra celular (49, 50). A avaliação de genes de pluripotência e

neurodiferenciação de fibroblastos de camundongo NIH 3T3 ainda não foi descrita na literatura. Características de células indiferenciadas já foram descritas em fibroblastos maduros, como por exemplo em resposta a ferimentos, mecanismos de estresse tecidual, inflamações, alguns fibroblastos participam no sítio de ferimentos através da migração, proliferação para restabelecer a homeostasia dos tecidos a partir da redução da inflamação local (50, 51), porém, o reparo associado aos fibroblastos em um eventual insulto continuado, pode causar inflamação crônica e a formação de fibrose (52), diferente do que é associado ao tratamento de lesões utilizando células-tronco mesenquimais (29). Os fibroblastos adultos também podem secretar fatores como FGF, KGF, LIF para a sobrevivência celular além de citocinas imunomoduladoras potencialmente capazes de suprimir sítios inflamatórios, tendo mecanismos de estímulos muito similares aqueles associados as células-tronco mesenquimais (30, 47, 71-74). Em uma recente comparação direta entre fibroblastos adultos e vários tecidos, inclusive células-tronco mesenquimais, foi possível mostrar uma similaridade *in vitro* do potencial imunossupressor de ambas as linhagens celulares (48, 73, 75). Fibroblastos derivados de pele, de pulmão e células derivadas de tecido adiposo, exibem morfologia fusiforme muito semelhante. Essas células podem compartilhar alguns marcadores de superfície característicos de células mesenquimais e de fibroblastos. Um recente estudo apresentou um perfil de compartilhamento de marcação entre essas linhagens, sendo positivas para CD44, CD73, CD105, Colágeno I, Hsp47, Vimetina, FSP e α SMA e negativas para CD14 e CD45. Os fibroblastos derivados da pele e as células derivadas do tecido adiposo foram capazes de formar colônias e diferenciar-se em adipócitos, condrócitos e osteócitos, o que não aconteceu com os fibroblastos derivados de pulmão (76).

Após aplicação do protocolo de neurodiferenciação foi observado marcação fluorescente referente ao anticorpo utilizado nas células que passaram pelo co-cultivo antes da neurodiferenciação. Nossos resultados corroboram para indicação de que o co-cultivo é capaz de promover a reprogramação dos fibroblastos diferenciados em

células capazes de expressarem marcadores específicos neuronais após a aplicação de um protocolo de neurodiferenciação. O grupo 3T3D indica que o co-cultivo está relacionado com o desfecho positivo das marcações neurais após a neurodiferenciação, pois esses fibroblastos que não passaram pelo co-cultivo com as células mononucleares apresentaram um perfil de marcação estatisticamente inferior àqueles que o co-cultivo foi aplicado. O grupo CCND indica que apenas o co-cultivo não é capaz de promover marcação neural nas células, indicando que a reprogramação após o co-cultivo permite que as células sejam direcionadas a diferenciação neural somente se induzidas por fatores específicos no meio de cultura e apenas o co-cultivo não promove a marcação neural das células. E especificidade dos marcadores fica evidenciada pelos resultados obtido pela imunofluorescência aplicada nos fibroblastos que não foram co-cultivados e não foram neurodiferenciados (3T3).

A diversidade de marcação avaliada através dos parâmetros área, diâmetro, densidade óptica e dimensão fractal em relação aos quatro diferentes cordões umbilicais, onde o grupo PCT1 não teve desfechos semelhantes aos demais grupos, podem estar relacionados com a heterogeneidade de células encontradas na fração mononuclear e fatores como idade gestacional (77) e aos fatores intrínsecos e extrínsecos que podem influenciar na manutenção dessas células, como envelhecimento, e uso de componentes químicos (78, 79). Esses fatores podem ser relacionados com o comportamento diferenciado do grupo PCT1, pois entre os parâmetros avaliados e os respectivos controles testados, apenas esse grupo não apresentou diferença estatisticamente significativa em todos os parâmetros comparado com todos os controles.

Os fibroblastos co-cultivados com a fração mononuclear do sangue de cordão umbilical apresentaram crescimento populacional evidente, corroborando com o comportamento de crescimento exponencial as células NIH 3T3. Em todas as fases da neurodiferenciação as células comportaram-se dessa maneira, exceto na última fase do protocolo onde são utilizados fatores essenciais para a promoção da

neurodiferenciação. Dentro desse cenário, as células que alcançaram a última fase do protocolo de neurodiferenciação podem passar a apresentarem um comportamento mitótico semelhante a células neurais, com baixas taxas de divisão celular. Sendo assim, nesta fase do protocolo, os fibroblastos reprogramados atenuam a taxa de crescimento populacional devido a rota de diferenciação dada a eles, levando a um comportamento celular fenotípico muito semelhante a essa característica primordial das células nervosas.

O co-cultivo das células NIH 3T3 com a fração mononuclear de cordão umbilical promoveu uma reprogramação das células para um estado mais indiferenciado e posterior diferenciação induzida à linhagem neural. Sabe-se dos mecanismos parácrinos associados a terapia celular com células-tronco, onde a lesão pode ser atenuada devido a diferentes fatores endógenos associados a aplicação local ou sistêmica de células-tronco. Os fatores parácrinos com potencial de promover melhora no estado geral de uma determinada injúria ou a recuperação tecidual em lesões de diversas ordens associados às células-tronco descritos até os dias atuais são: efeito imunomodulador, efeito anti-apoptótico, efeito pró-angiogênico, efeito quimioatratante, efeito anti-fibrose e o suporte para o crescimento e diferenciação de células progenitoras endógenas (29, 30). Esses efeitos foram descritos a partir de resultados de experimentos *in vitro*, evidenciando inclusive as diversas moléculas envolvidas na mediação parácrina de cada efeito específico. O contato em forma de co-cultivo dos fibroblastos diferenciados com a fração mononuclear de cordão umbilical promoveu a reprogramação dessas células a um estágio mais plástico que o inicial, confirmado pela expressão do gene KLF4 e pela diferenciação mesodérmica após o co-cultivo. A diferenciação dos fibroblastos co-cultivados induzida por fatores solúveis para a linhagem neuronal foi confirmada pela técnica de imunofluorescência, apresentando resultados estatisticamente significativos, caracterizando um potencial de diferenciação das células co-cultivadas com a fração mononuclear de cordão umbilical. Um novo mecanismo de ação das células-tronco pode ser associado a

esses achados uma vez que as células indiferenciadas foram reprogramadas para um nível maior de plasticidade e posteriormente diferenciadas a uma linhagem distinta. Em um sítio de lesão as células-tronco administradas poderiam promover a reprogramação das células adultas residentes na zona de lesão gerando um potencial para a posterior regeneração tecidual, não somente recrutando células progenitoras locais, mas também promovendo regeneração a partir de células adultas diferenciadas que encontram-se na zona periférica da lesão. Esse mecanismo poderia ser associados aos já descritos como mais um possível efeito das células-tronco nos processos de regeneração tecidual e tratamento a doenças de diversas ordens. Assim, postulamos uma nova hipótese de mecanismo que está sendo elucidada para corroborar com os efeitos mediadores das células-tronco. Os achados em nossos experimentos e as investigações posteriores serão importantes para confirmar mais esse possível mecanismo de reprogramação celular que poderá estar ocorrendo no efeito terapêutico associado às células-tronco adultas.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada a influência do co-cultivo de células diferenciadas com células indiferenciadas, analisando o potencial de plasticidade celular e neurodiferenciação adquirido pelo co-cultivo.

O estudo possibilitou as seguintes conclusões:

- Após seis dias de co-cultivo os fibroblastos predominaram em relação à fração mononuclear do sangue de cordão umbilical.
- Ocorreu diferenciação mesodérmica dos fibroblastos co-cultivados com a fração mononuclear de cordão umbilical.
- Os fibroblastos passaram a expressar o gene de pluripotência KLF4 após o co-cultivo com a fração mononuclear de cordão umbilical.
- Foi detectada a expressão de proteínas estruturais específicas de células neurais em fibroblastos co-cultivados com a fração mononuclear do sangue de cordão umbilical após a indução à neurodiferenciação.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados observados neste estudo indicam a necessidade do emprego de novas abordagens investigativas para que o co-cultivo, neurodiferenciação e a funcionalidade das células neurodiferenciadas, permitindo assim:

- Avaliação da neurodiferenciação utilizando painéis de mRNA.
- Investigação do potencial elétrico das células co-cultivadas neurodiferenciadas.
- Co-cultivo dos fibroblastos com a fração mononuclear do sangue de cordão umbilical por períodos mais longos.
- Avaliação dos potenciais parácrinos associados a MSC nos fibroblastos co-cultivados
- Investigação do possível efeito de reprogramação de células residuais em sítios de lesão corroborando para elucidação dos efeitos terapêuticos das células-tronco.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):143-55.
2. Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S336-44.
3. Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*. 1999 Jul 30;285(5428):754-6.
4. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001 Dec;19(12):1134-40.
5. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2000 Jun;18(6):675-9.
6. Jurga M, Markiewicz I, Sarnowska A, Habich A, Kozłowska H, Lukomska B, et al. Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. *J Neurosci Res*. 2006 Mar;83(4):627-37.
7. Streckfuss-Bomeke K, Vlasov A, Hulsmann S, Yin D, Nayernia K, Engel W, et al. Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germ-line stem cells. *Stem Cell Res*. 2009 Mar;2(2):139-54.
8. Gordon D, Scolding NJ. Human mesenchymal stem cell culture for neural transplantation. *Methods Mol Biol*. 2009;549:103-18.
9. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci*. 2004 Sep 1;117(Pt 19):4411-22.
10. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980 Aug;56(2):289-301.
11. Kobylka P, Ivanyi P, Breur-Vriesendorp BS. Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation*. 1998 May 15;65(9):1275-8.
12. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001 Oct;86(10):1099-100.

13. Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, et al. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol*. 2001 Sep;171(1):109-15.
14. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*. 2010 Aug 26;2(4):81-92.
15. Momin EN, Mohyeldin A, Zaidi HA, Vela G, Quinones-Hinojosa A. Mesenchymal Stem Cells: New Approaches for the Treatment of Neurological Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*. Jun 9.
16. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):381-90.
17. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
18. Dexter TM, Wright EG, Krizsa F, Lajtha LG. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine*. 1977 Dec;27(9-10):344-9.
19. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):841-6.
20. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011 Feb 28;6:457-78.
21. Chan WK, Lau AS, Li JC, Law HK, Lau YL, Chan GC. MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. *Exp Hematol*. 2008 Nov;36(11):1545-55.
22. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):229-30.
23. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):341-7.
24. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.
25. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006 Aug 1;98(5):1076-84.
26. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Oct-Dec;20(5-6):419-27.
27. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005 May;35(5):1482-90.

28. Lanz TV, Opitz CA, Ho PP, Agrawal A, Lutz C, Weller M, et al. Mouse mesenchymal stem cells suppress antigen-specific TH cell immunity independent of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). *Stem Cells Dev.* 2010 May;19(5):657-68.
29. Karlsson H, Samarasinghe S, Ball LM, Sundberg B, Lankester AC, Dazzi F, et al. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood.* 2008 Aug 1;112(3):532-41.
30. Meirelles Lda S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci.* 2009;14:4281-98.
31. Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Stem Cells.* 2009 Jan;27(1):238-49.
32. Li L, Zhang S, Zhang Y, Yu B, Xu Y, Guan Z. Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. *Mol Biol Rep.* 2009 Apr;36(4):725-31.
33. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol.* 1996 Mar;166(3):585-92.
34. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol.* 1998 Jul;176(1):57-66.
35. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 2006 Dec;25(6):977-88.
36. Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci.* 2006 Dec 13;26(50):13007-16.
37. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* 2004 Mar 30;109(12):1543-9.
38. Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells.* 2007 Sep;25(9):2363-70.
39. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A.* 2009 Jul;15(7):1751-61.
40. Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 1997 Aug 1;90(3):909-28.

41. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
42. Cleary EG, Gibson MA. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. *Int Rev Connect Tissue Res*. 1983;10:97-209.
43. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol*. 2007 Aug 1;179(3):1595-604.
44. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009 Feb;94(2):258-63.
45. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Sep;72(3):283-92.
46. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. 2007 Feb;21(2):325-32.
47. Ariel A, Serhan CN. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol*. 2007 Apr;28(4):176-83.
48. Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest*. 2003 Dec;83(12):1689-707.
49. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
50. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997 Feb 27;385(6619):810-3.
51. Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J*. 1997 Nov 3;16(21):6510-20.
52. Rajasingh J, Lambers E, Hamada H, Bord E, Thorne T, Goukassian I, et al. Cell-free embryonic stem cell extract-mediated derivation of multipotent stem cells from NIH3T3 fibroblasts for functional and anatomical ischemic tissue repair. *Circ Res*. 2008 Jun 6;102(11):e107-17.
53. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008 Jan;26(1):101-6.

54. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007 Apr;211(1):27-35.
55. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):41-9.
56. Chua SJ, Bielecki R, Wong CJ, Yamanaka N, Rogers IM, Casper RF. Neural progenitors, neurons and oligodendrocytes from human umbilical cord blood cells in a serum-free, feeder-free cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 6;379(2):217-21.
57. Koh SH, Kim KS, Choi MR, Jung KH, Park KS, Chai YG, et al. Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. *Brain Res*. 2008 Sep 10;1229:233-48.
58. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999 Mar 15;72(4):570-85.
59. Song S, Sanchez-Ramos J. Preparation of neural progenitors from bone marrow and umbilical cord blood. *Methods Mol Biol*. 2008;438:123-34.
60. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*. 2005 Aug 26;309(5739):1369-73.
61. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol*. 2001 Oct 2;11(19):1553-8.
62. Carrino D, Gershman H. Division of BALB/c mouse 3T3 and simian virus 40-transformed 3T3 cells in cellular aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Sep;74(9):3874-8.
63. Wang H, Kong F, Jelfs P, James G, Gilbert GL. Simultaneous detection and identification of common cell culture contaminant and pathogenic mollicutes strains by reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Mar;70(3):1483-6.
64. Eldering JA, Felten C, Veilleux CA, Potts BJ. Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals*. 2004 Dec;32(4):183-93.
65. Volokhov DV, Kong H, George J, Anderson C, Chizhikov VE. Biological enrichment of Mycoplasma agents by cocultivation with permissive cell cultures. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Sep;74(17):5383-91.


66. Steinberg S, Katsanis S, Moser A, Cutting G. Biochemical analysis of cultured chorionic villi for the prenatal diagnosis of peroxisomal disorders: biochemical thresholds and molecular sensitivity for maternal cell contamination detection. *J Med Genet.* 2005 Jan;42(1):38-44.
67. Bourillot PY, Savatier P. Kruppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol.* 2010;8:125.
68. Jiang J, Chan YS, Loh YH, Cai J, Tong GQ, Lim CA, et al. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2008 Mar;10(3):353-60.
69. Bourillot PY, Aksoy I, Schreiber V, Wianny F, Schulz H, Hummel O, et al. Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells.* 2009 Aug;27(8):1760-71.
70. Schulz H, Kolde R, Adler P, Aksoy I, Anastassiadis K, Bader M, et al. The FunGenES database: a genomics resource for mouse embryonic stem cell differentiation. *PLoS One.* 2009;4(9):e6804.
71. Korn JH. Modulation of lymphocyte mitogen responses by cocultured fibroblasts. *Cell Immunol.* 1981 Sep 15;63(2):374-84.
72. Sarkhosh K, Tredget EE, Li Y, Kilani RT, Uludag H, Ghahary A. Proliferation of peripheral blood mononuclear cells is suppressed by the indoleamine 2,3-dioxygenase expression of interferon-gamma-treated skin cells in a co-culture system. *Wound Repair Regen.* 2003 Sep-Oct;11(5):337-45.
73. Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol.* 2007 Sep 1;179(5):2824-31.
74. Le JM, Vilcek J. Accessory function of human fibroblasts in mitogen-stimulated interferon-gamma production by T lymphocytes. Inhibition by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1987 Nov 15;139(10):3330-7.
75. Bocelli-Tyndall C, Barbero A, Candrian C, Ceredig R, Tyndall A, Martin I. Human articular chondrocytes suppress in vitro proliferation of anti-CD3 activated peripheral blood mononuclear cells. *J Cell Physiol.* 2006 Dec;209(3):732-4.
76. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000 Apr;109(1):235-42.
77. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 28;102(26):9194-9.
78. Hardy RR, Wei CJ, Hayakawa K. Selection during development of VH11+ B cells: a model for natural autoantibody-producing CD5+ B cells. *Immunol Rev.* 2004 Feb;197:60-74.

9. ANEXOS

9.1. CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

31/08/11
MZ

Samir



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF. CEP-1285/11

Porto Alegre, 12 de agosto de 2011.


Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05504 intitulado **"Neurodiferenciação de células-tronco de cordão umbilical humano"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa
HSL
Nesta Universidade

PUCRS | **Campus Central**
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

9.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL PARA REALIZAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA:

“NEURODIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE CORDÃO HUMANO.”

A – PROPOSTA DO PROGRAMA:

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa: “Neurodiferenciação de células-tronco de cordão umbilical humano”

B – OBJETIVOS DO PROGRAMA:

Durante a gravidez, o oxigênio e nutrientes essenciais passam do sangue materno para o bebê através da placenta e do cordão umbilical. Após o parto, o sangue que permanece no cordão umbilical e na placenta é geralmente descartado. Este sangue contém um grande número de células-tronco, que são células jovens, que conseguem se reproduzir em células de seus respectivos tecidos. Pesquisas em andamento buscam utilizar essas células na regeneração de órgãos, como o coração e o cérebro, pois estas células podem se transformar em diversas outras células, tais como, células sanguíneas, musculares e nervosas (neurônios). Você está sendo convidada a participar deste projeto de pesquisa porque acaba de dar a luz a um bebê. A coleta ocorrerá após o nascimento do seu bebê e não afetará de nenhuma maneira o parto ou os cuidados dispensados ao seu filho. O objetivo deste trabalho é avaliar se as células-tronco de cordão umbilical humano podem transformar-se células nervosas afim de tratar doenças neurológicas de diversas ordens. Com a sua permissão, o sangue do cordão umbilical de seu filho, poderá ser usado para os objetivos citados anteriormente. Porém, o sangue do cordão umbilical de seu filho não será usado para doação para pacientes que precisam de transplante, mas apenas para pesquisa.

C – RISCOS E DESCONFORTOS POTENCIAIS:

Não existe qualquer tipo de risco na participação do programa. O sangue coletado da placenta não é necessário para o seu bebê após o cordão umbilical ter sido cortado, uma vez que este material seria descartado. Todas as informações coletadas serão mantidas confidenciais. Nem você e nem seu bebê serão identificados em qualquer publicação dos dados que seja realizada.

D – BENEFÍCIOS:

O único benefício em participar deste programa é que, doando o sangue da placenta de seu bebê para pesquisa, você poderá ajudar-nos a conhecer o tratamento de lesões no cérebro com o uso de células-tronco de cordão umbilical.

E – CUSTOS:

Não haverá, para o participante, nenhum custo com a realização da pesquisa proposta. Caso você decida não participar do programa, não sofrerá nenhum prejuízo no atendimento dispensado à você e a seu filho. A decisão de não participar do programa não irá afetar o seu atendimento no hospital.

F – TERMO DE PARTICIPAÇÃO:

Assuntos de importância para você serão esclarecidos antes de o consentimento ser assinado.

G – ALTERNATIVAS PARA PARTICIPAÇÃO:

Você pode decidir não doar o sangue da placenta de seu filho para o projeto. Caso decida não participar do programa, o sangue da placenta não será coletado, ou se já coletado, será desprezado, não sendo utilizado na pesquisa.


CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO DE SANGUE DE PLACENTA

Declaro que li as informações anteriormente descritas a respeito do projeto de pesquisa “NEURODIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE CORDÃO UMBILICAL E MEDULA ÓSSEA HUMANAS.” e tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas.

Aceito participar da doação de sangue de placenta para o projeto proposto, com o objetivo de pesquisa, não sendo usado para doação.

_____/_____/_____
 Assinatura da mãe Nome da mãe

9.3. ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA A REVISTA CELL RESEARCH

 manuscripttrackingssystem Cell Research	
tracking system home author instructions reviewer instructions ? help tips logout journal home	
Manuscript #	CR-2011-1233
Current Revision #	0
Submission Date	15th Dec 11
Current Stage	Manuscript Received
Title	Expression of pluripotency gene and neuronal marker after neurodifferentiation of fibroblasts co-cultured with umbilical cord blood mononuclear cells
Running Title	Expression of pluripotency gene and neuronal marker
Manuscript Type	Original Article
Category	stem cell biology, development, molecular, cellular neuroscience
Manuscript Comment	Dr. Paulo Márcio C. Pitrez. PUCRS - pmpitrez@puhrs.br Dr. Rosália M. Otero. UFRJ - rmotero@biof.ufrj.br Dr. Alejandro Correa. FIOCRUZ PR - alejandro@tepar.br
Corresponding Author	Dr. Jaderson DaCosta (PUCRS)
Contributing Authors	Mr. Daniel Marinowic , Dr. Carlos Ayoub , Miss Michelle Domingues , Dr. Denise Machado
Abstract	Cellular therapies represent a new frontier for the treatment of several diseases, including diseases related to central nervous system. Human umbilical cord blood is an attractive source of stem cells; however, it has a heterogeneous population with a small amount of mesenchymal stem cells. Cell reprogramming induced by different methodologies can confer pluripotency to differentiated adult cells. The Objective of the study to evaluate the reprogramming of fibroblasts and neural differentiation after co-culture with umbilical cord blood mononuclear cells. Cells were obtained from four human umbilical cord. Cell suspensions were fractionated at density gradient. The mononuclear cells was cultured for seven days and later, the culture was infected with 105 cells of mouse fibroblast NIH 3T3 and co-cultured for six days. To evaluate the pluripotency it was performed mRNA extraction and amplification using primers specific for pluripotency genes. The differentiation was also confirmed by the adipogenic and osteogenic differentiation. Neural differentiation of the reprogrammed cells using method described by Song et. al (2008)(1) and evaluated by immunofluorescence. Population growth was quantified by hemocytometer. All co-cultured cells showed adipogenic and osteogenic differentiation capacity. After co-cultivation cells began transcribing the pluripotency gene KLF4. Statistically significant differences in the parameters area, diameter, optical density and fractal dimension were observed by confocal microscopy in the neural differentiated cells. The contact in form of co-cultivation of fibroblasts with umbilical cord blood mononuclear fraction for six days promoted the reprogramming of these cells to a indifferentiation stage, allowing the induction of neural differentiation later.
Editor	
Keywords	Neurodiferenttiation, Umbilical cord blood, Fibroblast, Co-cultivation
Duality of Interest	There is no duality of interest

Expression of pluripotency gene and neuronal marker after neurodifferentiation of fibroblasts co-cultured with umbilical cord blood mononuclear cells.

Marinowic, D.R.

Biomedical Research Institute, Brain Institute and Cellular Therapy Center. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brazil.

Ayoub, C. A.

Centro de Criogenia Brazil.

Domingues, M. F.

Biomedical Research Institute, Brain Institute and Cellular Therapy Center. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brazil

Machado, D.C.

Biomedical Research Institute and Cellular Therapy Center. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brazil

DaCosta, J.C.

Brain Institute and Cellular Therapy Center. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, zip code 90610-000, Brazil. Phone: 55 (51) 3320300 r. 3250. jcc@pucrs.br

ABSTRACT

Cellular therapies represent a new frontier for the treatment of several diseases, including diseases related to central nervous system. Human umbilical cord blood is an attractive source of stem cells; however, it has a heterogeneous population with a small amount of mesenchymal stem cells. Cell reprogramming induced by different methodologies can confer pluripotency to differentiated adult cells. The Objective of the study to evaluate the reprogramming of fibroblasts and neural differentiation after co-culture with umbilical cord blood mononuclear cells. Cells were obtained from four human umbilical cord. Cell suspensions were fractionated at density gradient. The mononuclear cells was cultured for seven days and later, the culture was infected with 10^5 cells of mouse fibroblast NIH 3T3 and co-cultured for six days. To evaluate the pluripotency it was performed mRNA extraction and amplification using primers specific for pluripotency genes. The differentiation was also confirmed by the adipogenic and osteogenic differentiation. Neural differentiation of the reprogrammed cells using method described by Song *et. al* (2008)(59) and evaluated by immunofluorescence. Population growth was quantified by hemocytometer. All co-cultured cells showed adipogenic and osteogenic differentiation capacity. After co-cultivation cells began transcribing the pluripotency gene KLF4. Statistically significant differences in the parameters area, diameter, optical density and fractal dimension were observed by confocal microscopy in the neural differentiated cells. The contact in form of co-cultivation of fibroblasts with umbilical cord blood mononuclear fraction for six days promoted the reprogramming of these cells to a indifferention stage, allowing the induction of neural differentiation later.

INTRODUCTION

Cellular therapies represent a new frontier for the treatment of various diseases, including diseases related to the central nervous system. The human mesenchymal stem cells (hMSC) can be isolated from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, muscle, skin and other sources, possessing various properties for the treatment of these diseases (80). The human umbilical cord blood is an attractive source of stem cells for transplantation, providing easy collection and a high rate of survival time due to the possibility of cryopreservation. However, umbilical cord blood has stem cells, progenitor cells and mature blood cell populations in the process of maturation, resulting in a heterogeneous population, which when placed in culture, presents a characteristic of multi cellular population (15, 16). The mesenchymal stem cells has generated high expectations for therapeutic strategies because of their capacity for self renewal and differentiation into functional tissues. These cells have to demonstrate efficacy in treating various diseases such as osteogenesis imperfecta, haematopoietic recovery and regeneration of bone tissue. Although of the multiple information about the MSC, their therapeutic use, its mechanisms of self-renewal, differentiation, and paracrine effects are not well understood and are targets of active investigation (21). The embryonic stem cells (ESC) are cells derived from inner cell mass of mammalian blastocysts with great ability to grow indefinitely while maintaining their pluripotency and possessing the ability to differentiate into tissues of three germ layers, being used in the treatment of various diseases such as Parkinson's disease, injury spinal cord and diabetes (53, 81-83). However, ethical difficulties are involved in the use of human embryonic stem cells, and the generation of pluripotent cells from somatic cells of an autologous way to control this problem. Somatic cells can be reprogrammed by nuclear transfer into enucleated oocytes or by cell fusion between somatic cells and embryonic cells, indicating that enucleated oocytes and embryonic cells can confer totipotency or pluripotency in somatic cells (53).

METHODS

Ethical issues

This study was approved by the Scientific and Ethical Committee of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEP-PUCRS 11/05504). The human umbilical cord blood mononuclear cells were obtained from four parturients that gave birth at obstetric center of Hospital São Lucas da PUCRS after signing an informed consent.

Separation of mononuclear cells

The umbilical cord blood was collected by arterial and vein puncture of the umbilical cord and placenta using a 20 mL syringe containing heparin (5.000 U.I.). The blood was diluted (1:1) in RPMI 1640 (Gibco) medium. The suspensions were fractionated over Histopaque 1.077 g/mL (Sigma-Aldrich) density gradient by centrifugation at 400 g for 30 minutes. The mononuclear fraction, located on the interface with Histopaque was collected, and washed twice with sterile saline solution at 0.9% by centrifugation at 400 g for 5 minutes. Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion method. The mononuclear fraction was culture with DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 100 U.I./mL penicillin, 100 U.I./mL of streptomycin and 100 mg/mL of gentamicin at a density of 10^7 cells per 75 cm² flasks. All cultures were maintained in incubators at 37°C with 5% CO₂ for six days.

Co-cultivation

After six days in culture, the umbilical cord blood mononuclear cells were contaminated with 10^5 mouse fibroblasts per flask of 75 cm^2 (NIH-3T3 cell line). After six days of culture, cells reached more than 80% confluence and were removed by trypsinization (GIBCO). This stage characterized the **phase I**.

Mesodermal differentiation

DMEM media containing 10^{-8} mol/L of dexamethasone and 5 mg/mL of insulin was used for adipogenic differentiation, and DMEM supplemented with 10^{-8} mol/L dexamethasone, 5 mg/mL of ascorbic acid 2-phosphate, and 10 mmol/L of β -glycerolphosphate was used for osteogenic differentiation. Cells were cultivated for four weeks.

Neurodifferentiation

The neurodifferentiation was induced by the method described by Song et al. 2008 (59) with modifications. Cells were cultivated in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 0.001% β -mercaptoethanol (Gibco), 10% fetal bovine serum, 100 I.U./mL penicillin, 100 I.U./mL streptomycin and 100 mg/mL gentamicin. After three days cells were on **phase II**, and the culture media were replaced by DMEM/F12 (Gibco) containing fetal bovine serum, penicillin, streptomycin and gentamicin for further three days reaching the **phase III**. The cells were transferred to six-well plates and cultivated with Neurobasal Medium N5 (GIBCO) supplemented with 20 ng/mL of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Sigma-Aldrich), 20 ng/mL of Granulocyte Colony Stimulating Factor (GCSF) (Bergamo) and supplemented with fetal bovine serum, penicillin, streptomycin and gentamicin. The cells were cultured for a period of seven days establishing the **phase IV**.

Histological staining for mesodermal differentiation

To confirm the cell differentiation, cells were washed with DPBS and fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature, followed by Oil Red O staining (Sigma) to detect adipocytes, and Alizarin Red S (Nuclear) staining to detect calcium deposits characteristic from osteogenic lineage.

Evaluation of cell domain after co-cultivation

The domain of a cell type (fibroblasts and/or the umbilical cord blood mononuclear cells) was performed by PCR using primers for mouse IL-2 (Forward: 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'/Reverse: 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATC-3') and human β -actin (Forward: 5'-TCCCTGTACGCCTCTGGXCATA-3'/Reverse: 5'-CCTTCTGCATCCTGTTGGTGATGCTA-3') genes.

RNA extraction and RT-PCR

The RNA extraction was performed using SV-Total RNA kit (Promega) as directed by the manufacturer. The cDNA synthesis was performed using kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) kit as directed by the manufacturer. To evaluate the potential of pluripotency primers for KFL4 (Forward: 5'-CCGTTGGCGTGAGGAACTCT-3'/Reverse: 5'-ATACTGGGTCCAACTCCGGC-3'), SOX2 (Forward: 5'-AGACCGAGAAGCGGCCGTTCA-3'/Reverse: 5'-ATGCGCTGGTTCACGCCCGC-3'), and OCT3/4 (Forward: 5'-TACGAGTTCTGCGGAGGGAT-3'/Reverse: 5'-TCATTGTTGTCGGCTTCCTC-3') mouse genes.

Immunocytochemistry for neural markers

When cells reached the phase IV, the culture medium was discarded and the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes. After a wash with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), 1 mL per well of blocking solution (Fetal Bovine Serum and Bovine Serum Albumin) was added and the cells were incubated for one hour at room temperature. The cells were incubated at room temperature for two hours with Fluoropan Neuronal Marker (Chemicon) that contains anti-neuronal nuclei (NeuN), anti-neuronal cytoskeleton (NFL), anti-neuronal microtubule (MAP2) and anti-neuronal microtubule (β -tubulin III) antibodies FITC-conjugated diluted (1:100) in blocking solution to characterize the cytoarchitecture and neuronal polarization. After was added 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to 0.01% for nuclear staining. The culture were washed twice with DPBS buffer, and analyzed using a confocal microscope LSM-5 *exciter* (Zeiss). For quantitative analysis, 10 visual fields were randomly selected using objective lenses of 20X, respecting the minimum number of 20 cells marked with DAPI.

Cell proliferation assay

To evaluate cell proliferation during all phases of neurodifferentiation, 2×10^4 cells per well cells were cultivated and at the end of each neurodiferenciação phase (phase I to IV), cells were removed and the density was estimated by trypan blue exclusion method in Neubauer chamber.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA (PRISM software, Inc.) for Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple compararison post-test. Statistically significant results when considering $p < 0,05$.

RESULTS

The evaluation of co-cultivation of mouse fibroblasts with mesenchymal cells derived from umbilical cord blood include several approaches: mouse fibroblasts (NIH-3T3) alone (3T3), mononuclear cells from umbilical cord blood co-culture with NIH-3T3 but was not submitted to neurodifferentiation (CC-ND), only NIH-3T3 subjected to neurodifferentiation (3T3D), and mononuclear cells from umbilical cord blood co-culture with NIH-3T3 and submitted to neurodifferentiation, one culture for each patient (1 to 4) (PCT1, 2, 3, 4 F4).

Cell type domain on co-cultures

Co-cultures of fibroblasts with mononuclear cells purified from umbilical cord blood acquired more than 80% confluence after six days, and result in fibroblast cells domain over mononuclear cells as confirmed by the presence of mouse IL-2 gene and absence of human β -actin gene as shown on Figure 1.

Mesodermal differentiation

Adipogenic and osteogenic differentiation was induced according to Phinney et al. 1999 to confirm the differentiation of mesodermal cell lineage by positive Oil Red and Alizarin Red staining (Figure 2). All cells culture with adipogenic media were positive for Oil Red as can be observe by the characteristic cytoplasmic staining indicating the successful adipogenic differentiation. Also, cells cultivated with osteogenic differentiation media, have been stained with Alizarin red characterizing the presence of calcium deposits.

Pluripotency of co-cultured cells

The expression of *KLF4* gene was detected after co-culture of NIH-3T3 mouse fibroblasts for seven days with the umbilical cord blood mononuclear cells (Figure 3)

from all four patients (PCT1, 2, 3, 4 F4) before of neurodifferentiation. However, the transcripts for *Oct3/4* and *Sox2* genes were not detected by QT-PCR. When NIH-3T3 cell were in cultured alone, only the expression of the endogenous *IL-2* gene was detected.

Fluorescence immunocytochemistry

There was almost no labeling of the antibody to the fibroblast cells that did not pass by co-culture (3T3) (Figure 4) in cells that passed through the co-culture and not by protocol neurodifferentiation (CCND) (Figure 5) and in cells that did not pass by co-cultivation, but the protocol neurodifferentiation (3T3D) (Figure 6). The staining shown in groups co-cultured and neurodifferentiation were distributed throughout the cells, indicating the connection of the different set of antibodies used in the study (Figures 7,8,9 and 10), can be evidenced nuclear staining and along the cellular extensions, indicating that the fibroblasts began to express markers of differentiated neural structures when co-cultured with umbilical cord blood mononuclear cells and neurodifferentiation applied protocol.

For quantitative evaluation, we selected the parameters area, diameter, fractal dimension and optical density. When analyzing the parameter area (Figure 11), which indicates the quantification of spatial and two-dimensional surface of the cultures, the 3T3, CC-ND and 3T3D groups, showed statistically significant when compared to four groups and co-cultured and neurodifferentiation applied protocol (PCT 1,2,3,4)F4 ($p < 0.05$). In the analysis of the parameter diameter (Figure 11), 3T3, CC-ND and 3T3D groups, showed statistically significant results in relation to co-cultures and neurodifferentiation applied protocol ($p < 0.05$). Only the CC(ND) than in group PCT1F4, no statistically significant difference, because there was an increase in the diameter of the dial group CC(ND). The parameter fractal dimension (Figure 12), which show the level of irregularities in marking, results a statistical difference in three groups

tested in the three controls ($p < 0.05$), the PCT1F4 group the only that did not show results statistically significant compared to no control.

In assessing the optical density (Figure 13), which indicates the degree of intensity marking 3T3D group had statistically significant results ($p < 0.05$) compared with four groups of PCT (1,2,3,4)F4, the CC group and 3T3-DL only did not show statistically significant results when compared to group PCT1F4

Cell proliferation assay

Fibroblasts initially co-cultured for seven days with the cord blood mononuclear cells, cultured in DMEM for three days (3T3) had a population growth of 2×10^4 for $5,8 \times 10^4$. In neurodifferentiation protocol used, cells cultured for three days in medium supplemented with β -mercaptoethanol (IFI) grow by 2×10^4 for $7,4 \times 10^4$. These cells were re-cultivate for three days in DMEM/F12 medium (FIII) and grew by 2×10^4 for $7,3 \times 10^4$ and when grown for seven days in N5 medium supplemented with growth factors and neurotrophins (FIV) cells increased from 2×10^4 for $1,8 \times 10^4$ (figure 14)

DISCUSSION

The cell reprogramming can be obtained by several ways, including nuclear transfer, cell fusion of embryonic and somatic cell reprogramming by gene transfection (53, 54, 60, 61). Co-culture of fibroblasts with umbilical cord blood mononuclear cells for seven days can modulate fibroblasts plasticity. This culture period was sufficient for the fibroblasts domains of culture. The domain of fibroblast over with umbilical cord blood mononuclear cells observed in this study may be associated with the amount and adherence difficulty of mesenchymal cells present in umbilical cord blood, since these cells are extremely rare population, in a proportion of one every 10^8 cells of the umbilical cord blood mononuclear cells (18). Moreover, the exponential growth rate of mouse fibroblasts NIH 3T3 is of $22,5 \pm 2,5$ hours (62). Therefore this co-cultures using fibroblast are highly promising. Cell reprogramming and neurodifferentiation obtained in

this investigation were probably directly associated with fibroblasts and not as a consequence of cell fusion or amount of mesenchymal cells present in umbilical cord blood. Considering that PCR is a highly sensitive technique and can detect as low as 1% contamination level of co-cultivated cells, the data here obtained is very reliable (63-66).

The presence of KLF4 gene transcripts suggests that the co-culture promotes a cell reprogramming, although SOX2 and Oct3/4 genes transcripts were not detected. Indeed, KLF4 gene together with other genes (KLF2, KLF5, Oct4, Sox2 and Nanog) belong to the molecular circuit that are essential to pluripotent cells self-renewal. Data in the literature have shown that the KLF's gene family may play a different role maintaining the pluripotency of mice embryonic cells (67). Recently, the KLF gene family have received attention after the evidence that somatic cells can be reprogrammed into induced pluripotent cells, called iPS, by transfection of a cocktail of pluripotency genes, including the KLF4 gene. Takahashi and Yamanaka in 2006 (53) showed that a selection of 24 candidate genes promote pluripotency due to their important roles in the maintenance and identity of embryonic stem cell. The Oct3/4, Sox2, cMyc and KLF4 genes are essential and sufficient to promote pluripotency in adult fibroblasts. The KLFs and the OCT4, SOX2 and Nanog genes are strongly interconnected. KLF2, KLF4 and KLF5 genes activates Nanog expression, and OCT4 and SOX2 activates KLF2, KLF4 and KLF5 closing the transcription network. Moreover, OCT4, Nanog, and SOX3 share the same transcription factor (67-69). The presence of KLF4 transcripts detected after six days of co-culture could indicate that fibroblasts were starting the pluripotency process.

Mesodermal differentiation is one between the three minimum criteria established by International Society for Cellular Therapy (ISCT) to characterize mesenchymal lineage derived from any tissue (45). The mesodermal characterization of mesenchymal stem cells along with specific immunophenotype and adherence to plastic allows the distinction of mesenchymal stem cells from others. This

characterization has been described due to the large number of research involving mesenchymal stem cells in the last two decades and the great clinical interest to use these cells in order to establish a standard inclusion of mesenchymal lineage cells (45). Mesodermal differentiation can be considered an indication of pluripotent cells, and therefore the cells obtained in the present study are suited to this criterion. Moreover, levels of plasticity showed by our cultures were corroborated by the adipogenic and osteogenic differentiation obtained after co-cultivation, indicating that the fibroblasts acquired mesenchymal stem cells characteristics. Indeed, the mesenchymal stem cells and mature fibroblasts share several morphological and functional characteristics, even peculiar characteristics of adherence to plastic, positive immunophenotype for CD73 and CD75, negative for CD14, CD34, and CD45, and the differentiation into osteogenic and adipogenic lineage according to the classification established by ISCT (47, 48). Several similarities between the fibroblasts and mesenchymal stem cells have been described to date, the location of these cells in every organ of the body, the source being endothelial and epithelial, with the capacity to synthesize and remodel the extracellular matrix (49, 50).

The assessment of pluripotency genes and neurodiferenciação for mouse fibroblast NIH 3T3 have not been described in the literature. Characteristics of undifferentiated cells have been described to mature fibroblasts, for example in response to injury, mechanisms of tissue stress, inflammation, some fibroblasts are recruited to the wound site, proliferation to restore tissue homeostasis, and reduce inflammation in damage tissues (50, 51). However, repair by fibroblasts during continuing injuries can cause chronic inflammation and fibrosis formation (52). This fact differ from that characteristics associated with the mesenchymal stem cells roles in injured tissues (29). The adult fibroblasts may secrete factors such as FGF, KGF, LIF to cell survival, and immunomodulatory cytokines that are capable to suppres inflammatory sites, these are similar mechanisms associated with mesenchymal stem cells (30, 48, 71-74). In a recent comparison between fibroblasts and various adult

tissues, including mesenchymal stem cells, it was possible to show the similarity of the immunosuppressive potential of both cell lines in vitro (47, 73, 75).

After application of the neurodifferentiation protocol, fluorescent staining was observed in the cells that passed through the co-cultivation before neurodifferentiation for the antibody used. The results indicate that the co-culture is promoted reprogramming of differentiated fibroblast cells able to express specific neuronal markers after application of a neurodifferentiation protocol.

The present study pointed to need of co-cultivation to neurodifferentiate fibroblasts. Cultures belonging to 3T3D group indicate that the co-culture is related to the positive outcome of neural markers after neurodifferentiation, because fibroblasts that were not co-cultured with mononuclear cells showed a lower labeling profile. The CCND group indicates that only the co-culture is not sufficient to promote neural cells, indicating that reprogramming cells to neural differentiation also requires specific factors.

The analysis of immunofluorescence labeling parameters such as the area, diameter, optical density and fractal dimension of the four different umbilical cord cultures have shown that PCT1F4 group did not have similar outcome. This fact may be related to cells heterogeneity in the mononuclear cells pool, gestational age (77) and the intrinsic and extrinsic factors that can influence the maintenance of these cells, such as aging, and use of chemicals by the mother (78, 79).

Fibroblasts co-cultured with umbilical cord blood mononuclear cells showed standard population growth. Cells have shown the same population doubling at all neurodifferentiation stages, except during the last phase when key factors were used to promote neurodifferentiation. In this scenario, cells that reached the last phase of the neurodifferentiation become behave like neural cells regarding with low rates of cell division. Thus, one can suppose that the reprogrammed fibroblasts attenuate the rate cell division according to differentiation direction, in this case neural lineage, leading to a behavior with features of nerve cells.

The paracrine mechanisms associated with cell therapy with stem cells, it its well known and the injury can be attenuated due to different endogenous factors associated with local or systemic application of stem cells. The paracrine factors with potential to improve the general state of a specific injury or tissue recovery in different lesions associated with stem cells described up to date are: immunomodulatory effect, anti-apoptotic, pro-angiogenic effect, quimioatrator effect, anti-fibrosis and support the growth and differentiation of endogenous progenitor cells (29, 30). These effects have been described based on *in vitro* experiments. Here, the differentiation of co-cultured fibroblasts induced by soluble factors to the neuronal lineage was confirmed by immunofluorescence, showing statistically significant results, featuring a differentiation potential of cells co-cultured with mononuclear fraction of umbilical cord. A new mechanism of action of stem cells may be associated with these findings since the undifferentiated cells were reprogrammed to a higher level of plasticity and subsequently differentiated to a distinct lineage. In a lesion site the administered stem cells could promote residing adult cells reprogramming, with potential for subsequent tissue regeneration, not by recruiting local progenitor cells, but also promoting regeneration of adult cells that could differentiated in the peripheral zone of the lesion. This mechanism could be linked to those already described as another possible effect of stem cells in the processes of tissue regeneration and treatment of diseases of various orders. The findings in our experiments and further investigations will be valuable to confirm a novel cell reprogramming mechanism that could play a role on the therapeutic effects associated with adult stem cells. Therefore, we postulate a new hypothesis of mechanism that is being elucidated to corroborate the stem cells mediating effects.

REFERENCES

1. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):143-55.
2. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007 Apr;211(1):27-35.
3. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):41-9.
4. Streckfuss-Bomeke K, Vlasov A, Hulsmann S, Yin D, Nayernia K, Engel W, et al. Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germ-line stem cells. *Stem Cell Res*. 2009 Mar;2(2):139-54.
5. Chua SJ, Bielecki R, Wong CJ, Yamanaka N, Rogers IM, Casper RF. Neural progenitors, neurons and oligodendrocytes from human umbilical cord blood cells in a serum-free, feeder-free cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 6;379(2):217-21.
6. Koh SH, Kim KS, Choi MR, Jung KH, Park KS, Chai YG, et al. Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. *Brain Res*. 2008 Sep 10;1229:233-48.
7. Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S336-44.
8. Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*. 1999 Jul 30;285(5428):754-6.
9. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001 Dec;19(12):1134-40.
10. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2000 Jun;18(6):675-9.
11. Jurga M, Markiewicz I, Sarnowska A, Habich A, Kozłowska H, Lukomska B, et al. Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. *J Neurosci Res*. 2006 Mar;83(4):627-37.
12. Gordon D, Scolding NJ. Human mesenchymal stem cell culture for neural transplantation. *Methods Mol Biol*. 2009;549:103-18.
13. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci*. 2004 Sep 1;117(Pt 19):4411-22.
14. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980 Aug;56(2):289-301.
15. Kobylka P, Ivanyi P, Breur-Vriesendorp BS. Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation*. 1998 May 15;65(9):1275-8.
16. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001 Oct;86(10):1099-100.
17. Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, et al. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol*. 2001 Sep;171(1):109-15.
18. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*. 2010 Aug 26;2(4):81-92.

19. Momin EN, Mohyeldin A, Zaidi HA, Vela G, Quinones-Hinojosa A. Mesenchymal Stem Cells: New Approaches for the Treatment of Neurological Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*. Jun 9.
20. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):381-90.
21. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
22. Dexter TM, Wright EG, Krizsa F, Lajtha LG. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine*. 1977 Dec;27(9-10):344-9.
23. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):841-6.
24. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011 Feb 28;6:457-78.
25. Chan WK, Lau AS, Li JC, Law HK, Lau YL, Chan GC. MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. *Exp Hematol*. 2008 Nov;36(11):1545-55.
26. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):229-30.
27. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):341-7.
28. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.
29. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006 Aug 1;98(5):1076-84.
30. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Oct-Dec;20(5-6):419-27.
31. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005 May;35(5):1482-90.
32. Lanz TV, Opitz CA, Ho PP, Agrawal A, Lutz C, Weller M, et al. Mouse mesenchymal stem cells suppress antigen-specific TH cell immunity independent of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). *Stem Cells Dev*. 2010 May;19(5):657-68.
33. Karlsson H, Samarasinghe S, Ball LM, Sundberg B, Lankester AC, Dazzi F, et al. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):532-41.
34. Meirelles Lda S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci*. 2009;14:4281-98.
35. Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2009 Jan;27(1):238-49.
36. Li L, Zhang S, Zhang Y, Yu B, Xu Y, Guan Z. Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. *Mol Biol Rep*. 2009 Apr;36(4):725-31.
37. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol*. 1996 Mar;166(3):585-92.
38. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998 Jul;176(1):57-66.

39. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006 Dec;25(6):977-88.
40. Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*. 2006 Dec 13;26(50):13007-16.
41. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004 Mar 30;109(12):1543-9.
42. Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells*. 2007 Sep;25(9):2363-70.
43. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A*. 2009 Jul;15(7):1751-61.
44. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997 Aug 1;90(3):909-28.
45. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
46. Cleary EG, Gibson MA. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. *Int Rev Connect Tissue Res*. 1983;10:97-209.
47. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol*. 2007 Aug 1;179(3):1595-604.
48. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009 Feb;94(2):258-63.
49. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Sep;72(3):283-92.
50. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. 2007 Feb;21(2):325-32.
51. Ariel A, Serhan CN. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol*. 2007 Apr;28(4):176-83.
52. Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest*. 2003 Dec;83(12):1689-707.
53. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
54. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997 Feb 27;385(6619):810-3.
55. Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J*. 1997 Nov 3;16(21):6510-20.
56. Rajasingh J, Lambers E, Hamada H, Bord E, Thorne T, Goukassian I, et al. Cell-free embryonic stem cell extract-mediated derivation of multipotent stem cells from NIH3T3 fibroblasts for functional and anatomical ischemic tissue repair. *Circ Res*. 2008 Jun 6;102(11):e107-17.
57. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008 Jan;26(1):101-6.
58. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999 Mar 15;72(4):570-85.

59. Song S, Sanchez-Ramos J. Preparation of neural progenitors from bone marrow and umbilical cord blood. *Methods Mol Biol.* 2008;438:123-34.
60. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science.* 2005 Aug 26;309(5739):1369-73.
61. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol.* 2001 Oct 2;11(19):1553-8.
62. Carrino D, Gershman H. Division of BALB/c mouse 3T3 and simian virus 40-transformed 3T3 cells in cellular aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Sep;74(9):3874-8.
63. Wang H, Kong F, Jelfs P, James G, Gilbert GL. Simultaneous detection and identification of common cell culture contaminant and pathogenic mollicutes strains by reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Mar;70(3):1483-6.
64. Eldering JA, Felten C, Veilleux CA, Potts BJ. Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals.* 2004 Dec;32(4):183-93.
65. Volokhov DV, Kong H, George J, Anderson C, Chizhikov VE. Biological enrichment of Mycoplasma agents by cocultivation with permissive cell cultures. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Sep;74(17):5383-91.
66. Steinberg S, Katsanis S, Moser A, Cutting G. Biochemical analysis of cultured chorionic villi for the prenatal diagnosis of peroxisomal disorders: biochemical thresholds and molecular sensitivity for maternal cell contamination detection. *J Med Genet.* 2005 Jan;42(1):38-44.
67. Bourillot PY, Savatier P. Kruppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol.* 2010;8:125.
68. Jiang J, Chan YS, Loh YH, Cai J, Tong GQ, Lim CA, et al. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2008 Mar;10(3):353-60.
69. Bourillot PY, Aksoy I, Schreiber V, Wianny F, Schulz H, Hummel O, et al. Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells.* 2009 Aug;27(8):1760-71.
70. Schulz H, Kolde R, Adler P, Aksoy I, Anastassiadis K, Bader M, et al. The FunGenES database: a genomics resource for mouse embryonic stem cell differentiation. *PLoS One.* 2009;4(9):e6804.
71. Korn JH. Modulation of lymphocyte mitogen responses by cocultured fibroblasts. *Cell Immunol.* 1981 Sep 15;63(2):374-84.
72. Sarkhosh K, Tredget EE, Li Y, Kilani RT, Uludag H, Ghahary A. Proliferation of peripheral blood mononuclear cells is suppressed by the indoleamine 2,3-dioxygenase expression of interferon-gamma-treated skin cells in a co-culture system. *Wound Repair Regen.* 2003 Sep-Oct;11(5):337-45.
73. Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol.* 2007 Sep 1;179(5):2824-31.
74. Le JM, Vilcek J. Accessory function of human fibroblasts in mitogen-stimulated interferon-gamma production by T lymphocytes. Inhibition by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1987 Nov 15;139(10):3330-7.
75. Bocelli-Tyndall C, Barbero A, Candrian C, Ceredig R, Tyndall A, Martin I. Human articular chondrocytes suppress in vitro proliferation of anti-CD3 activated peripheral blood mononuclear cells. *J Cell Physiol.* 2006 Dec;209(3):732-4.
76. Alt E, Yan Y, Gehmert S, Song YH, Altman A, Vykoukal D, et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell.* 2011 Apr;103(4):197-208.
77. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000 Apr;109(1):235-42.

78. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9194-9.
79. Hardy RR, Wei CJ, Hayakawa K. Selection during development of VH11+ B cells: a model for natural autoantibody-producing CD5+ B cells. *Immunol Rev*. 2004 Feb;197:60-74.
80. Momin EN, Mohyeldin A, Zaidi HA, Vela G, Quinones-Hinojosa A. Mesenchymal stem cells: new approaches for the treatment of neurological diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010 Dec 1;5(4):326-44.
81. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
82. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7634-8.
83. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

ACKNOWLEDGEMENTS (FINANCIAL SUPPORT)

CNPQ - Counsel of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil

CCB – Cryogenesis Brazil Center (Centro de Criogenia Brasil), Brazil.

TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: PCR products for the mouse IL-2 and human β -actin after electrophoresis on 2% agarose gel. Mar: molecular weight marker 100 bp; β -act: human β -actin gene; CR: Control of the reaction without DNA; IL-2: mouse IL-2 gene.

Figure 2: Image capture of mesodermal differentiation. A: adipogenic differentiation characterized by staining Oil Red. B: osteogenic differentiation characterized by staining Alizarin Red.

Figure 3: PCR products for KLF-4 gene after electrophoresis on 2% agarose gel. Marc: molecular weight marker 100 bp; 3T3: KLF-4 amplicon for fibroblasts without co-cultivation; PCT 1, 2, 3 and 4 F4: KLF-4 amplicon for fibroblasts co-cultured with mononuclear fraction of umbilical cord blood of four patients.

Figure 4: Image capture of 3T3 group by confocal microscopy. DAPI: nuclear staining; FITC: FluoroPan Neuronal; MERGE: co-location of the images.

Figure 5: Image capture of 3T3D group by confocal microscopy. DAPI: nuclear staining; FITC: FluoroPan Neuronal; MERGE: co-location of the images.

Figure 6: Image capture of CC(ND) group by confocal microscopy. DAPI: nuclear staining; FITC: FluoroPan Neuronal; MERGE: co-location of the images.

Figure 7: Image capture of PCT1F4 group by confocal microscopy. DAPI: nuclear staining; FITC: FluoroPan Neuronal; MERGE: co-location of the images.

Figure 8: Image capture of PCT2F4 group by confocal microscopy. DAPI: nuclear staining; FITC: FluoroPan Neuronal; MERGE: co-location of the images.

Figure 9: Image capture of PCT3F4 group by confocal microscopy. DAPI: nuclear staining; FITC: FluoroPan Neuronal; MERGE: co-location of the images

Figure 10: Image capture of PCT4F4 group by confocal microscopy. DAPI: nuclear staining; FITC: FluoroPan Neuronal; MERGE: co-location of the images

Figure 11: Histogram represent the area values. (*: 3T3 vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4; +: CC(ND) vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4; #: 3T3D vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4).

Figure 12: Histogram represent the diameter values. (*: 3T3 vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4; +: CC(ND) vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4; #: 3T3D vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4).

Figure 13: Histogram represent the optical density values. (*: 3T3 vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4; +: CC(ND) vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4; #: 3T3D vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4).

Figure 14: Histogram represent the fractal dimension values. (*: 3T3 vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4; +: CC(ND) vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4; #: 3T3D vs. PCT1, 2, 3 and 4 F4).

Figure 14: Histogram of cell growth during neurodifferentiation protocol. 3T3: fibroblasts cultured for three days in DMEM; FII, FIII and FIV: fibroblasts after co-cultivation in the different neurodifferentiation phases.

FIGURES

Figure 1

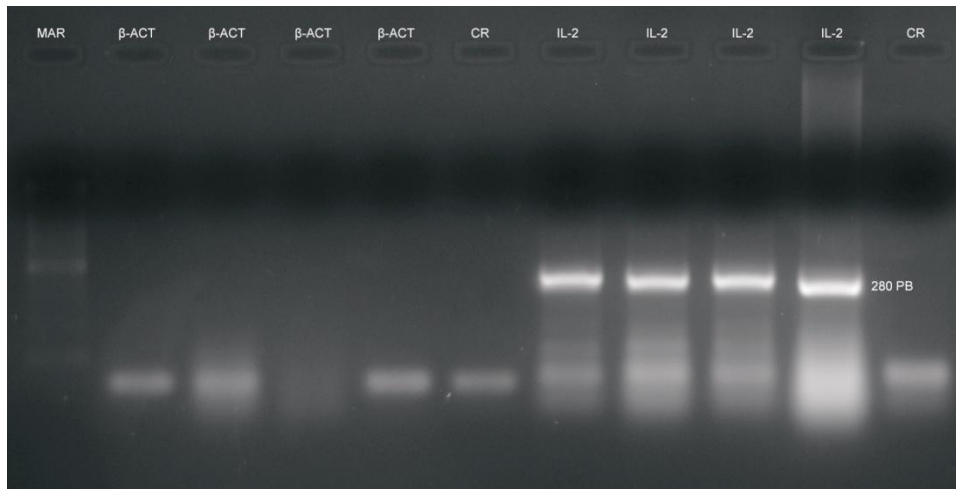


Figure 2

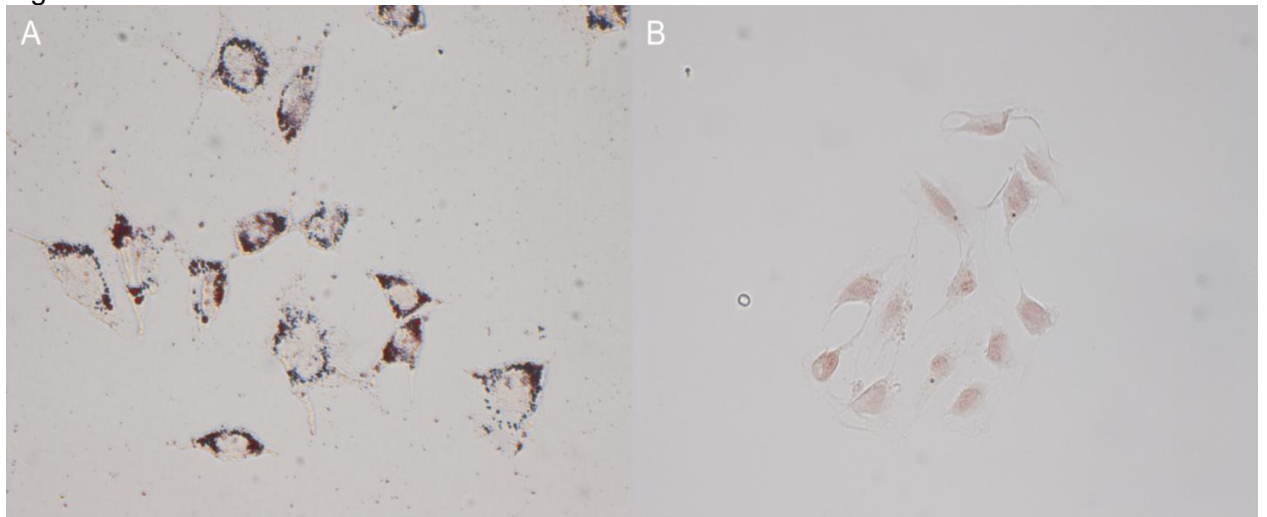


Figure 3

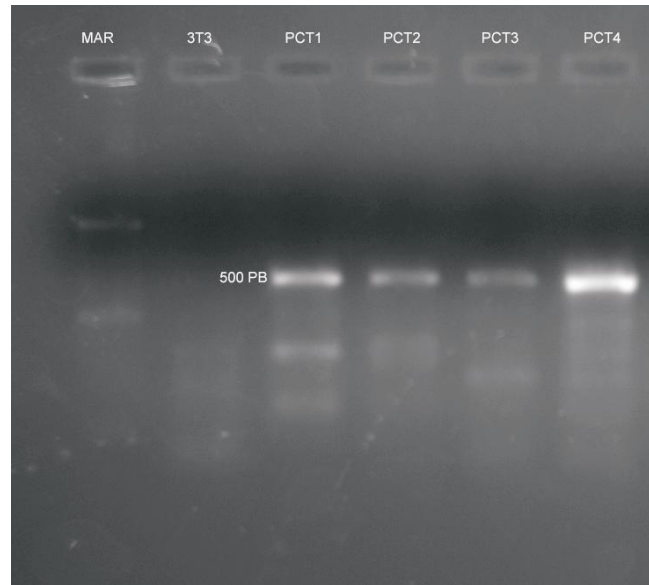


Figure 4

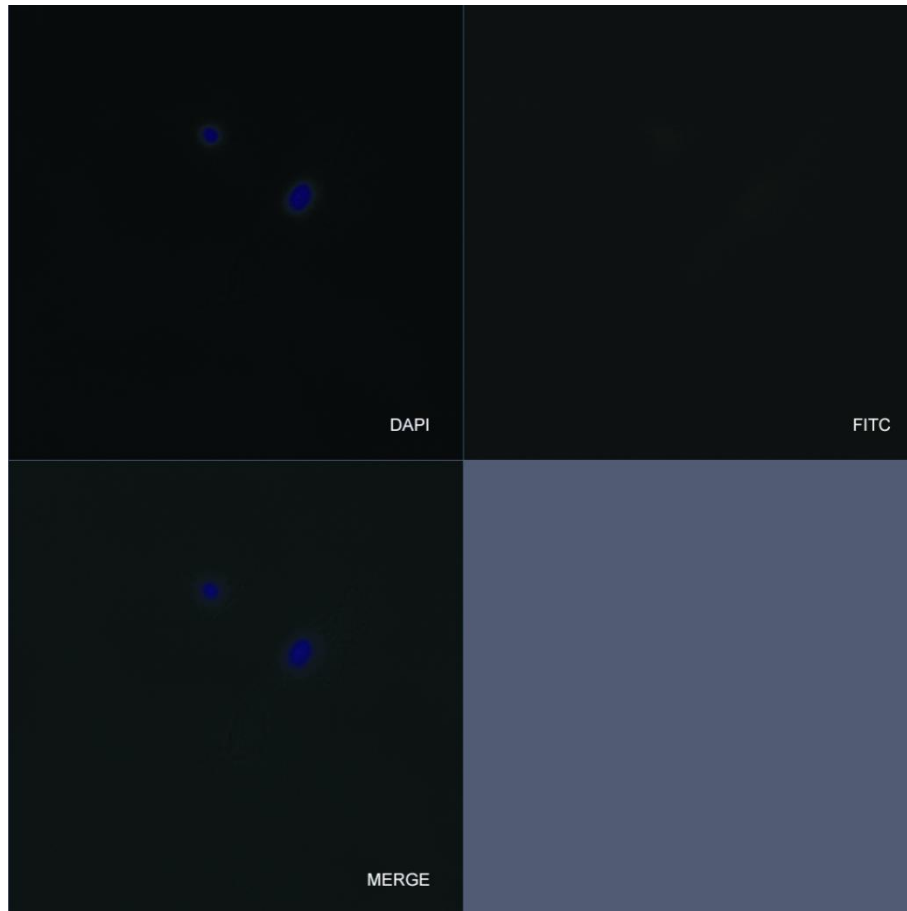


Figure 5

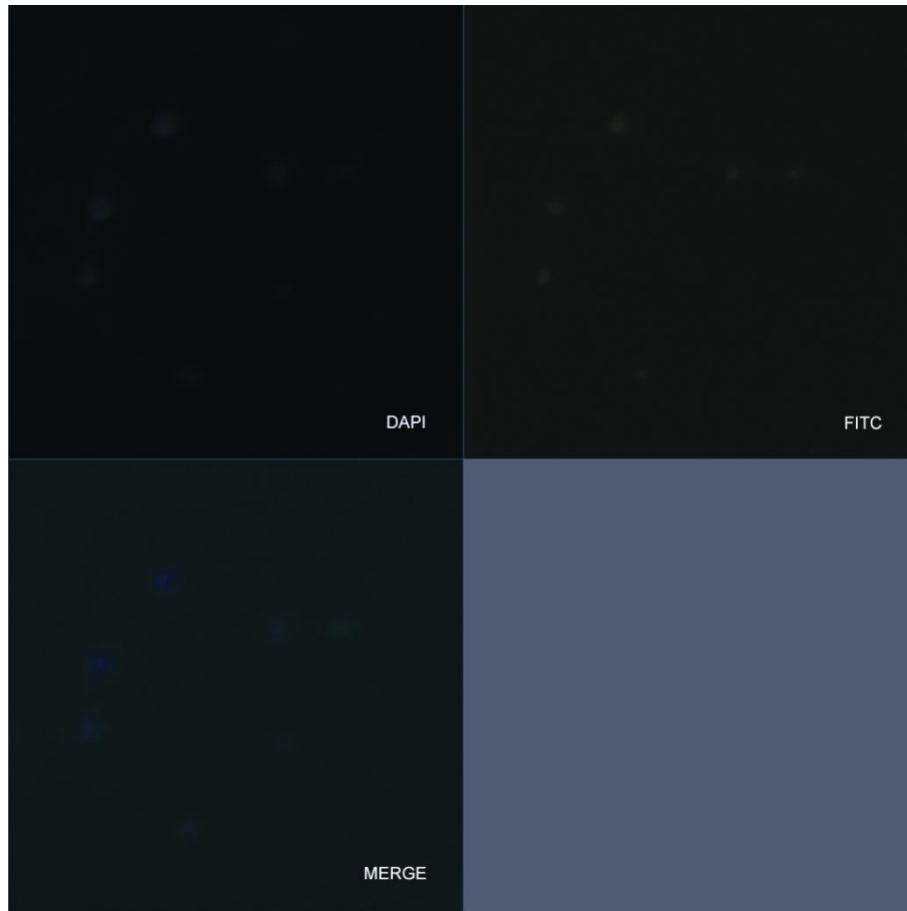


Figure 6

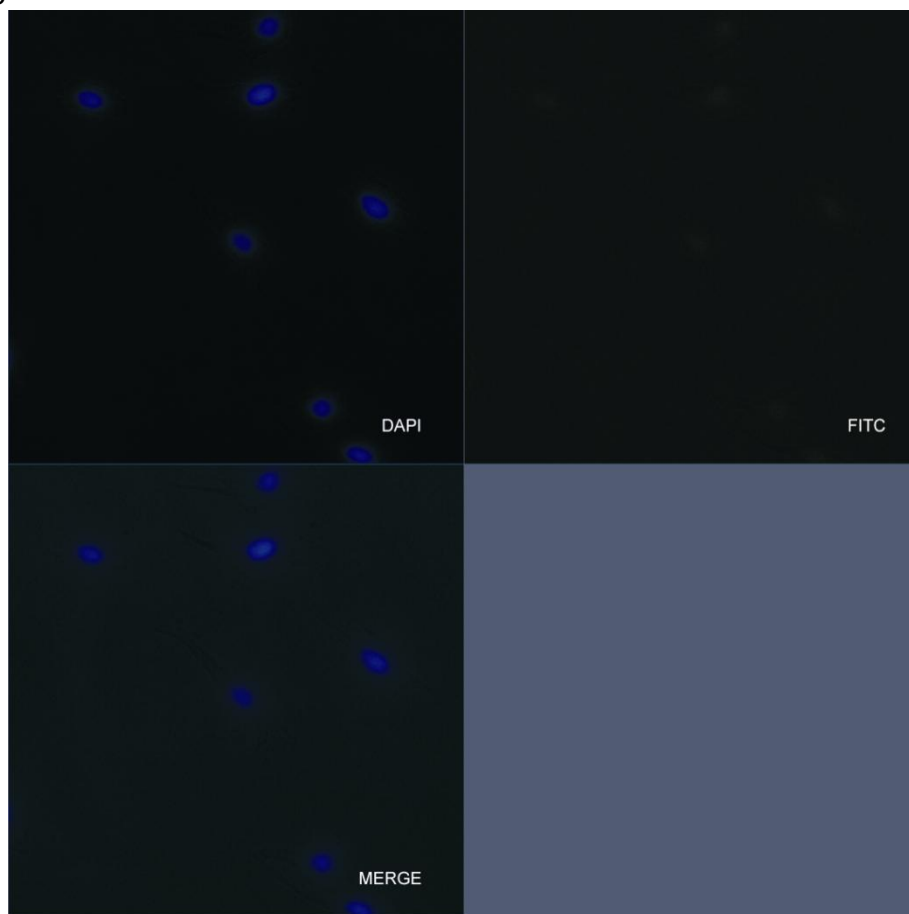


Figure 7

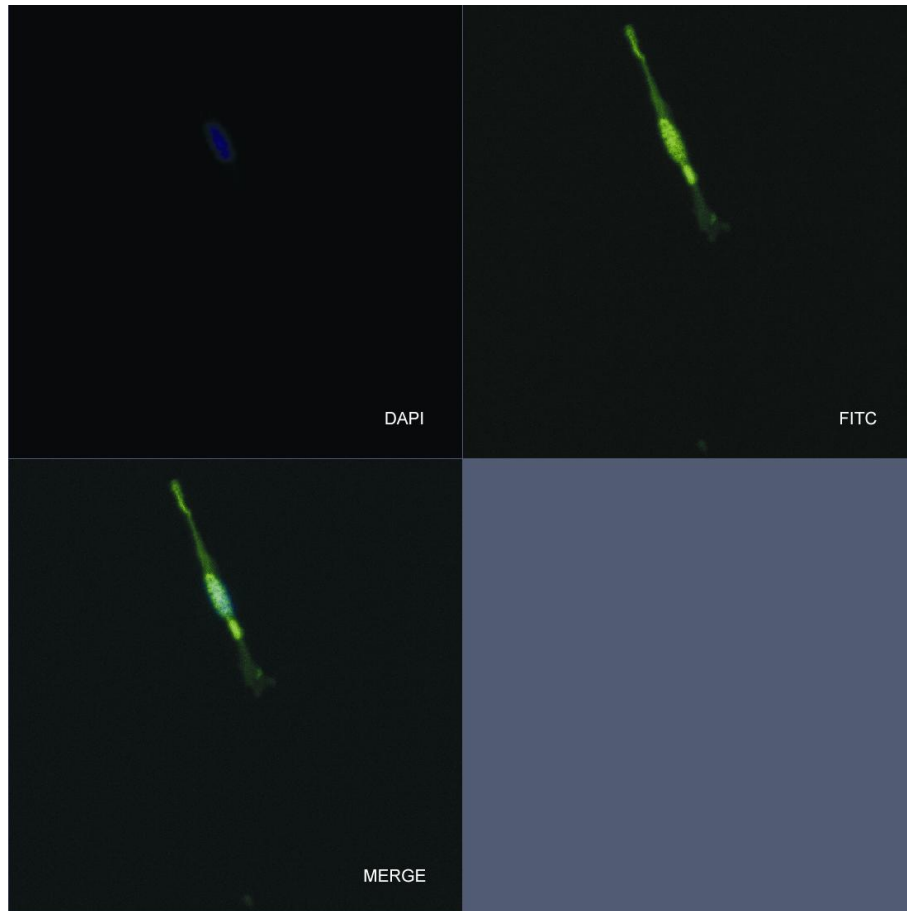


Figure 8

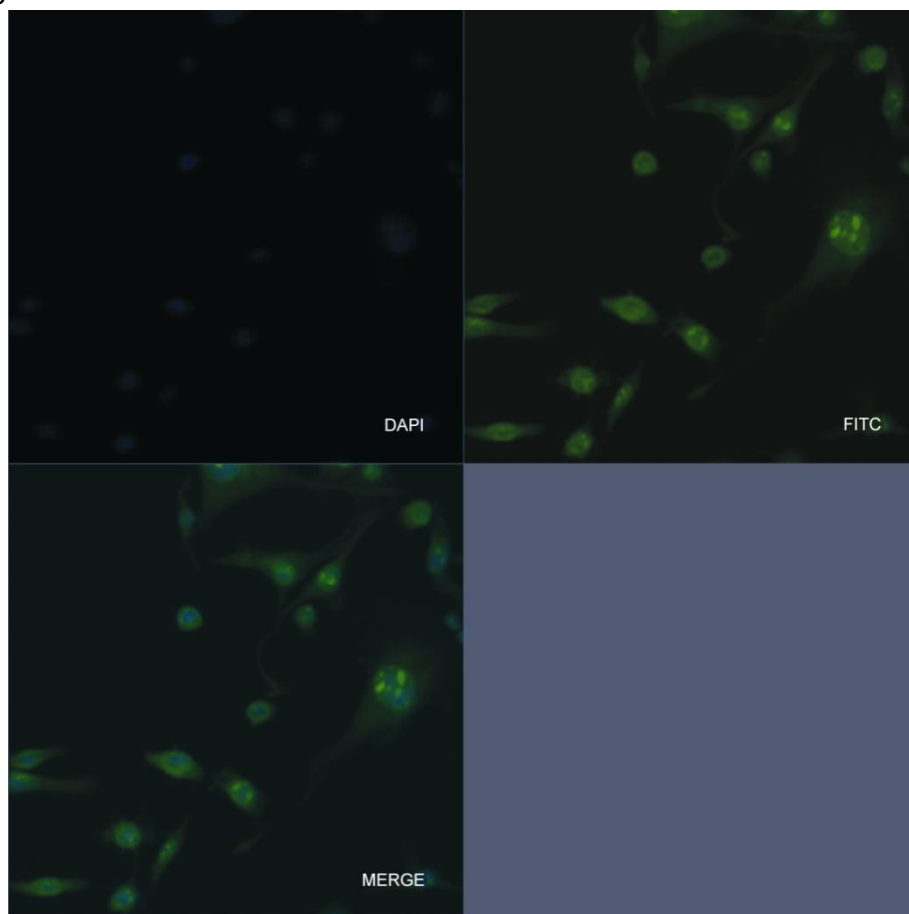


Figure 9

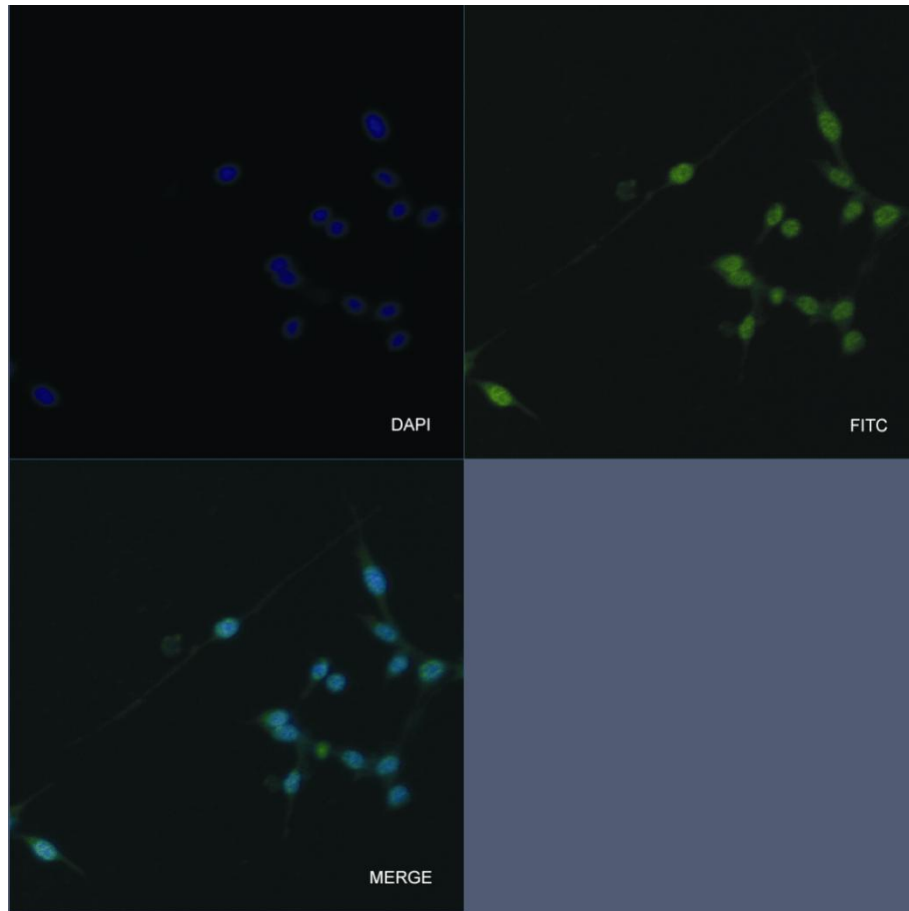


Figure 10

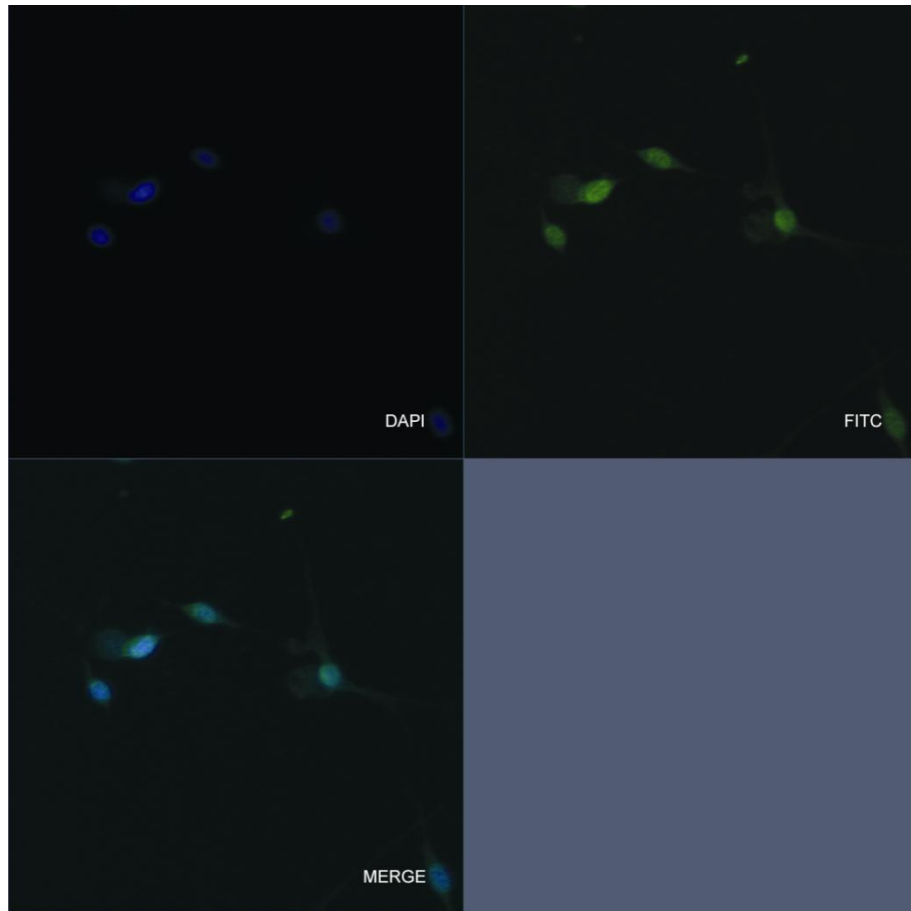


Figure 11

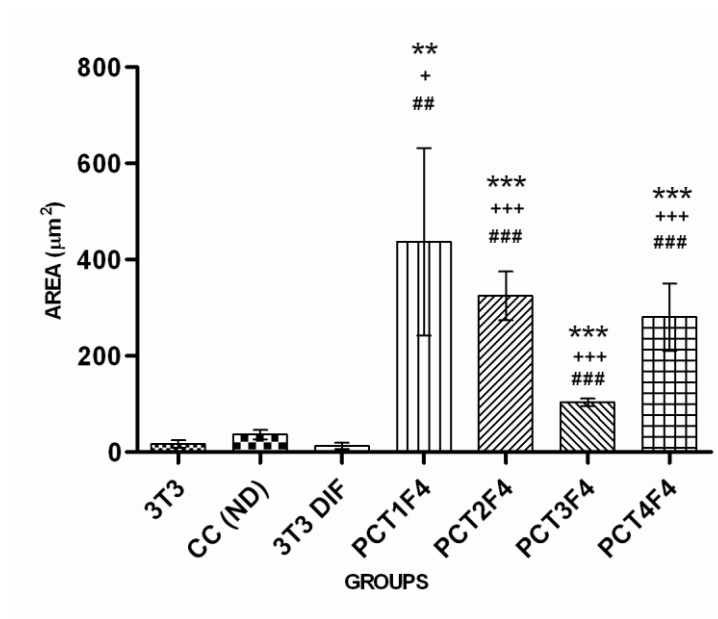


Figure 12

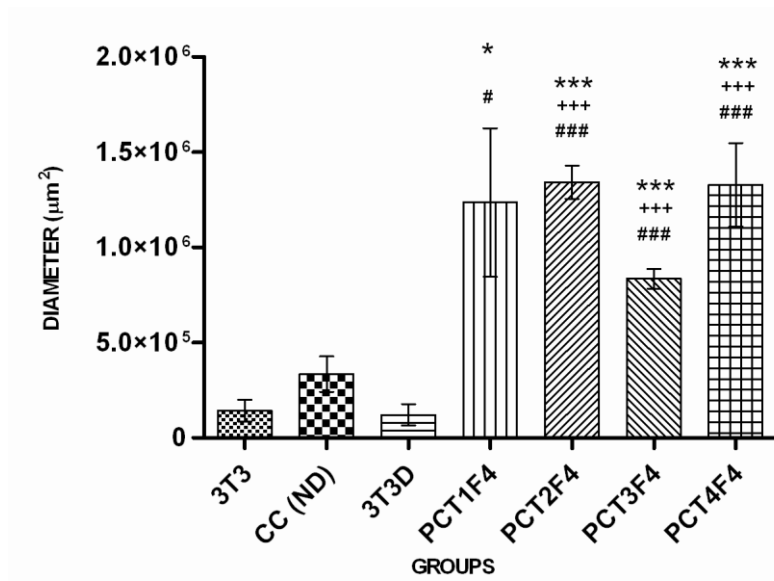


Figura 13

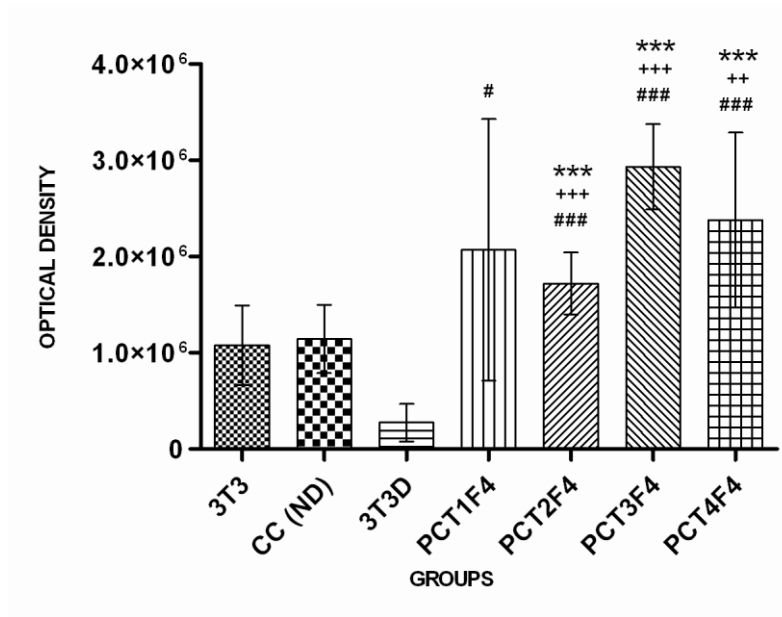


Figure 14

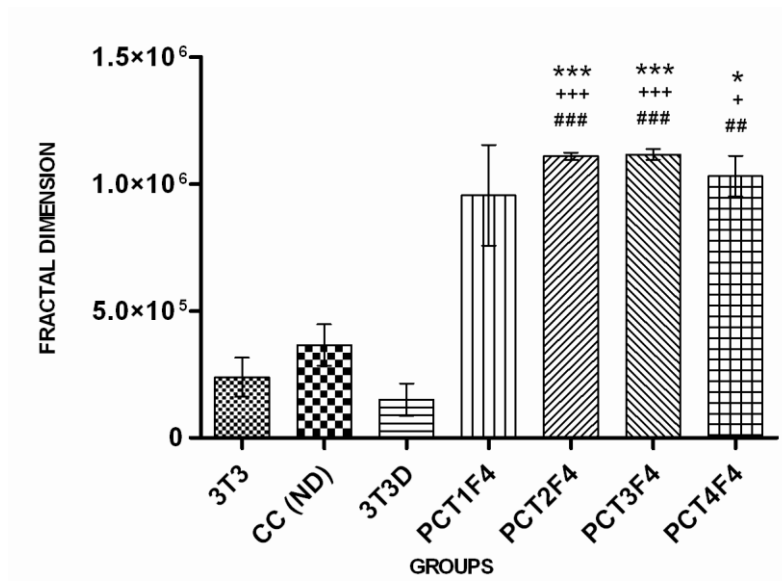


Figure 15

