

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA ORIGA ALVES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DO SANGUE MENSTRUAL**

**CURITIBA
2012**

ANA CAROLINA ORIGA ALVES



**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DO SANGUE MENSTRUAL**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Biologia Celular como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dra. Célia Regina C. Franco
Co-orientador: Dr. Alejandro Correa Dominguez

**CURITIBA
2012**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Osvaldo e Edna, por todo amor, carinho, apoio e paciência. Por sempre estarem por perto nos bons, e nos nem tão bons, momentos e pelo suporte oferecido, que me permitiu chegar até aqui. À minha irmã Amanda, por me agüentar todos os dias, mesmo quando meu humor não está dos melhores, por ser minha companheira em dias sem almoço, por me contar piadinhas sem graça e por me mostrar vídeos com menos graça ainda.

Aos meus preferidos, amigos e companheiros de curso. À Maria Rosa pela paciência em todas as conversas, pelos momentos de emoção nas vésperas de trabalhos e provas, pela companhia em comidas porcaria. Ao Fabiano por sempre estar disposto a ajudar nos momentos de prova e nos meus (quase) problemas. À Fernanda pela companhia em bares, cantina do politécnico e casas de doce, por todas as caronas e também por ser pessoa mais simpática e sociável do grupo. Ao Marcos, cara, por ter mudado o rumo da minha vida com a frase de uma música (sério!!!), por sempre levar prejuízos monetários nos programas super legais que eu escolho, por todas as conversas in-ter-mi-ná-veis, por toda preocupação e pelas piadinhas nos momentos mais difíceis.

Aos demais companheiros de curso: Thalita, Karin e Nádia. Aos amigos do colégio: Carla, Liliane, Gisele, Luana, Nakano, Artur, Diomar, Kazu. Às minhas amigas Fabi e Priscyla que sabem que nada mudou com tempo. Ao Tiago, meu ex-companheiro de curso e quase vizinho, a pessoa mais batalhadora eu conheço, sempre atencioso e disposto a conversar.

Às primas-irmãs: Sabrina, Bia e, em especial, à Laís, minha companheira de alegrias, tristezas e pobreza. Por todas as histórias, por agüentar meus desabafos. Minha BFF, desde que ela me empurrou da escada!

Às instituições Universidade Federal do Paraná e Instituto Carlos Chagas pela formação acadêmica e apoio no desenvolvimento do projeto.

Ao pessoal do preparo, Nilson, Silvio, Tânia e Vanessa, pelo preparo de soluções e material.

Ao Marco e a Ale pela ajuda com o citômetro, à Jaiesa e à Patrícia pela ajuda com as análises. A minha orientadora Jai (novamente), por toda a orientação desde o início, sobre o que ler e onde procurar, por sempre acompanhar o desenvolvimento do trabalho, pela ajuda com os gráficos e tabelas, enfim, toda a

ajuda no desenvolvimento do projeto. Ao Alejandro que foi muito atencioso ao me receber no ICC e me oferecer uma oportunidade de estágio. Aos demais pesquisadores e colegas do LABCET, Bruno, Ana Paula, Andressa, Anny, Axel, Crisciele e Giullia, pela ajuda com os artigos e apresentações, e também pelos momentos de descontração.

À profª Célia Regina, sempre muito atenciosa, por ter aceitado me orientar na UFPR.

Às instituições que apoiaram financeiramente, Fiocruz, Fundação Araucária e CNPq.

Enfim, a todos que me ajudaram de alguma forma a realizar este projeto, muito obrigada!!

RESUMO

Isolamento e caracterização de Células-tronco mesenquimais do sangue menstrual

Células-tronco (CTs) são células não especializadas, autorrenováveis e que podem originar múltiplos tipos celulares de todos os tecidos do organismo. As CTs adultas contribuem para manutenção e regeneração tecidual. Entre outras características, a multipotencialidade torna estas células uma ferramenta terapêutica atraente capaz de ter um papel importante em uma ampla gama de aplicações clínicas no contexto de terapias celular e gênica. Porém, alguns tipos de CTs não podem ser obtidos por métodos práticos, considerando a relação custo-benefício, nem podem ser facilmente transferidos para uso clínico. Métodos pouco invasivos para a coleta de material e posterior isolamento de CTs são preferidos para o uso em terapias. As células derivadas de sangue menstrual humano oferecem importantes vantagens, pois são obtidas por um procedimento simples, seguro e indolor e podem ser eficientemente expandidas *in vitro*. O sangue e tecidos desprendidos contêm uma população heterogênea de células incluindo algumas com capacidade regenerativa. Considerando o uso em potencial das células-tronco mesenquimais do sangue menstrual, o presente trabalho visa estabelecer o isolamento, o cultivo e a caracterização de células obtidas do sangue menstrual humano. Dados preliminares indicam que as células isoladas através do protocolo descrito neste trabalho correspondem imunofenotipicamente e funcionalmente a células-tronco mesenquimais (CTMs). Deste modo, uma nova fonte de CTMs poderá ser utilizada nas pesquisas do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz-PR.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, sangue menstrual, isolamento, caracterização.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Multipotencialidade das células-tronco mesenquimais.....	13
Figura 2 – Fluxograma do processamento das amostras de sangue menstrual.....	34
Figura 3 - Análise da morfologia celular de culturas de células isoladas do sangue menstrual em diferentes passagens por microscopia de contraste de fase	35
Figura 4 - Análise da densidade celular após confluência.....	35
Figura 5 - Aspecto da cultura de células isoladas de sangue menstrual quando em monocamadas compactas por microscopia de contraste de fase.....	36
Figura 6 - Curva de crescimento de células isoladas de sangue menstrual.....	37
Figura 7 - Ensaio de ciclo celular de células isoladas de sangue menstrual.....	38
Figura 8 - Análise da expressão de marcadores de CTMs.....	39
Figura 9 - Células isoladas de sangue menstrual induzidas à adipogênese marcadas com <i>Oil Red O</i>	40
Figura 10 - Células isoladas de sangue menstrual induzidas à osteogênese marcadas com <i>Alizarin Red S</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados pessoais e informações relativas à coleta das amostras.....	32
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CTs - Células-tronco

CTAs - Células-Tronco Adultas

CTEs - Células-Tronco Embrionárias

CTMs - Células-Tronco Mesenquimais

CTMs-SM - Células-Tronco Mesenquimais do Sangue Menstrual

CTs-SM - Células-Tronco derivadas do Sangue Menstrual

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

PBS - Phosphate Buffered Saline

SFB - Soro Fetal Bovino

TA – Temperatura Ambiente

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- percentual
μm	- micrometro
cm^2	- centímetro quadrado
g	- grama
M	- molar ou mol/L
mg	- miligrama
mg/mL	- miligrama por mililitro
μg	- micrograma
$\mu\text{g/mL}$	- micrograma por mililitro
μM	- micromolar
min.	- minuto(s)
mL	- mililitro
mM	- milimolar
$^{\circ}\text{C}$	- graus celsius
pH	- potencial hidrogeniônico
rpm	- rotações por minutos
U/mL	- Unidades por mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Células-tronco mesenquimais.....	15
2.2 Células-tronco derivadas do sangue menstrual.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Geral.....	20
3.2 Específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Preparo de materiais, soluções e meios de cultura.....	21
4.1.1 Solução A.....	21
4.1.2 Solução B	21
4.1.3 Solução C.....	21
4.1.4 Solução D.....	22
4.1.5 Solução E.....	22
4.1.6 BSS.....	22
4.1.7 BSS.CMF.....	22
4.1.8 PS 100 x.....	23
4.1.9 Soro Fetal bovino	23
4.1.10 Meio F12.....	23
4.1.11 Meio DMEM	24
4.1.12 BSA 5%	24
4.1.13 L-glutamina 200 mM.....	24
4.1.14 EDTA.2H ₂ O	24
4.1.15 Tripsina 0,05%/EDTA 0,02%.....	25
4.1.16 Solução de Paraformaldeído 4%.....	25
4.1.17 Tampão hemolítico.....	26
4.1.18 Alizarin Red S.....	26
4.1.19 Oil Red O.....	26
4.2 Coleta de sangue menstrual.....	27
4.3 Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue menstrual.....	27

4.4 Ensaio de ciclo celular.....	28
4.5 Curva de crescimento e cálculo do tempo de duplicação.....	29
4.6 Caracterização das células por imunofenotipagem.....	29
4.7 Caracterização funcional da linhagem mesenquimal.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Coleta de sangue menstrual.....	32
5.2 Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue menstrual.....	33
5.3 Curva de crescimento e cálculo do tempo de duplicação.....	36
5.4 Ensaio de ciclo celular.....	37
5.5 Caracterização das células por imunofenotipagem.....	38
5.6 Caracterização funcional da linhagem mesenquimal.....	40
6. CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICES.....	49
ANEXOS.....	54

1. INTRODUÇÃO

Células-tronco (CTs) são células não especializadas, autorrenováveis e que podem originar múltiplos tipos celulares de todos os tecidos do organismo (Passier & Mummery, 2003). A CT se divide assimetricamente para produzir duas células-filhas com diferentes destinos: uma célula permanece com o potencial de célula-tronco e irá manter o *pool* de células-tronco, a outra se torna um progenitor comprometido com a diferenciação (Watt & Hogan, 2000).

As CTs podem ser derivadas do embrião, constituindo as chamadas células-tronco embrionárias (CTEs), do feto ou do adulto, estas duas últimas chamadas de células-tronco adultas (CTAs) ou somáticas.

As CTEs são derivadas da massa celular interna do blastocisto. Essas células possuem a vantagem de ser pluripotentes, ou seja, são capazes de formar todos os tipos celulares do embrião e tecidos do corpo, exceto anexos embrionários (Wagers & Weissman, 2004). Porém, apresentam restrições éticas e a possibilidade de formação de teratomas pós-transplante (Trounson, 2002).

As CTAs apresentam uma capacidade mais restrita de diferenciação e são consideradas multipotentes. Estas células existem para assegurar que quando as células nos tecidos naturalmente expirem, elas possam ser eficientemente substituídas para proporcionar o balanço fisiológico no organismo. Além disso, servem como células de reserva para tecidos adultos comprometidos ou danificados que requerem regeneração, reparo ou expansão mais extensos (Caplan & Dennis, 2006).

CTs também possuem efeitos tróficos nas células de sua vizinhança. Nem sempre as próprias CTs se diferenciam em determinado tipo celular, porém fatores secretados por elas podem ter resultado no tecido funcional (Caplan & Dennis, 2006). Deste modo, as CTAs contribuem não só para manutenção, mas também regeneração tecidual (da Silva Meirelles *et al.*, 2006).

Entre as diferentes populações de CTAs estão as chamadas células-tronco mesenquimais (CTMs). CTMs foram originalmente isoladas e caracterizadas baseadas na sua habilidade de se diferenciar em células de origem mesenquimal (Wagner *et al.*, 2009). Já foi relatada a diferenciação *in vitro* de CTMs em células das linhagens ectodérmica e endodérmica (Figura 1), porém isso poderia ser uma

conseqüência da cultura de células, em vez de representar um potencial intrínseco de diferenciação *in vivo* (citado por da Silva Meirelles *et al.*, 2008). Embora sejam radicalmente distintos conceitualmente e experimentalmente, o potencial espontâneo de diferenciação e a capacidade de resposta para reprogramação são características biológicas igualmente importantes de uma determinada célula, (Bianco, 2011).

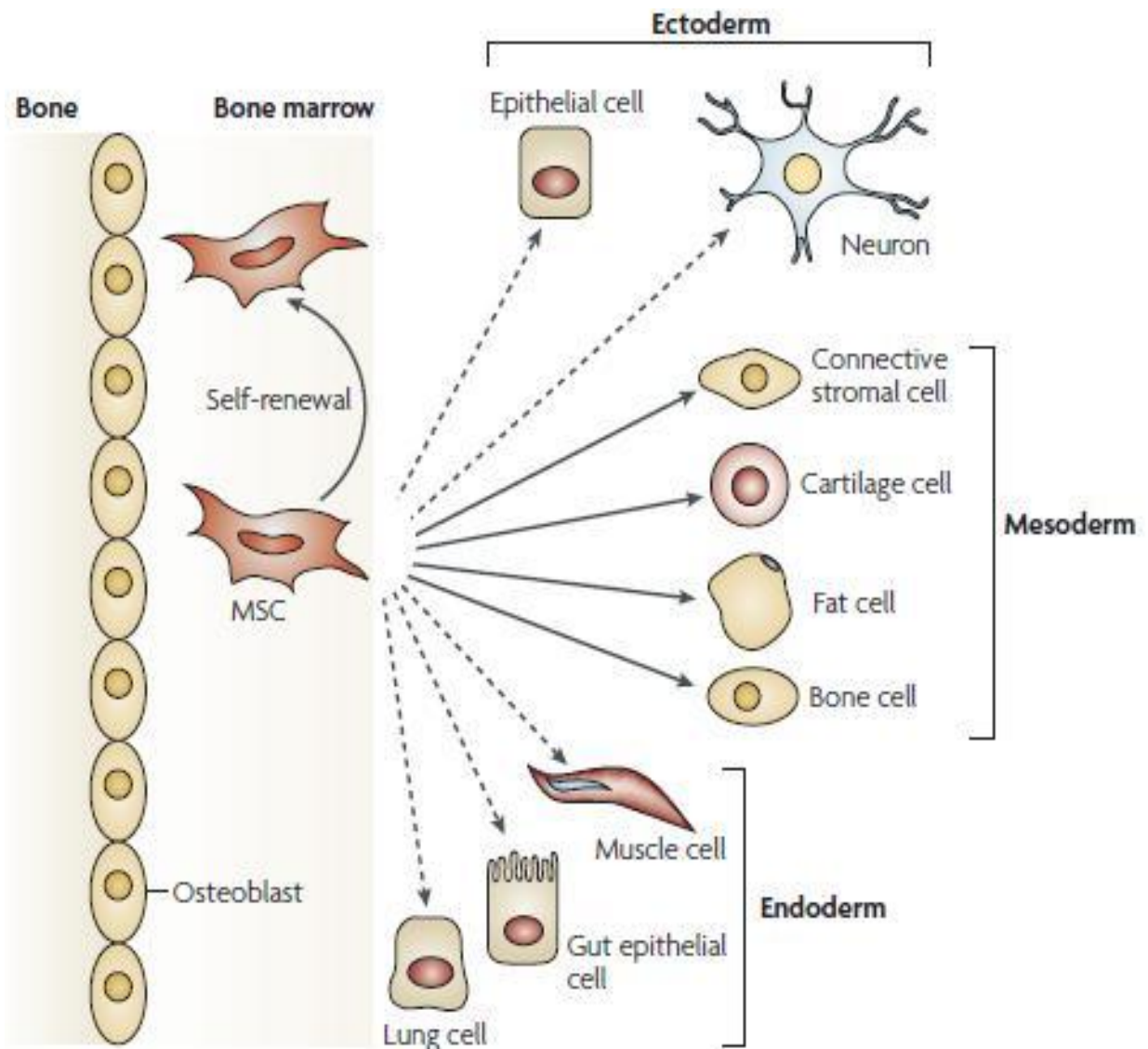


Figura 1 – Multipotencialidade das células-tronco mesenquimais. CTMs obtidas de medula óssea são capazes de se diferenciar em células da linhagem mesodermal *in vitro* e *in vivo* (setas sólidas). A diferenciação em células das linhagens endodermal e ectodermal (setas pontilhadas) *in vivo* ainda é controversa.

Fonte: Ucceli *et al.*, 2008

A multipotencialidade das CTMs, seu fácil isolamento e cultura, bem como seu alto potencial expansivo *ex vivo* fazem destas células uma ferramenta terapêutica atraente capaz de ter um papel importante em uma ampla gama de aplicações clínicas no contexto das terapias celular e gênica (Minguell *et al.*, 2001). Além disso, seu uso é vantajoso, pois não apresentam problemas éticos, apresentam baixo potencial teratogênico *in vivo* e podem ser transplantadas de forma autóloga, o que evita possíveis rejeições.

Embora a habilidade de se diferenciar em certos tipos celulares possa ser usada para o tratamento de uma série de patologias faça das CTMs uma fonte valiosa para terapias baseadas em células, alguns tipos de CTs não podem ser obtidos por métodos práticos, considerando a relação custo-benefício, nem podem ser facilmente transferidos para uso clínico (Patel & Silva, 2008). Métodos pouco invasivos para a coleta de material e posterior isolamento de CTs são preferidos para o uso clínico (Musina *et al.*, 2008).

O sangue menstrual e os tecidos despreendidos durante a menstruação contêm uma população heterogênea de células incluindo algumas com capacidade regenerativa (Cui *et al.*, 2007). O uso de células derivadas de sangue menstrual humano (CTs-SM) oferece importantes vantagens. Primeiro, as células são obtidas por um procedimento simples, seguro e indolor e podem ser eficientemente expandidas *in vitro*. Segundo, o transplante destas células deve encontrar poucos problemas éticos, pois seu uso evita a controvérsia do uso das CTEs (Toyoda *et al.*, 2007).

Além de grandes quantidades de CTs serem obtidas na primeira passagem (Hida *et al.*, 2008), Patel *et al.* (2008) demonstraram que as células obtidas do sangue menstrual podem ser facilmente expandidas e diferenciadas *in vitro* em linhagens celulares derivadas da mesoderme e da ectoderme.

Considerando o uso em potencial das CTs-SM, estudos adicionais são necessários para compreender sua biologia e funcionamento. Assim, o estabelecimento do cultivo de CTs-SM, além de uma nova fonte de CTs para os estudos a serem realizados no Instituto Carlos Chagas (ICC), Fiocruz-PR, agregará novos conhecimentos na área.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Células-tronco mesenquimais

Células-tronco mesenquimais (CTMs) constituem uma população heterogênea de células que proliferam *in vitro*, aderentes ao plástico, fibroblastóides, com formato fusiforme. Estas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de várias passagens sucessivas para se obter grande quantidade de CTMs altamente enriquecidas, com ausência de outros tipos celulares. Com o tempo e com as várias trocas do meio de cultura, a maior parte das células contaminantes (por exemplo, células hematopoiéticas) é removida e a heterogeneidade remanescente da cultura diminui progressivamente com as diversas passagens (Bydlowski *et al.*, 2009).

Em camundongos, populações de CTMs provenientes de diversos tecidos e órgãos (cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo, pâncreas) foram isoladas e cultivadas. Estas células apresentaram morfologia semelhante, independente da fonte, e um perfil de marcadores de superfícies similar (da Silva Meirelles *et al.*, 2006). Em humanos, CTMs e células semelhantes às CTMs foram identificadas em vários tecidos, não só no indivíduo adulto (medula óssea, sangue, tecido adiposo, pele, dente decidual, músculo esquelético), como no feto (líquido amniótico, placenta, fígado, baço, timo, pulmão) (Bydlowski *et al.*, 2009). Em órgãos adultos, células com características de CTMs foram associadas à vasculatura (Sorrell & Caplan, 2010).

Ensaio de diferenciação com células isoladas de diferentes órgãos de camundongo mostraram algumas variações na frequência de células que realmente diferenciaram no fenótipo osteogênico ou adipogênico, bem como no grau de diferenciação, relacionadas com o seu local de origem (da Silva Meirelles *et al.*, 2006). Muitos pesquisadores têm relatado que as CT humanas derivadas de diferentes fontes, como medula óssea e tecido adiposo, também possuem diferentes graus de multipotencialidade (citado por Patel & Silva, 2008).

Populações de CTAs não apresentam marcadores de superfície únicos, sendo que a classificação é feita com base em características morfológicas ou em

um conjunto de moléculas de superfície. Estes marcadores de superfície são específicos somente em um contexto particular ou são redundantemente expressos em outras CTs (da Silva Meirelles *et al.*, 2008). As diversas fontes de tecido e metodologias de preparação celular levantam a questão se as células resultantes são suficientemente semelhantes para permitir uma comparação direta das propriedades biológicas e resultados experimentais relatados, especialmente no contexto da terapia celular (Dominici *et al.*, 2006).

Essa dúvida sobre a equivalência celular ocorre, em parte, devido à falta de critérios universalmente aceitos para definir CTMs. Em 2006, a Sociedade Internacional para Terapia Celular propôs três critérios para definir CTM (para os laboratórios baseados na investigação científica e de estudos pré-clínicos): 1) aderência ao plástico, quando mantidas em condições padrão de cultura usando frascos de cultura de tecidos; 2) expressão de antígenos específicos de superfície, $\geq 95\%$ da população deve expressar CD105, CD73 e CD90, medida por citometria de fluxo. Além disso, essas células não devem expressar ($\leq 2\%$) CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA de classe II; 3) potencial de diferenciação multipotente, as células devem ser capazes de diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob condições padrão de diferenciação *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006)

Embora a idéia inicial tenha sido utilizar as CTMs como fonte para terapias de reposição celular, suas atividades imunomoduladoras e tróficas têm profundo potencial de impacto terapêutico (Bonfield *et al.*, 2010). Estudos pré-clínicos com CTMs demonstraram que ocorre recuperação funcional após injeção destas células mesmo sem diferenciação significativa em fenótipos apropriados para o tecido. Hoje é aceito que as CTMs estimulam a recuperação do ambiente e regeneração através da secreção de inúmeros fatores (Wagner *et al.*, 2009). Os efeitos parácrinos causados pelas CTMs podem ser diversos, como: anti-apoptóticos, angiogênicos, de apoio ao crescimento e diferenciação de CT locais e células progenitoras, antifibrótico, imunomodulatório e quimiotático (da Silva Meirelles *et al.*, 2009).

A migração preferencial para locais de ferimento quando infundidas em modelos animais de lesão (citado por da Silva Meirelles, 2008) é conhecido do efeito quimiotático. Essa propriedade pode ser atribuída à expressão de fatores de crescimento, quimiocinas e receptores de matriz extracelular na superfície das CTMs (da Silva Meirelles, 2009). No caso de isquemia tecidual ou danos graves, CTMs

podem ser atraídas para o local e ali secretam fatores bioativos que auxiliam troficamente o processo de reparo e regeneração (Caplan & Dennis, 2006).

A constatação de que estas células cultivadas têm propriedades imunomoduladoras vem de experimentos em que as células inibiram a proliferação de células T *in vitro* (da Silva Meirelles *et al.*, 2009). Os produtos de secreção de CTMs em locais de lesão reprimem fortemente a vigilância imunológica e inibem a destruição mediada por células B e células T no local da lesão. Esta imunoproteção serve para proteger o tecido de perder sua "tolerância" e, portanto, elimina questões de autoimunidade. Esta proposição leva a inferir que defeitos nestas capacidades imunes das CTMs podem resultar em doenças como a esclerose múltipla ou diabetes tipo I (da Silva Meirelles *et al.*, 2008).

2.2 Células-tronco derivadas do sangue menstrual

CTs podem ser obtidas do útero de diferentes formas, incluindo, histerectomia, biópsia endometrial ou a partir do sangue menstrual (Schüring *et al.*, 2011), sendo as duas últimas formas não invasivas de obtenção de material. O sangue menstrual pode ser obtido através da coleta com frascos coletores de material biológico ou coletores internos, como o Divacup[®]; enquanto o material da biópsia é obtido por procedimentos rotineiros de curetagem uterina.

O revestimento endometrial do útero tem uma notável capacidade de regeneração, pois durante cada ciclo menstrual há crescimento de tecido e vasos sanguíneos, que se destacam no final do ciclo (Patel *et al.*, 2008). O ciclo menstrual é necessário para a reprodução e é controlado pelo sistema endócrino, estende-se por 28 dias com início no primeiro dia da menstruação. Inclui duas fases: proliferativa e secretora (revisado em Allickson *et al.*, 2011).

Durante a fase proliferativa, o endométrio engrossa estimulado pelo gradual aumento na quantidade de estrogênio. Folículos no ovário começam a se desenvolver sob a influência de uma complexa interação de hormônios e, depois de vários dias, um ou dois folículos se tornam dominantes. O folículo dominante libera um óvulo em um evento chamado ovulação. Após a ovulação, os restos do folículo dominante se tornam o corpo lúteo, esse tem a função de produzir grandes quantidades de progesterona (fase secretória). Sob a influência da progesterona, o endométrio se prepara para receber um zigoto e estabelecer uma gravidez. Se o

implante não ocorrer dentro de aproximadamente duas semanas, o corpo lúteo morrerá, causando uma queda nos níveis de progesterona e estrogênio. Na ausência de progesterona, as artérias que irrigam a camada funcional do endométrio sofrem constrição, de modo que as células nessa camada se tornam isquêmicas e morrem, levando a menstruação (revisado em Toyoda *et al.*, 2007).

Algumas células derivadas do sangue menstrual têm alta capacidade replicativa, similar a CTs ou progenitoras que exibem capacidade de autorrenovação em longo prazo, e possuem uma maior taxa de crescimento do que qualquer célula fetal ou célula estromal derivada da medula óssea. Apesar da alta taxa de crescimento, o tempo de vida de células do sangue menstrual é relativamente curto quando comparado a células fetais humanas, e esta curta duração pode ser atribuída ao comprimento encurtado dos telômeros de células adultas (Toyoda *et al.*, 2007).

Patel *et al.* (2008) identificaram uma população de células-tronco mesenquimais derivadas do sangue menstrual (CTMs-SM) que expressa marcadores embrionários e outros marcadores de pluripotência tais como OCT-4, SSEA-4 e c-kit, juntamente com CD90, CD105 e CD166, que são marcadores de células estromais. As células foram também negativas para CD34, CD45 e CD13, que são marcadores de células hematopoéticas. Outros grupos (Meng *et al.*, 2007; Hida *et al.*, 2008) também identificaram populações similares, entretanto, as células não foram positivas para c-kit nem SSEA-4.

Células-tronco derivadas do sangue menstrual (CTs-SM) apresentam os mesmos marcadores de CTMs conhecidos pelo efeito imunossupressivo, como CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105. Estudos preliminares demonstraram que estas células apresentam uma fraca resposta estimulatória na ativação de linfócitos. Dado o fato de que o revestimento do útero não rejeita fetos alogênicos, é provável que essas células tenham recursos para tal imunossupressão (Borlogan *et al.*, 2011).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados também com CTs-SM e os resultados mostraram-se promissores. Modelos de acidente vascular cerebral tiveram significativa proteção contra morte celular por isquemia, diminuição no comportamento anormal (coordenação motora, assimetria motora e desempenho neurológico). A imediata recuperação comportamental em um breve período após o transplante pode ser devido à liberação de fatores tróficos, ao invés de uma substituição de células por um mecanismo de diferenciação neuronal (Borlogan *et*

al., 2011). A diferenciação miogênica das CTs-SM e fusão com células musculares hospedeiras restauraram a expressão de distrofina (Toyoda *et al.*, 2007). A implantação destas células, em camundongos, aumentou a eficiência da regeneração muscular e disponibilidade de distrofina para músculos distróficos (Cui *et al.*, 2007). Também já foi relatado potencial cardiomiogênico das CT-SM (Hida *et al.* 2008) e a capacidade de migração, que pode possibilitar o uso como veículo para agentes quimioterapêuticos (citado por Allickson *et al.*, 2011).

CTs do endométrio já foram usadas para gerar neurônios dopaminérgicos e células pancreáticas (citado por Lin *et al.*, 2011). Essas células também foram transplantadas nos respectivos modelos animais e mostraram-se funcionais. Em humanos, essas células foram administradas por via intravenosa e/ou intratecal em pacientes com esclerose múltipla e não foi observada nenhuma reação imunológica ou formação ectópica de tecido. Foi relatado que não ocorreu progressão da doença (Zhong *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais obtidas do sangue menstrual humano.

3.2 Específicos

- Estabelecer um protocolo de isolamento e manutenção de células-tronco do sangue menstrual;
- Caracterizar imunofenotipicamente as células obtidas;
- Caracterizar funcionalmente as culturas através da indução nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica;
- Determinar o tempo de duplicação das culturas celulares pelo estabelecimento de uma curva de crescimento;
- Realizar ensaios de ciclo celular para descrição adicional do comportamento das culturas obtidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo de materiais, soluções e meios de cultura

4.1.1 Solução A

NaCl 160g

KCl 8g

Na₂HPO₄.12H₂O 5,84g

KH₂PO₄ 3,0g

Água ultrapura qsp 1000 mL

Esterilizada por autoclavação 121°C por 15 min

Estocada de 2 a 8°C.

4.1.2 Solução B

CaCl₂.2H₂O 0,16g

MgSO₄.7H₂O 3,9g

H₂O deionizada q.s.p. 500,0mL

Esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 min.

Estocada a 4°C.

4.1.3 Solução C

Glicose 22 g

Água ultrapura qsp 1000 mL

Esterilizada por filtração em membrana 0,22 µm

Estocada de 2 a 8°C.

4.1.4 Solução D

Vermelho de Fenol 1g

H₂O deionizada q.s.p. 100,0mL

Solubilizar em água alcalinizada com NaOH 1M e completar o volume.

Estocada a 4°C.

4.1.5 Solução E

Na₂SO₄ 2g

Água ultrapura qsp 1000 mL

Esterilizada por autoclavação 121°C por 15 min

Estocada 2 a 8°C.

4.1.6 BSS

Solução A 50 mL

Solução B 50 mL

Solução C 50 mL

Solução D 0,85 mL

Água ultrapura qsp 1000 mL

pH 7,0 - 7,5

Esterilizada por filtração em membrana 0,22 µm

Estocado de 2 a 8°C.

4.1.7 BSS.CMF

Solução A 50 mL

Solução C 50 mL

Solução E 50 mL

Solução D 0,85 mL
Água ultrapura qsp 1000 mL
Ajustar pH 7,0 - 7,5
Esterilizada por filtração em membrana 0,22 µm
Aliquotado e estocado de 2 a 8°C.

4.1.8 PS 100 x

Penicilina G Potássica 1,2 g
Sulfato de Estreptomicina 2,0g
Água ultrapura qsp 200 mL
Esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm
Aliquotado e estocado a -20°C.

4.1.9 Soro Fetal bovino

Soro Fetal bovino (GIBCO)
Inativado a 56°C por 30 min
Aliquotado e estocado a -20°C

4.1.10 Meio F12

Meio F12 (Gibco)
Bicarbonato de Sódio 1,176g
Água ultrapura qsp 1000 mL
pH 7,0 – 7,5
Esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm
Estocado de 2 a 8°C.

4.1.11 Meio DMEM (Sigma)

Meio DMEM (Gibco)

Solução C 50 mL

Ajustar pH 7 – 7,5

Água ultrapura qsp 1000 mL

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm

Estocado de 2 a 8°C.

4.1.12 BSA 5%

BSA (Sigma)

Água ultrapura qsp 40 mL

Aliquotado e estocado a -20°C.

4.1.13 L-glutamina 200 mM

L-glutamina (Gibco)

Água ultrapura qsp 1000 mL

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm

Aliquotado e estocado a -20°C.

4.1.14 EDTA.2H₂O

EDTA.2H₂O (Sigma)

NaOH 1 Pastilha

Água ultrapura qsp 100 mL

Solubilizar em água a pastilha de NaOH sob agitação. Adicionar o EDTA.

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm

Estocado de 2 a 8°C.

4.1.15 Tripsina 0,05%/EDTA 0,02%

Solução A 50 mL

Solução C 50 mL

Solução E 50 mL

Solução D 0,85 mL

EDTA 0,2 g

Tripsina 0,5 g

Água ultrapura qsp 1000 mL

pH 7,0 -7,5

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm

Aliquotado e estocado a -20°C.

4.1.16 Solução de Paraformaldeído 4%

Paraformaldeído 20g

Solução NaOH 1M 5 mL

Solução de PBS 10x

Água ultrapura qsp 500 mL

Aquecer 200 mL de água ultrapura em um becker de vidro até 65°C.

Em capela química de exaustão, adicionar 20 gramas de paraformaldeído sob agitação.

Adicionar 5 mL de solução de NaOH 1M, lentamente até que a solução fique transparente. Deixar dissolver completamente sob agitação.

Deixar resfriar a temperatura ambiente.

Adicionar 50 mL de solução de PBS 10x.

pH 7,0 – 7,5, sob agitação.

Completar até 500 mL com água ultrapura.

Caso haja precipitado, filtrar em papel de filtro.

Aliquotado e estocado a -20°C.

4.1.17 Tampão hemolítico

Água ultrapura qsp 100 mL

Cloreto de Amônio (NH_4Cl) 0,83 g

Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3) 0,1g

EDTA dissódico ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,004g

4.1.18 Alizarin Red S

Alizarin Red S 2 g

Água deionizada 100mL

Ajustar pH para 4.1-4.3 com uma solução de hidróxido de amônio 1%

Estocado a TA protegido da luz por até 3 meses.

4.1.19 Oil Red O

Solução-estoque:

Oil Red O 50mg

Isopropanol 10mL

Estocado a TA protegido da luz por até 3 meses.

Solução de trabalho:

3 volumes da solução-estoque/2 volumes de água

Misturar e esperar 10 minutos.

Filtrar o corante através de uma unidade de filtro estéril.

Esperar 10 minutos antes de utilizar. Não agitar a solução previamente ao uso ou precipitados podem ser ressuspensos. Usar em 2h. Descartar qualquer sobra.

4.2 Coleta de sangue menstrual

As doadoras assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Fundação Oswaldo Cruz, número de aprovação: 419/07 (Anexo 1), e também responderam a um formulário (Anexo 2) para obtenção de dados pessoais e de informações relativas à coleta da amostra. A partir do preenchimento, foi atribuído um código (por exemplo, SM1, SM2) a cada amostra de modo a manter a identidade das doadoras sob sigilo.

As doadoras foram orientadas sobre os procedimentos para a coleta da amostra. Após a realização da higiene pessoal, o sangue menstrual foi coletado em frascos de polipropileno (J.Prolab) contendo 5 mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) estéril acrescido de PS (0,01 µl/mL), anfotericina B (250 µg/mL) e heparina (20 mg/mL). O material foi coletado nos primeiros dias da menstruação e processado até 48 horas após a coleta. As amostras foram mantidas a 4°C até o processamento.

4.3 Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue menstrual

Após o recebimento, o material foi centrifugado (Jouan BR4i, ThermoFisher Scientific), a 2000 rpm (rotor S40) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 5 mL de tampão hemolítico, sendo então, incubado a 37 °C por 10 minutos para a lise de hemácias. Novamente a amostra foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensionada em 8 mL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *high glucose* (GIBCO). Cuidadosamente a amostra foi transferida sobre 3 mL do gradiente de densidade (Histopaque 1077, Sigma). A amostra foi, então, centrifugada a 1500 rpm (sem freio) por 30 minutos, a temperatura ambiente. O anel de células mononucleares coletado foi transferido para um tubo de 15 mL, contendo 10 mL de meio DMEM. O material foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensionada em 5 mL de tampão hemolítico e incubada por 10 minutos a 37°C. Após nova centrifugação, a 2000 rpm por 5 minutos, as células foram

ressuspendidas em DMEM alta glucose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), acrescido de PS (0,01 $\mu\text{L}/\text{mL}$), anfotericina B (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), prosseguindo-se, então, com a contagem celular na câmara de Neubauer e incubação. A manutenção das culturas foi feita em estufa de atmosfera úmida, 5% CO_2 , 37°C (estufa HEPA Class 100, Thermo Scientific) e as trocas de meio foram realizadas a cada 2-3 dias.

A morfologia e a confluência das células em cultura foram acompanhadas através de visualização em microscópio ótico (Eclipse TS100, Nikon). Quando atingiam aproximadamente 90-95% de confluência as culturas eram tripsinizadas e replaqueadas para expansão da cultura. Para isso, os meios de cultivo eram retirados e uma solução de BSS.CMF era adicionada para a lavagem das culturas. Em seguida essa solução era retirada e uma solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% era adicionada. A atividade proteolítica da enzima age sobre as proteínas de superfície celular e resulta no desprendimento das células das garrafas de cultivo. As garrafas de cultura eram, então, incubadas por 5 min a 37°C. Após esta etapa era feita contagem celular na câmara de Neubauer e verificação da viabilidade celular através do método de exclusão utilizando o corante azul de tripan, o qual penetra em células cujas membranas não estejam mais íntegras. Portanto, as células mortas são visualizadas em azul. Para expansão da cultura eram plaqueadas 0,2 células/ cm^2 e as garrafas de cultivo eram mantidas em estufa de atmosfera úmida, 5% CO_2 , 37°C.

4.4 Curva de crescimento e cálculo do tempo de duplicação

Células foram plaqueadas em garrafas de 25 cm^2 , em uma concentração de $0,2 \times 10^4$ células/ cm^2 . A cada 24 horas foi feita tripsinização, como descrito anteriormente, e contagem em câmara de Neubauer e avaliada a viabilidade celular através do método de exclusão utilizando o corante azul de tripan. Foram construídas curvas de crescimento e para o cálculo do tempo de duplicação (t_d), fez-se a regressão exponencial dos pontos. O tempo de duplicação celular foi calculado utilizando as seguintes equações:

$$(I) \quad N_t = N_0 \cdot e^{\mu t}$$

$$(II) \quad t_d = \ln 2 / \mu$$

onde:

N_t é a concentração de células no tempo t ;

N_0 é a concentração de células no início do crescimento exponencial;

μ é a taxa específica de crescimento;

t é o tempo (Schmidell *et al.*, 2001).

Inicialmente foi calculado μ utilizando a equação I, em seguida calculou-se t_d utilizando a equação II.

4.5 Ensaio de ciclo celular

Para avaliação do ciclo celular, uma solução de iodeto de propídio 50 $\mu\text{g/mL}$ em tampão citrato contendo NP40 0,1% e RNase A 700 U/L foi adicionada às amostras de suspensões celulares. Após as amostras serem incubadas por 2 minutos, no gelo, foi feita a leitura em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson).

A quantificação de DNA por este método acaba sendo de forma indireta, já que o iodeto de propídeo é um corante que tem afinidade de ligação pelos ácidos nucléicos. A análise dos dados foi realizada pelo programa FlowJo, através do modelo de regressão matemática de Watson.

4.6 Caracterização das células por imunofenotipagem

A população de células isoladas foi verificada quanto à presença de marcadores que caracterizam células-tronco mesenquimais, conforme Dominici *et al.* (2006).

As células foram tripsinizadas, fez-se o bloqueio com PBS/BSA 1% por 1h no gelo. As células foram, então, marcadas com os anticorpos anti-CD105, CD73, CD90, CD140b, CD45 CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR (Apêndice 1).

Para a imunofenotipagem foi utilizado o aparelho FACSAria II (Becton Dickinson) e os dados obtidos foram analisados utilizando o programa FlowJO.

4.7 Caracterização funcional da linhagem mesenquimal

A população de células obtidas do sangue menstrual foi induzida à diferenciação *in vitro* em adipócitos, osteoblastos e condrócitos.

Para a adipogênese, $5-6 \times 10^4$ células foram plaqueadas em placas de 6 poços. As culturas foram induzidas à adipogênese, após atingirem a confluência, com o kit de indução *hMSC Adipogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza), ou meio de indução não comercial (DIII), composto de DMEM suplementado com 10% de SFB, 1 μ M de dexametasona (Sigma), 500 μ M de IBMX (Sigma), 10 μ g/mL de insulina (Sigma) e 200 μ M de indometacina (Sigma). Os controles foram cultivados com meio de manutenção, fornecido também pelo kit comercial *hMSC Adipogenic Differentiation Bullet Kit*, ou DMEM+SFB10%. Os meios foram trocados duas vezes por semana e o período de indução foi de 21-28 dias.

Para a confirmação da diferenciação adipogênica, as culturas foram marcadas com *Oil Red O*, ORO, (Sigma), o qual permite a identificação de lóculos de lipídicos neutros. Para isso, as culturas foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com solução de PF 4% por 30min à temperatura ambiente (TA), lavadas novamente duas vezes com PBS e, então, marcadas com ORO, por 1 hora. As imagens das culturas induzidas foram obtidas utilizando o microscópio invertido (Eclipse TS300, Nikon).

Para a osteogênese, $2-3 \times 10^4$ células foram plaqueadas em placas de 6 poços. As culturas foram induzidas com *hMSC Osteogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza), conforme instruções do fabricante, após atingirem 60-70% de confluência. Os controles foram cultivados com MSC-BM (Lonza). Os meios foram trocados duas vezes por semanas e o período de indução foi de 21 dias. Para a confirmação da diferenciação condrogênica, as culturas foram marcadas com *Alizarin Red S* (Sigma), o qual marca deposição de cristais de cálcio no citoplasma do osteoblasto. Para isso, as culturas foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com solução de

PF 4% por 30min à TA, lavadas duas vezes com PBS e, então, marcadas com *Alizarin Red S*.

A indução condrogênica foi realizada pelo uso dos kits de indução *hMSC Chondrogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza), conforme instruções do fabricante. Para a condrogênese, 5×10^5 células foram distribuídas em tubos de polipropileno de 15 mL e centrifugadas. Após remoção do meio, as células foram ressuspensas em meio de indução incompleto ou em meio controle (DMEM+SFB10%). Uma nova centrifugação (900 rpm, 5 min) foi realizada e o meio removido. Por fim, as células foram ressuspensas em meio de indução completo (contendo TGF β 3) ou em meio controle e realizou-se a última centrifugação (900 rpm, 5 min). O pellet formado não foi desfeito. Os tubos foram mantidos semi-tampados para manter o pH do meio, em estufa de CO₂ a 37°C. Após um período em repouso (24h), ocorre a formação de uma micromassa, na qual há menor disponibilidade de oxigênio em seu interior, o que é necessário para diferenciação condrogênica. Os meios foram trocados duas vezes por semana e o período de indução foi de 21 dias. A diferenciação condrogênica foi verificada pela marcação com azul de toluidina (Sigma), o qual identifica o acúmulo de matriz extracelular de mucopolissacarídeos no interior do condrócito. Para isso, os agregados celulares foram pré-corados com azul de tripan para facilitar a sua visualização. Em seguida foram lavados com PBS e fixados com formalina 10%. Posteriormente, foram desidratados em diluições seriadas de etanol e embebidos em blocos de parafina. Os cortes de parafina (4 μ m de espessura) foram corados com solução de azul de toluidina.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta de sangue menstrual

A maneira ideal de obtenção do sangue menstrual seria pelo uso de coletores internos. Este procedimento diminui o risco de contaminação e aumenta a quantidade de material obtido por coleta. Embora não sendo a melhor forma de obtenção de material, a coleta das amostras foi realizada utilizando frascos de polipropileno, material que dificulta a aderência de células. Este método, por ser mais econômico, foi escolhido para obtenção das amostras.

No decorrer do projeto foram recebidas doze amostras de sangue menstrual (Tabela 1). A idade das doadoras foi em média $36\pm 8,4$ anos. A quantidade de material recebido foi em média $7,9\pm 3,8$ mL. A variação de volume pode ser devido ao dia de coleta, que variou entre o primeiro e o quarto dia do ciclo menstrual, e também pelo fato de algumas doadoras tomarem pílulas anticoncepcionais, que, em geral, diminui o fluxo menstrual.

Tabela 1 – Dados pessoais e informações relativas à coleta das amostras.

Código da amostra	Volume coletado (mL)	Dia da coleta	Uso de pílula anticoncepcional	Idade (anos)
SM01	5	2°	Não	27
SM02	5	1°	Sim	28
SM03	5	3°	Sim	26
SM04	5	3°	Não	28
SM05	5	2°	Sim	28
SM06	14	1°	Não	45
SM07	14	2°	Não	45
SM08	5	4°	Não	45
SM09	10	1°	Não	45
SM10	12	2°	Não	45
SM11	10	2°	Não	35
SM12	5	1°	Não	36

5.2 Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue menstrual

A fim de se estabelecer um protocolo eficiente de isolamento das CTMs-SM, foram testadas, inicialmente, duas formas de isolamento: cultivo direto das células obtidas e separação de células mononucleares por gradiente de densidade; e dois diferentes meios: DMEM suplementado com 10% SFB (DMEM+SFB10%) e DMEM/F12 suplementado com 15% SFB (DMEM/F12+SFB15%).

Utilizando o cultivo direto, diferentes condições foram avaliadas. Para isso, as amostras foram divididas em dois tubos e centrifugadas, para remoção da solução de coleta. Metade da amostra foi cultivada em meio contendo DMEM+SFB10% enquanto a outra metade foi cultivada em DMEM/F12+SFB15%. Após observação em microscópio óptico, foram detectados pedaços de tecidos e muitas hemácias no sobrenadante, por esse motivo dividiu-se novamente o conteúdo e utilizou-se tampão hemolítico em metade das amostras contendo meio DMEM+SFB10% e DMEM/F12+SFB15%, para que as hemácias fossem rompidas.

Neste tipo de cultivo foi observado que inicialmente a cultura ainda continha muitas hemácias, mesmo após o tratamento com tampão hemolítico, além de outros tipos celulares não aderentes. Apesar de ser mais simples, o plaqueamento direto permitiu que diferentes tipos celulares se mantivessem em cultivo, levando ao desenvolvimento de uma população mais heterogênea. Além disso, devido à presença de células ou fragmentos celulares em suspensão, as CTMs podem preferencialmente neles se aderirem.

Como o conteúdo das amostras recebidas foi muito heterogêneo, contendo células com diferentes morfologias e pedaços de endométrio, o segundo tipo de cultivo, após separação com gradiente de densidade, pareceu ser o mais adequado já que somente células mononucleares (monócitos, linfócitos, células-tronco e outros progenitores) são selecionadas. O gradiente de densidade purifica a amostra e concentra as células de interesse. Após a centrifugação, na interface encontram-se as células mononucleares, que não conseguem atravessar o gradiente; o plasma e seus constituintes solúveis ficam na fase superior e os eritrócitos e granulócitos ficam sedimentados no fundo do tubo (Figura 2). Por este motivo, nas amostras subsequentes foi realizada a separação por gradiente de densidade. O anel de células mononucleares foi transferido para garrafas de poliestireno, que facilita a

adesão de CTs e outros progenitores, enquanto a maior parte dos monócitos e linfócitos em suspensão é eliminada após sucessivas trocas de meio.

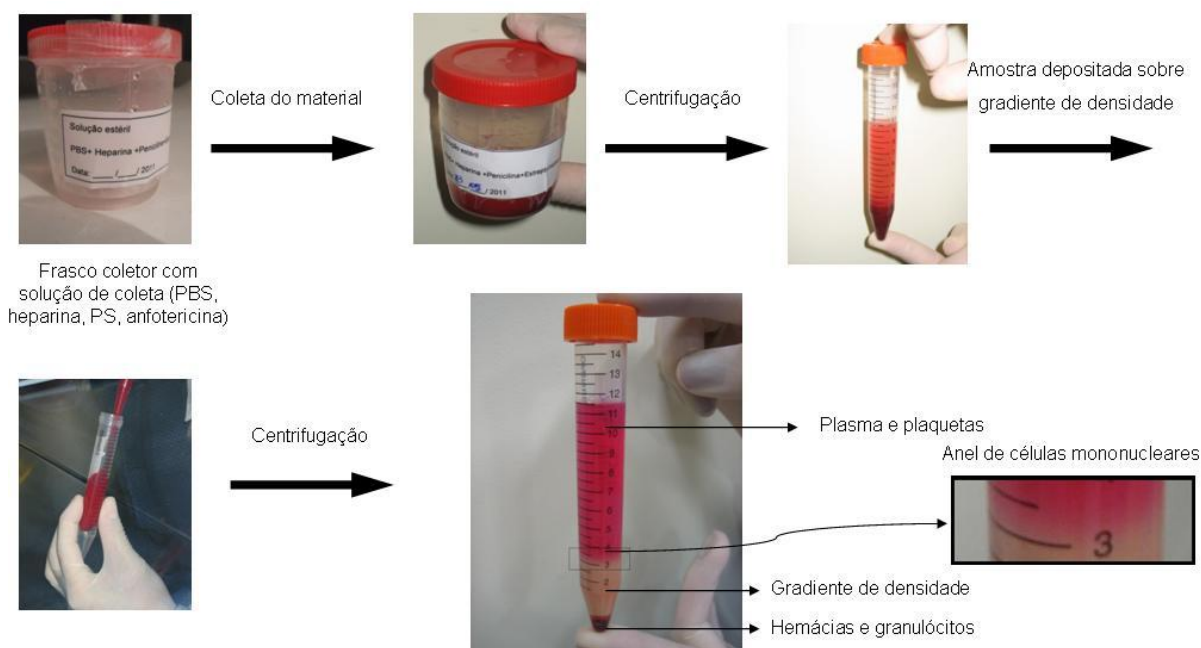


Figura 2 – Fluxograma do processamento das amostras de sangue menstrual. Após o recebimento das amostras de sangue menstrual foi realizada centrifugação do material para retirada da solução de coleta. Em seguida o material foi depositado sobre gradiente de densidade, após nova centrifugação pode ser obtido um anel contendo células mononucleares. Adicionalmente as células foram tratadas com tampão hemolítico para lise de hemácias (passo não mostrado no fluxograma).

A utilização de diferentes meios pareceu não influenciar no cultivo de células. Assim, o meio DMEM+SFB10% foi escolhido para o cultivo das demais amostras, pois também foi utilizado em outros trabalhos envolvendo isolamento de CTMs-SM (Hida *et al.*, 2008; Musina *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2007). Com a visualização morfológica constatou-se a presença de células com formato fibroblastóide e com rápida proliferação após a primeira/segunda passagem (p), independente do meio utilizado.

Após 24-48 horas do plaqueamento, os meios foram trocados para a remoção de células não aderentes e de restos celulares. As demais trocas de meio foram realizadas a cada 2-3 dias. O tempo para realização da primeira passagem variou entre as amostras, entre 8 e 22 dias, devido à quantidade de células inicial.

De acordo com as observações realizadas neste trabalho, as células obtidas do sangue menstrual apresentam rápido crescimento até a p12. As culturas celulares obtidas tornam-se cada vez mais homogêneas em tamanho e morfologia conforme são feitas as passagens (Figura 3A e B). Três amostras foram cultivadas

até p15 ou p16. Observou-se que com o aumento das passagens, as culturas tornavam-se confluentes com uma densidade de células cada vez menor (Figura 4), pois as células tornavam-se maiores e mais espaiadas (Figura 3B). Também foi observado que a partir da p12 as células proliferam mais lentamente

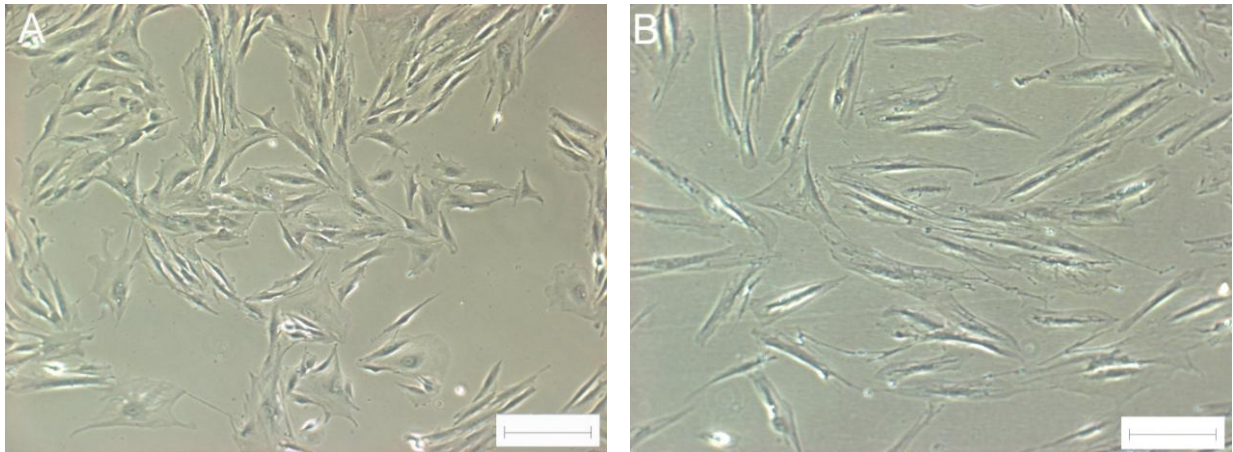


Figura 3 - Análise da morfologia celular de culturas de células isoladas do sangue menstrual em diferentes passagens por microscopia de contraste de fase. **(A)** As culturas em passagens mais baixas (p7) são heterogêneas em formato e tamanho. **(B)** No decorrer das passagens, a cultura celular torna-se homogênea em morfologia e tamanho, como visto nesta cultura em p16. Barra: 200 μm .

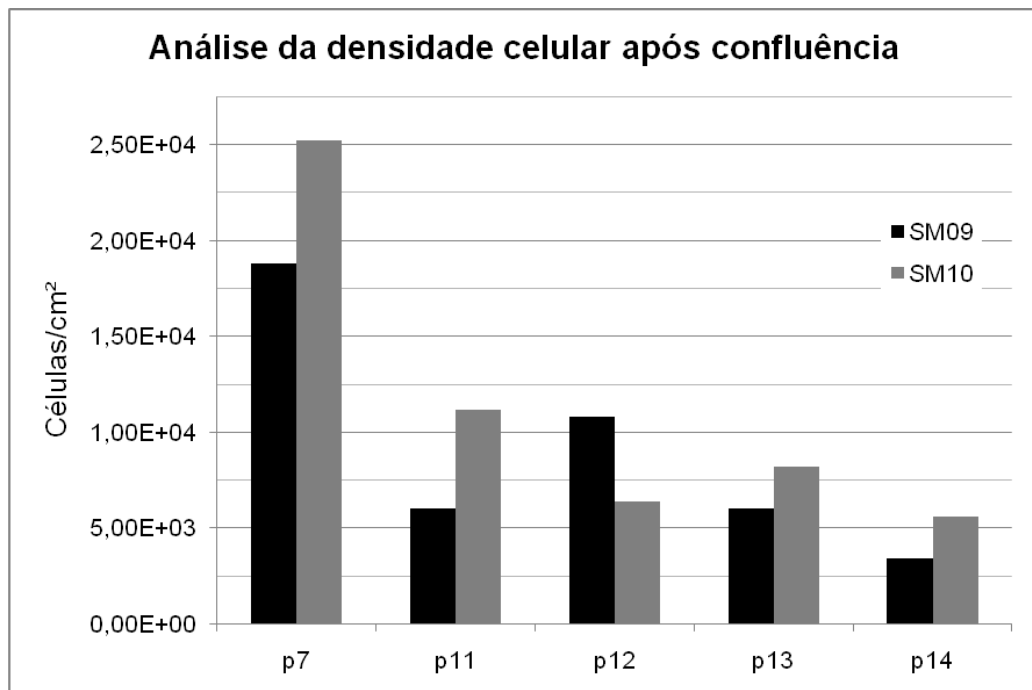


Figura 4 - Análise da densidade celular após confluência. Nesta análise, foram plaqueadas 5×10^4 células e o cultivo realizado até se atingir a confluência, ou seja, após 7 dias em p7-p12 e após 12 dias em p13. Com o aumento das passagens, as culturas tornaram-se confluentes com uma densidade de células cada vez menor, pois as células tornaram-se maiores e mais espaiadas. As culturas em p14, mesmo cultivadas por mais de um mês, não entraram em confluência, possivelmente devido à senescência celular.

Após a formação de uma monocamada compacta, as células formavam “caracóis” na cultura (Figura 5A). Outras culturas tiveram alteração em sua morfologia, células com formato fibroblastóide foram substituídas por células com forma epitelióide. (Figura 5B). Estes fatos também foram descritos por Musina *et al.* (2008). Segundo o autor, a mudança no fenótipo, de fibroblastóide para epitelióide, é devido a uma transformação epitélio-mesenquimal na cultura.

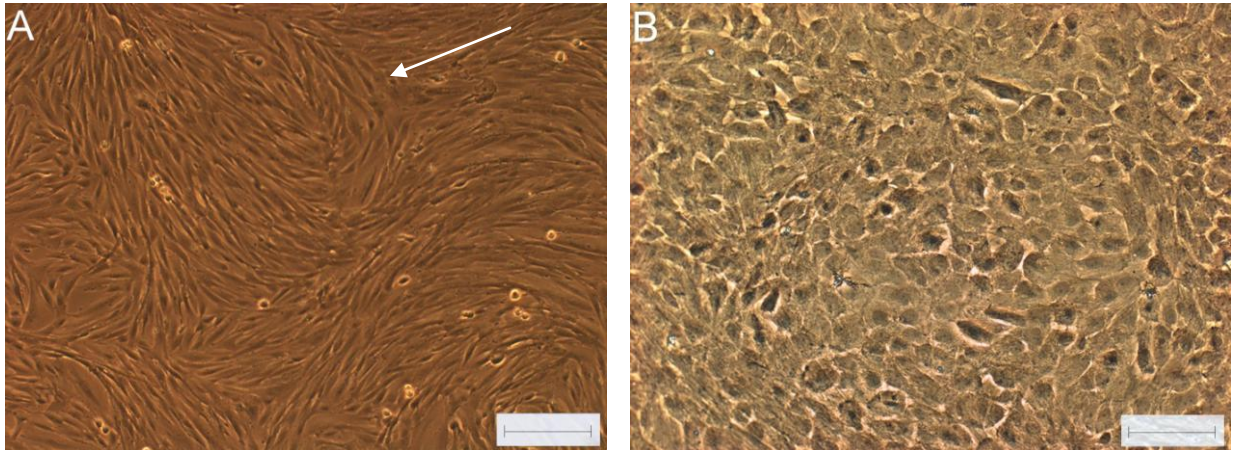


Figura 5 - Aspecto da cultura de células isoladas do sangue menstrual quando em monocamadas compactas. **(A)** Agrupados celulares em formato de caracóis (setas) por microscopia de contraste de fase. **(B)** Células com formato epitelióide. Barra: A= 200 μm , B= 100 μm .

5.3 Curva de crescimento e cálculo do tempo de duplicação

Para o cálculo do tempo de duplicação, foram construídas curvas de crescimento (Figura 6), e chegou-se a um tempo de duplicação médio de 34 ± 3 horas. Este resultado corrobora com outros trabalhos onde o tempo de duplicação das CTMs obtidas do sangue menstrual varia entre 18 e 36 horas, dependendo da técnica de cultura e do meio utilizado (revisado em Patel & Silva, 2008).

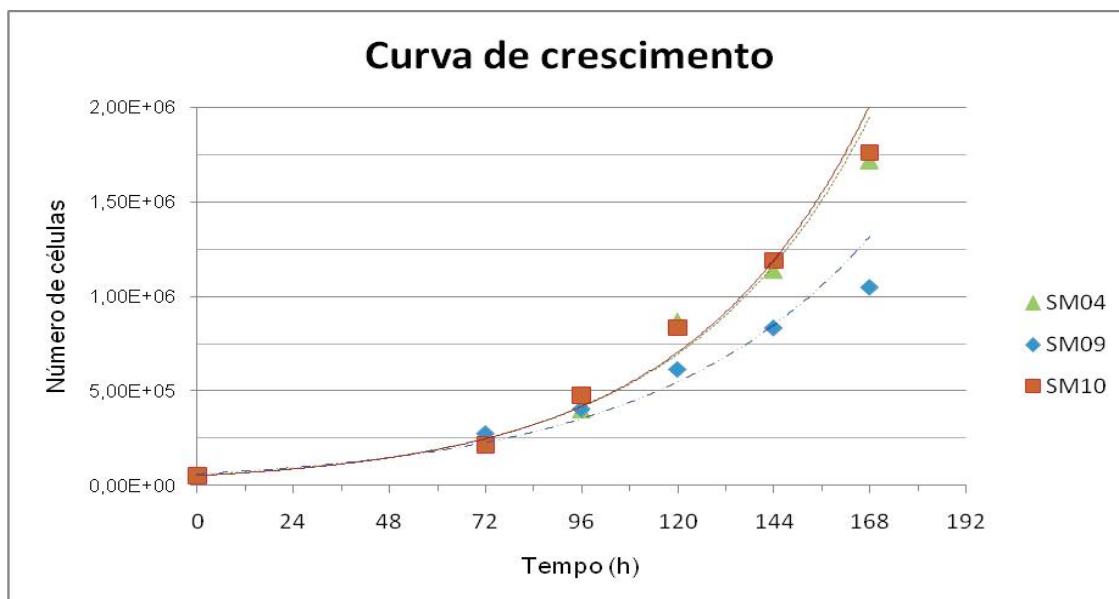


Figura 6 - Curva de crescimento de células isoladas de sangue menstrual. Foram analisadas três amostras, todas em passagem sete. As culturas mantiveram-se em crescimento exponencial no período avaliado, nenhuma atingiu o platô.

5.4 Ensaio de ciclo celular

O ensaio de ciclo celular foi realizado com três amostras (SM04, SM09 e SM10, todas em p7) (Apêndice 3). Os resultados obtidos foram semelhantes para as amostras analisadas: houve um aumento no número de células na fase G1 ao final dos cinco dias avaliados (Figura 7) e todas as amostras estavam com aproximadamente 100% de confluência.

O acúmulo de células em G1 ocorre concomitante ao aumento da confluência, o que sugere que as células sofrem inibição do crescimento por contato. Este resultado está de acordo com outros dados publicados que demonstram que as células-tronco apresentam inibição do crescimento ao entrarem em contato com outras células, o que é mais frequente conforme a confluência celular aumenta.

A diminuição da quantidade de células nas fases S e G2, ou seja, diminuição de células que está de replicando ocorreu, possivelmente, não só devido ao aumento da confluência celular, mas também devido ao esgotamento dos nutrientes no meio de cultivo.

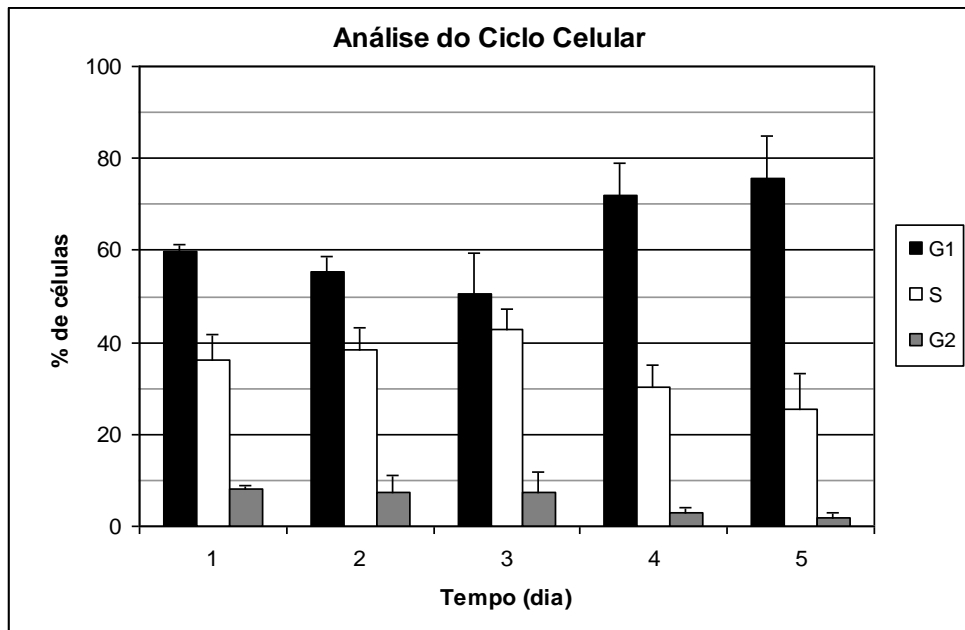


Figura 7 - Ensaio de ciclo celular de células isoladas de sangue menstrual. As células foram marcadas com iodeto de propídio e analisadas ao longo de 5 dias. S e G2 correspondem às células em fase proliferativa e G1 às células que não estão em fase replicativa.

5.5 Caracterização das células por imunofenotipagem

A imunofenotipagem das células foi realizada nas passagens p2 e p5, com três diferentes amostras (Figura 7 e Apêndice 2). Foram utilizadas entre 5×10^5 e 8×10^5 células para cada marcação. Além dos marcadores propostos por Dominici e colaboradores (2006), o marcador CD140b, que caracteriza células de origem mesenquimal, foi avaliado.

Notou-se que em alguns casos ocorreu aumento na porcentagem da população que expressava os marcadores positivos nas culturas em p5 quando comparadas a culturas a p2 (Figura 8A), contudo, nem todas as amostras expressaram o marcador CD90 em mais de 95% das células. Este resultado pode ser atribuído a uma alta concentração de células utilizadas nos experimentos ou a uma concentração insuficiente de anticorpo, pois também CTMs de medula óssea utilizadas como controle das marcações não foram positivas para pelo menos 95% da população (dados não mostrados). Assim, novas análises são necessárias para

concluir se o marcador CD90 realmente não é expresso em pelo menos 95% da população, ou se a concentração de anticorpos utilizadas no experimento foi inferior à quantidade necessária para uma marcação satisfatória da suspensão celular.

Com exceção do CD34, todos os marcadores negativos não foram expressos em mais de 2% da população celular (Figura 8B). O marcador CD34 foi expresso em duas amostras em p2 e deixou de ser expresso em p5. Este fato pode ser atribuído à adesão inicial de algumas células progenitoras hematopoiéticas às garrafas de cultura, mas que no decorrer das passagens deixaram de expressar o marcador ou foram eliminadas, sendo que as CTMs tornaram-se dominantes na cultura. Portanto, estes resultados indicam que as células isoladas e cultivadas poderiam ser CTMs.

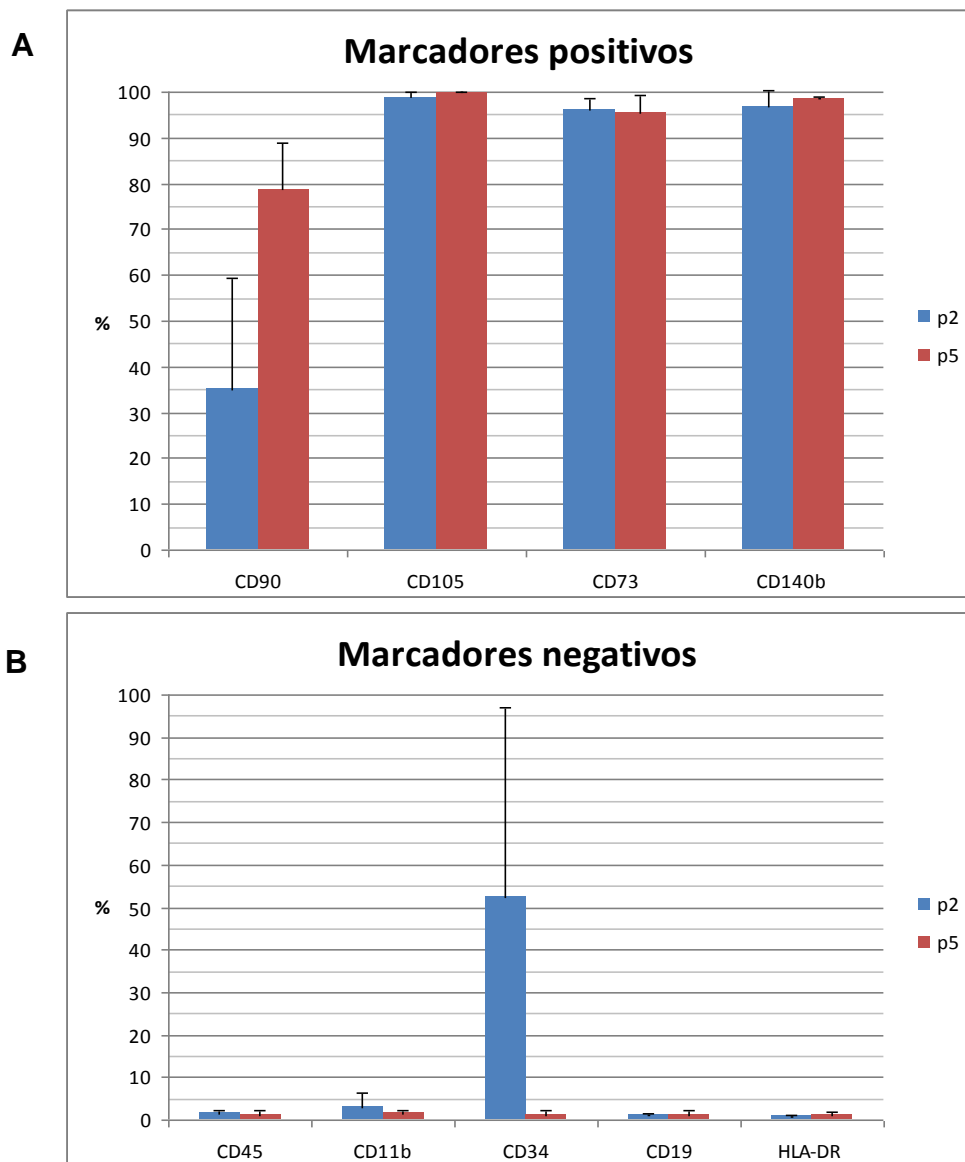


Figura 8 - Análise da expressão de marcadores de CTMs. **(A)** Marcadores positivos e **(B)** Marcadores negativos. Nos gráficos cada coluna representa a média de três amostras e a barra representa o desvio padrão.

5.6 Caracterização funcional da linhagem mesenquimal

Para verificar se as culturas obtidas realmente se tratavam de CTMs, foi realizada a indução adipogênica, osteogênica e condrogênica *in vitro* em diferentes passagens.

Para a indução adipogênica, duas amostras (SM07p7 e SM08p4) foram induzidas com o *Adipogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza). A primeira amostra foi induzida conforme instruções do fabricante, ou seja, por 4 semanas, e não diferenciou (Figura 9B). A segunda foi induzida por 5 semanas considerando uma diferenciação eventualmente mais tardia, mas também não diferenciou. Outras duas amostras (SM09p6 e SM10p6) foram cultivadas com o meio indutor de adipogênese DIII por 3 semanas. Em ambas houve diferenciação adipogênica, confirmada pela coloração com *Oil Red O* que permite visualizar as vesículas lipídicas em vermelho (Figura 9D).

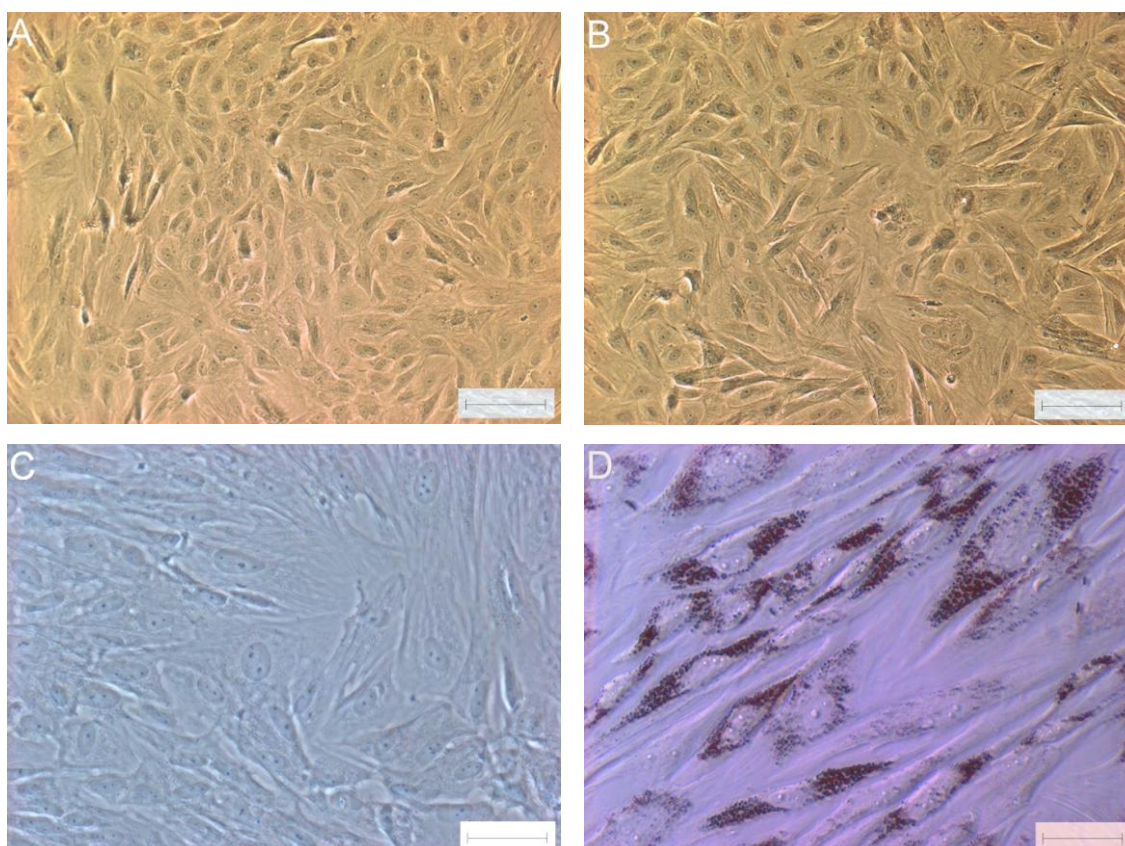


Figura 9 - Células isoladas de sangue menstrual induzidas à adipogênese marcadas com *Oil Red O*. **(A)** Cultura controle não induzida cultivada em meio manutenção (Lonza). **(B)** Cultura induzida com *Adipogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza). **(C)** Cultura controle não induzida cultivada em meio DMEM10%. **(D)** Cultura induzida com meio DIII. Microscopia de contraste de fase. Barra: A e B= 100 μ m, C e D= 50 μ m.

Quatro amostras (SM07p7, SM08p4, SM09p6 e SM10p6) foram induzidas à diferenciação osteogênica com *Osteogenic Differentiation Bullet Kit*, duas delas foram induzidas por 3 semanas, conforme instruções do fabricante, e as demais por 4 semanas. Não houve diferenciação osteogênica, fato confirmado através da marcação com o corante *Alizarin Red S* (Figura 10B). Posteriormente, outras culturas (SM04p7 e SM10p7) foram induzidas por 3 semanas e houve diferenciação (Figura 10D), fato confirmado através da marcação com o corante *Alizarin Red S*. As culturas foram induzidas com o mesmo meio, porém de lotes diferentes. As quatro primeiras amostras foram induzidas com um lote mais antigo, a não diferenciação pode ser devido à degradação de alguns componentes do meio, o que altera a concentração dos indutores de diferenciação.

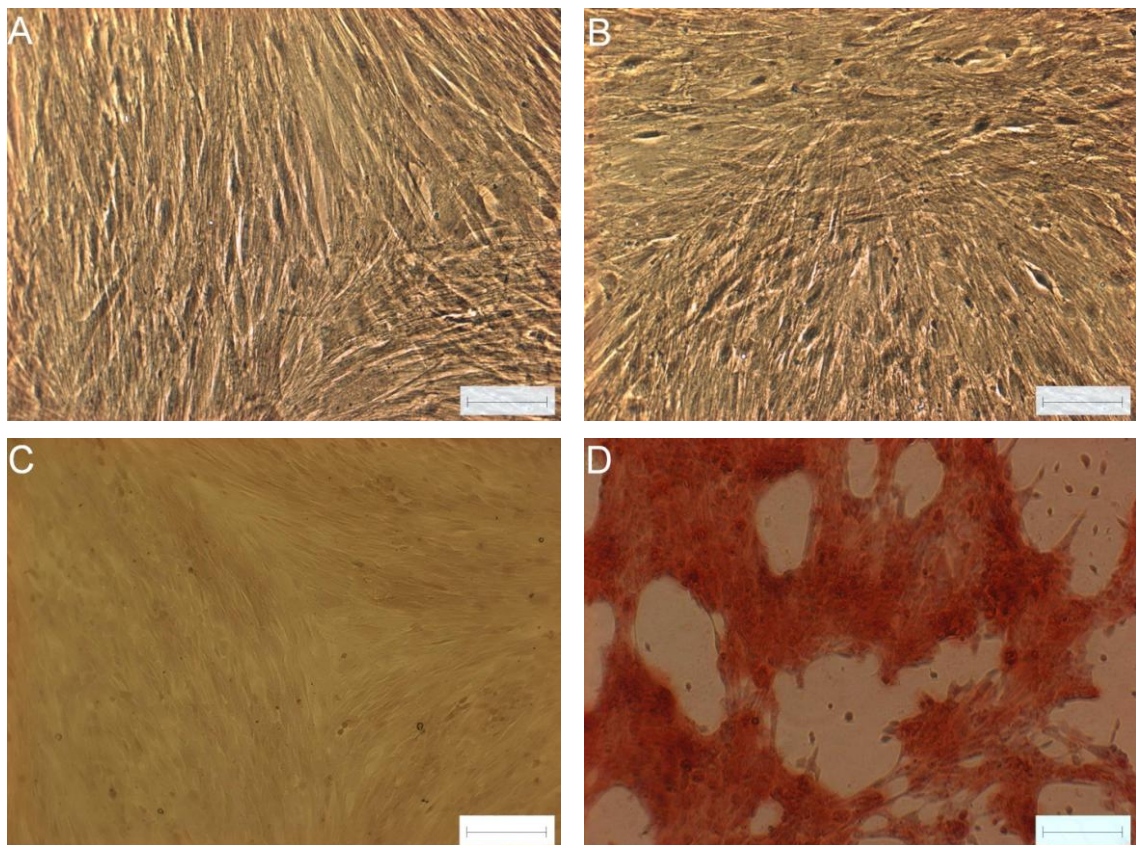


Figura 10 - Figura 10 - Células isoladas de sangue menstrual induzidas à osteogênese marcadas com *Alizarin Red S*. **(A)** e **(C)** Culturas controle não induzidas cultivada em meio MSC-BM (Lonza). Microscopia de contraste de fase. **(B)** e **(D)** Culturas induzidas com *Osteogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza). Microscopia de campo claro. Barras A e B= 100µm. C e D= 200µm.

A indução condrogênica foi realizada com três diferentes amostras (SM07p7, SM08p7 e SM09p6), por 21 dias. O processamento e avaliação estão em andamento.

Diante destes resultados, constatou-se que a população isolada de SM tem a capacidade de diferenciar em adipócitos e em osteoblastos, enquanto a diferenciação condrogênica ainda será avaliada.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos indicam que algumas culturas estabelecidas a partir de células isoladas do sangue menstrual, através do protocolo descrito neste trabalho, correspondem imunofenotipicamente a CTMs. Embora a população obtida tenha sido capaz de diferenciar em adipócitos e em osteoblastos através dos métodos empregados, os resultados ainda não são conclusivos, já que nem todos os experimentos necessários para a confirmação dos critérios mínimos para a identificação de uma população celular como sendo CTMs foram realizados.

Futuramente, também será realizada análise da expressão gênica de marcadores característicos de cada uma das três linhagens induzidas à diferenciação por RT-PCR (PPARG2, fosfatase alcalina e colágeno tipo II para diferenciação adipo-, osteo- e condrogênica, respectivamente) e de marcadores relacionados à pluripotência das células-tronco, como Oct4, Sox2 e Nanog.

O tempo de duplicação calculado para as células obtidas neste estudo está de acordo com dados demonstrados em outros trabalhos e é mais um indicativo de que as células obtidas seriam CTMs.

Os dados de ciclo celular revelaram que a maior parte das células se acumula em G1 após entrarem em confluência, ou seja, a maior parte das células não está se replicando. Este resultado está de acordo com outros dados publicados que demonstram que as células-tronco apresentam inibição do crescimento ao entrarem em confluência.

Para que seja confirmado que as células isoladas do sangue menstrual são CTMs são necessários mais testes e a repetição de alguns procedimentos já realizados, para isso é necessária a adesão de mais doadoras. Embora a coleta do sangue menstrual seja indolor e o procedimento possa ser considerado não invasivo em termos clínicos, acaba sim sendo invasivo se for levado em conta que se trata de um procedimento que invade a intimidade da mulher. Talvez por este motivo, o número de doadoras participantes não tenha sido satisfatório para este trabalho.

Com maior número amostral, o protocolo poderá ser otimizado para que ocorra enriquecimento de CTMs nas culturas obtidas e o trabalho com CTM-SM poderá se tornar rotineiro no Instituto Carlos Chagas (ICC). Para que isso ocorra, as vantagens

de se trabalhar com esse material deve ser melhor divulgada, não só dentro do ICC mas também em veículos de mídia.

BIBLIOGRAFIA

ALLICKSON, J. G.; SANCHEZ, A.; YEFIMENKO, N.; BORLONGAN, C. V.; SANBERG, P. R. **Recent studies assessing the proliferative capability of a novel adult stem cell identified in menstrual blood.** *Open Stem Cell J.* 3:4–10, 2011.

BIANCO, P. **Back to the Future: Moving Beyond “Mesenchymal Stem Cells”.** *Journal of Cellular Biochemistry* 112:1713–1721, 2011.

BONFIELD, T.; NOLAN (KOLOZE), M. T.; LENNON, D. P.; CAPLAN, A. I. **Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo.** *Journal of Inflammation* 7:51, 2010.

BORLONGAN, C. V.; KANEKO, Y.; MAKI, M.; YU, S.; ALI, M. ; ALLICKSON, J. G.; SANBERG, C. D.; KUZMIN-NICHOLS, N.; SANBERG, P. R. **Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke.** *Stem Cells Dev.* 19(4):439–452; 2010.

BYDLOWSKI, S.; DEBES, A.; MASELLI, L.; JANZ, F. **Características biológicas das células-tronco mesenquimais.** *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 31: 25-35, 2009.

CAPLAN , A. I.; DENNIS J. E. **Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators.** *Journal of Cellular Biochemistry* 98:1076–1084, 2006.

CUI, C. H.; UYAMA, T.; MIYADO, K.; TERAJ, M.; KYO,S.; KIYONO, T. e UMEZAWA, A. **Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation.** *Molecular Biology of the Cell* 18:1586-94, 2007.

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

HIDA, N.; NISHIYAMA, N.; MIYOSHI, S.; KIRA, S.; SEGAWA, K.; UYAMA, T.; MORI, T.; MIYADO, K.; IKEGAMI, Y.; CUI, C.; KIYONO, T.; KYO, S.; SHIMIZU, T.; OKANO, T.; SAKAMOTO, M.; OGAWA, S. e UMEZAWA, A. **Novel Cardiac Precursor-Like Cells from Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells.** *Stem Cells* 26:1695-704, 2008.

LIN, J.; XIANG, D.; ZHANG, J.; ALLICKSON, J.; XIANG, C. **Plasticity of human menstrual blood stem cells derived from the endometrium.** *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 12(5):372-380, 2011.

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

MINGUELL, J.; ERICES, A.; CONGET, P. **Mesenchymal Stem Cells.** *Exp Biol Med* 226(6):507-520, 2001.

MUSINA, R.A.; BELYAVSKI, A.V.; TARUSOVA, O.V.; SOLOVYOVA, E.V. e SUKHIKH, G.T. **Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine: Cell Technologies in Biology and Medicine* 145:539-543, 2008.

PASSIER, R.; MUMMERY, C. **Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair.** *Cardiovascular Research* 58: 324–335, 2003.

PATEL, A.; N., PARK, E.; KUZMAN, M.; BENETTI, F.; SILVA, F.J. e ALLICKSON, J.G. **Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation.** *Cell Transplant* 17:303-311, 2008.

PATEL, A. e SILVA, F. **Menstrual Blood Stromal Cells: The potential for Regenerative Medicine.** *Regen Med* 3 (4): 443-444, 2008.

SCHÜRING, A. N.; SCHULTE, N.; KELSCH, R.; RÖPKE, A.; LUDWIG, K.; GÖTTE, M. **Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics.** *Fertility and Sterility* 95(1), 2011.

da SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDIA, N. B. **In Search of the in vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells.** *Stem Cells*. 26(9):2287-99, 2008.

da SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.; NARDI, N. **Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually all Post-natal Organs and Tissues.** *Journal of Cell Science* 119, 2204-2213, 2006.

da SILVA MEIRELLES, L.; FONTES, A. M., COVAS, D. T., CAPLAN, A. I. **Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells.** *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20:419–427, 2009

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. **Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds.** *Stem Cell Research & Therapy* 1:30, 2010

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial – Engenharia Bioquímica.** Vol.2, 1ªed, Ed Edgard Blücher, São Paulo, 2001.

TOYODA, M.; CUI, C.; UMEZAWA, A. **Myogenic transdifferentiation of menstrual blood-derived cells.** *Acta Myol* 26:176-178, 2007.

TROUNSON A. **Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types.** *Reprod Biomed*, 4 (1): 58-63, 2002.

WAGERS, J. e WEISSMAN, I. **Plasticity of Adult Stem Cells.** *Cell*, 116: 639- 648, 2004.

WAGNER, J.; KEAN, T.; YOUNG, R.; DENNIS J. E.; CAPLAN A. I. **Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics.** *Current Opinion in Biotechnology* 20:531–536, 2009.

WATT, F.M. e HOGAN, B.L.M. **Out of Eden: stem cells and their niches.** *Science*. 287(5457):1427-30, 2000.

ZHONG, Z.; PATEL, A. N.; ICHIM, T. E.; RIORDAN, N. H.; WANG, H.; MIN, W.; WOODS, E. J.; REID, M.; MANSILLA, E.; MARIN, G. H.; DRAGO, H.; MURPHY, M. P.; MINEV, B. **Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells.** *Journal of Translational Medicine*, 7:15, 2009.

APÊNDICE 1 – Lista de anticorpos

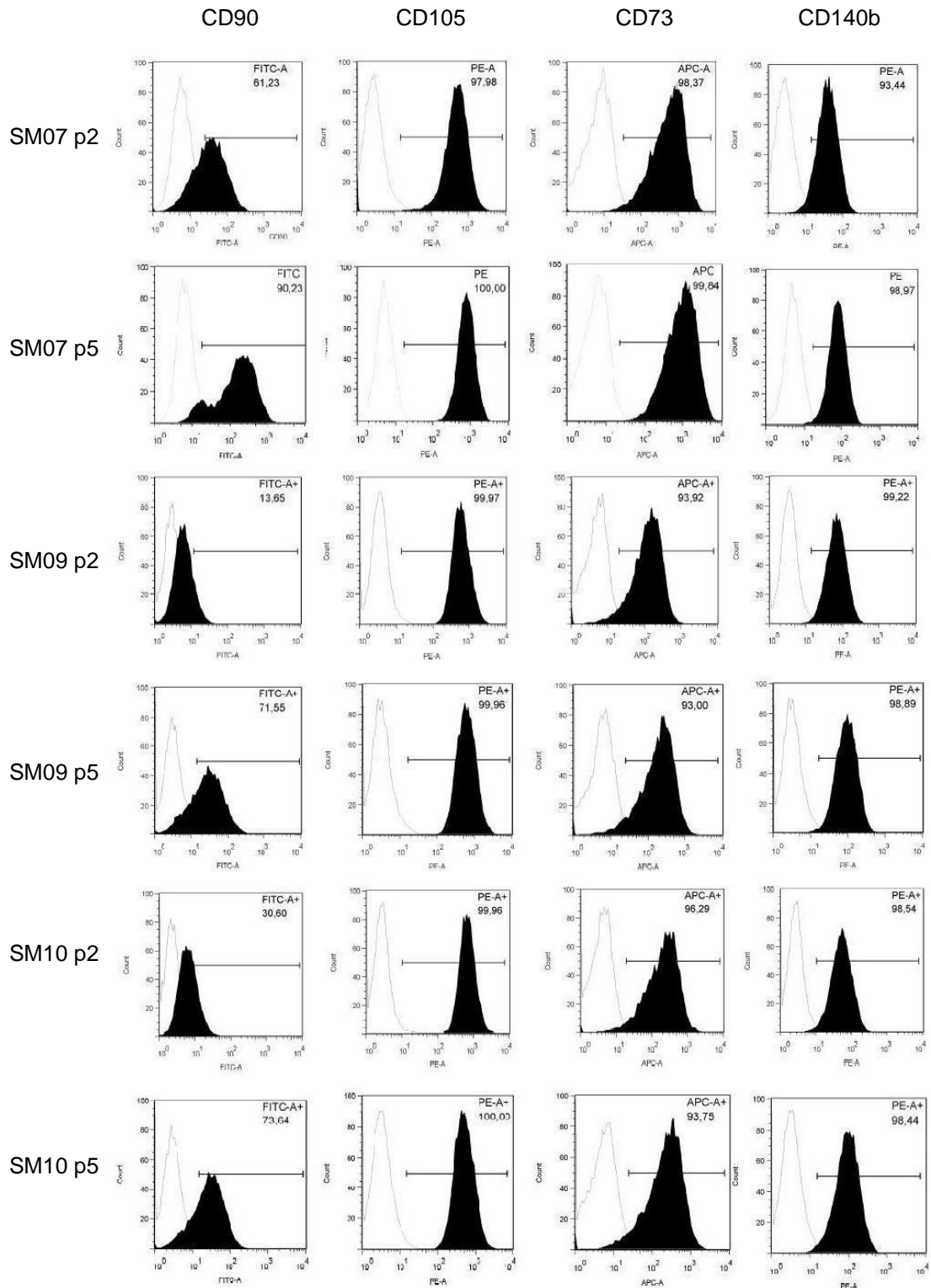
Sigla oficial(a)	Nome completo do gene tal qual descrito no NCBI	Isotipo	Apresentação	Fabricante	Diluição
THY1 (CD90)	Thy-1 cell surface antigen	Monoclonal de camundongo, IgG	FITC	E-Bioscience	1:20
THY1 (CD90)	Thy-1 cell surface antigen	Monoclonal de camundongo, IgG	APC	E-Bioscience	1:100
ITGAM (CD11b)	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	E-Bioscience	1:100
CD19	CD19 molecule	Monoclonal de camundongo, IgG	FITC	E-Bioscience	1:100
HLADR A	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	Monoclonal de camundongo, IgG	APC	E-Bioscience	1:100
PDGFR B (CD140b)	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	Becton Dickinson	1:100
CD34	CD34 molecule	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	Becton Dickinson	1:100
NT5E (CD73)	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	Monoclonal de camundongo, IgG	APC	E-Bioscience	1:100
ENG (CD105)	endoglin	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	E-Bioscience	1:100

^a Nome mais usual, quando aplicável.

Isotiocinato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina-P (PE), alofocianina (APC), ficoeritrina-P/cianina 7 (PE-Cy7).

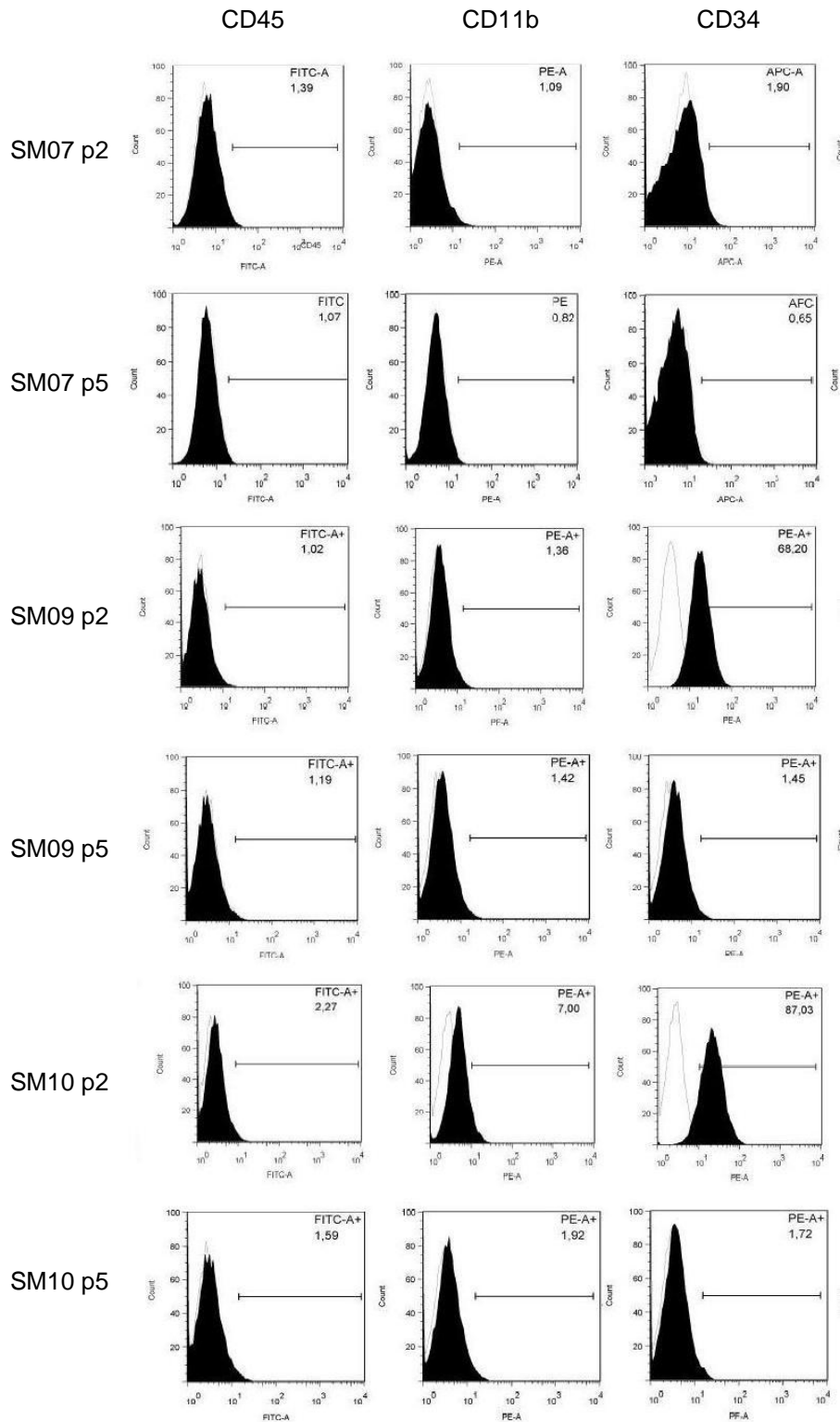
APÊNDICE 2 - Imunofenotipagem

Antígenos positivos



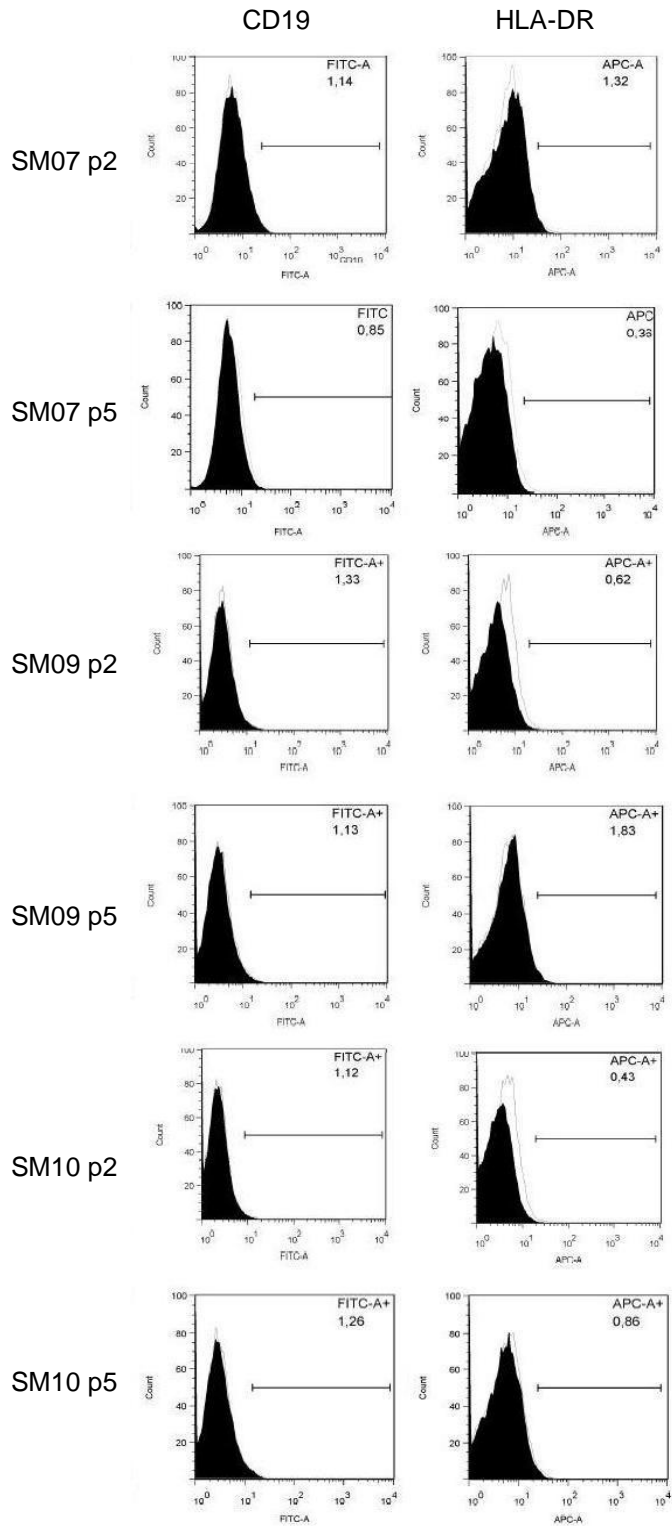
A PÊNDICE 2 – Imunofenotipagem

Antígenos negativos



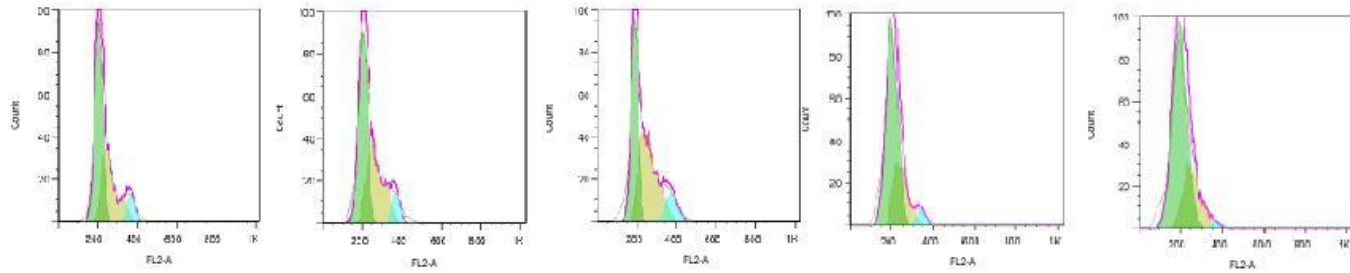
APÊNDICE 2 - Imunofenotipagem

Antígenos negativos

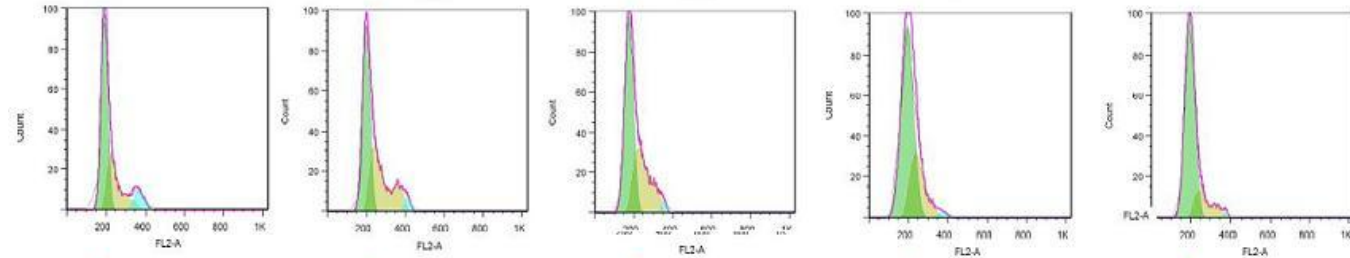


APÊNDICE 3 - Ciclo Celular

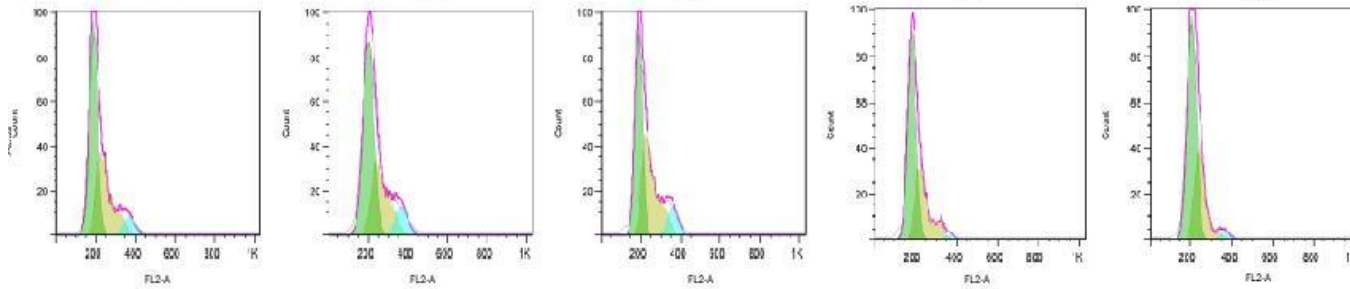
SM04 p7



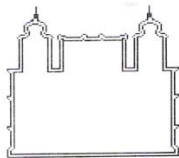
SM09 p7



SM10 p7



ANEXO 1



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 22 de agosto de 2011.

PARECER

Título do Projeto: “Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais adultas: aplicação em terapias celulares do sistema cardiovascular”

Protocolo CEP: 419/07

Pesquisador Responsável: Samuel Goldenberg

Instituição: ICC – Instituto Carlos Chagas/Fiocruz/PR

Foram apresentados e submetidos à apreciação do CEP/FIOCRUZ o relatório de atividades, adendo e documentos atualizados ao projeto original do projeto supra mencionado, ambos APROVADOS.

Patricia T. Bozza

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz

ANEXO 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Carlos Chagas – ICC –
Fiocruz-PR



Instituto
Carlos
Chagas

**CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DO POTENCIAL DE
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS:
APLICAÇÃO EM TERAPIAS CELULARES DO SISTEMA CARDIOVASCULAR
(folha 01)
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

1 - Eu, _____, RG _____, entendo que estou sendo convidada a participar do projeto chamado: “Isolamento e Caracterização de Células-Tronco Mesenquimais do Sangue Menstrual” e que a minha participação é voluntária.

2 - As células-tronco são células que possuem a capacidade de se dividir e de se diferenciar em outros tipos celulares que formam tecidos do corpo tais como ossos, nervos, músculos e sangue. Devido a essa característica, as células-tronco possuem uma potencial aplicação terapêutica, sendo úteis para uso em terapia celular de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes tipo-1, acidentes vasculares cerebrais, doenças hematológicas, traumas na medula espinhal e nefropatias. O principal objetivo das pesquisas com células-tronco é usá-las para recuperar tecidos danificados. Para isso é necessário compreender os mecanismos que levam a diferenciação dessas células em diferentes tecidos adultos. Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido no Instituto de Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR e que os pesquisadores estão empenhados na pesquisa básica da capacidade das células-tronco mesenquimais de se transformar em células adultas de diversos tecidos.

3 - Eu entendo que o volume total de **sangue menstrual** coletado para o projeto “Isolamento e Caracterização de Células-Tronco Mesenquimais do Sangue Menstrual”, será destinado para esta pesquisa. As células obtidas serão apenas estudadas em laboratório e **não serão utilizadas para qualquer fim terapêutico ou comercial.**

4 - Eu entendo que dados como idade, peso, altura e informações tais como uso de medicamentos são necessários para o andamento da pesquisa e fornecerei esses dados pelo preenchimento de um formulário.

5 - Eu entendo que, no momento da publicação dos resultados obtidos nesta pesquisa, não aparecerá meu nome e sim um código, justamente para preservar minha identidade.

6 - Eu li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidada a participar e concordo voluntariamente em participar.

Curitiba, _____ / _____ / _____

Assinatura da participante _____

Assinatura do responsável _____

Assinatura do pesquisador _____

Instituto Carlos Chagas – ICC – Fiocruz - PR
Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 – CIC
CEP 81350 010 – Curitiba – Paraná – Brasil. Tel: +55 41 3316-3230



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Carlos Chagas – ICC –
Fiocruz-PR



(folha 02)

(Não preencher)

CÓDIGO: _____

DATA: ____ / ____ / ____

DADOS DA AMOSTRA:

1) Momento em que a amostra foi coletada durante o período menstrual (1º dia da menstruação, 2º dia...):

2) Quanto tempo decorreu entre a coleta e a entrega do material?

DADOS DA DOADORA:

1) Nome: _____

2) Data de nascimento: ____ / ____ / _____

3) Peso: _____

4) Altura: _____

5) Ganha peso com facilidade? () Sim () Não

6) Possui diabetes? () Sim () Não

7) Uso de anticoncepcional? () Sim () Não Se sim, qual? _____

8) Possui filhos? () Sim () Não

9) Dificuldade para engravidar? () Sim () Não () Não sei

10) Fuma? () Sim () Não

11) Outras informações (doenças, alergias, uso de medicamentos) ou observações:
