

Cristiane Sampaio de Mara

Condrogênese a partir de células Mesenquimais do cordão umbilical humano estimuladas com IGF-1, TGF- β 3, BMP-6 e BMP-2 em sistema de cultura *monolayer* e *micromass*

Tese de doutorado apresentada à pós graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas

Orientador: Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

Campinas

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELABIBLIOTECA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M323e Mara, Cristiane Sampaio de
Condrogênese a partir de células mesenquimais do cordão umbilical humano estimuladas com IGF-1, TGF- β 3, BMP-6 e BMP-2 em sistema de cultura monolayer e micromass / Cristiane Sampaio de Mara. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Ibsen Bellini Coimbra
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Células-tronco. 2. Condrócitos. 3. Colágeno. 4. Moléculas de adesão celular. 5. Osteoartrite. I. Coimbra, Ibsen Bellini. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Chondrogenesis from Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Cells stimulated with TGF-beta3, IGF-1, BMP-2 and BMP-6

Keywords: • Stem cells
• Chondrocytes
• Collagen
• Cell adhesion molecules
• Osteoarthritis

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra
Prof. Dr. Adil Muhib Samara
Prof. Dr. Manoel de Barros Bértolo
Prof. Dr. Eduardo Borbas
Profa. Dra. Márcia Uchoa de Rezende

Data da defesa: 30-11-2009

Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado

Orientador: Ibsen Bellini Coimbra

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Márcia Uchoa de Rezende

2. Prof. Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto

3. Prof. Dr. Adil Muhib Samara

4. Prof. Dr. Manoel Barros Bertolo

5. Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

Curso de Pós Graduação em Clínica Médica, área de
concentração Ciências Básicas, da faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Campinas, 30 de novembro de 2009.

04520002140

Dedicatória

Reinaldo e Bruna, persistência, fé e esperança fez toda a diferença. Persistência para não desistir, mesmo na mais profunda frustração, quando tudo nos leva a crer que não vai dar certo! Fé de que qualquer que seja o resultado ou situação, Deus sempre cuida de nós. E esperança porque esse Deus nos ama e sempre dispõe de uma saída. Que bom que nunca estive só e sempre tive o cuidado de vocês na minha vida. Isso me deu forças para vencer meus limites e concretizar este trabalho.

Agradecimentos

Agradeço, primeiro de tudo, a Deus que me capacitou, me conduziu, me confortou, durante todo o desenvolvimento deste trabalho e a todas as mães que concordaram em doar o sangue do cordão umbilical, fazendo com que esse trabalho se concretizasse.

Ao Professor Dr. Ibsen Bellini Coimbra, que me ensinou a fazer ciência. Um orientador presente, centrado. Incondicionalmente disposto a ajudar, mesmo nos momentos em que a saúde estava comprometida. Ilustre pesquisador, cientista e ser humano. Um exemplo a ser seguido por aqueles que praticam e amam a ciência.

Agradeço também ao meu esposo Reinaldo Martins, que sempre lutou muito comigo, dividindo todas as alegrias, tristeza e conquistas. Sempre fiel companheiro e amigo de todas as horas, suprimindo muito além de todas as minhas necessidades, sejam elas, emocionais, espirituais ou materiais. Um homem de princípios, que certamente faz de mim uma pessoa melhor.

Agradeço também aos meus pais, Fábio e Maria Helena, por terem lutado por minha formação, tanto como ser humano, como também como profissional. Certamente bons exemplos são mais preciosos do que palavras.

Ao Prof. Dr. Adil Muhib Samara que me abriu as portas para pós-graduação e sempre me acompanhou desde o mestrado. Um homem que nos serve de inspiração na dedicação a ciência médica.

À querida amiga Adriana S. S. Duarte, pelo apoio, pelas discussões tão enriquecedoras sobre células tronco, continuamente se aprofundando e superando as questões. Uma bióloga dedicada e estudiosa que me motivou e me aprofundou na biologia molecular.

Às minhas colegas de bancada Angélica Sartori, Carolina Zuliane, Tais Tornatore que suportaram todos os meus rompantes de tristeza, frustração e ansiedade. E mais que tudo isso, vibraram quando finalmente conseguimos, fazendo com que o trabalho fosse mais divertido e descontraído.

Ao Prof. Dr. Kleber pela gentileza de também nos acolher em seu laboratório cedendo a máquina de PCR em Tempo real; ao Dr. Marcio A.C. Pedro e ao Prof. Dr. Fabio Menezes que nos forneceram cartilagem para que tivéssemos um controle, ao Dr. André L. L. Andrade que nos motivou nesta linha de pesquisa e a Dra. Ângela Luzo por nos ceder parte das bolsas de sangue de cordão umbilical que não se enquadravam para armazenamento no banco.

“⁸ O amor nunca perece; mas as profecias desaparecerão, as línguas cessarão, o conhecimento passará. ⁹Pois em parte conhecemos e em parte profetizamos;”

I Co 13-8:9 - *NVI*

Sumário

<i>Lista de abreviatura</i>	11
<i>Lista de Tabela</i>	13
<i>Lista de Figuras</i>	14
<i>Lista de Gráficos</i>	15
<i>Resumo</i>	16
<i>Abstract</i>	18
<i>Introdução</i>	19
1. <i>Células tronco</i>	20
2. <i>Sistemas de cultura</i>	21
3. <i>Superfamília TGF</i>	21
4. <i>Condrogênese e caderina</i>	22
5. <i>Dexametasona</i>	25
6. <i>Acido Ascórbico</i>	26
7. <i>Sox-9</i>	27
<i>Objetivos</i>	30
1. <i>Objetivo Geral</i>	31
2. <i>Objetivo Específico</i>	31
<i>Hipótese e Justificativa</i>	32
1. <i>Hipótese</i>	33
2. <i>Justificativa</i>	33
<i>Materiais e Métodos</i>	34
1. <i>Coleta do Sangue do Cordão</i>	35
2. <i>Processamento do Sangue</i>	36
3. <i>Citometria de Fluxo</i>	37
4. <i>Diferenciação celular</i>	38
5. <i>Proteínas no meio de cultura</i>	39

6. <i>Western Blotting</i>	40
7. <i>Extração de RNA e síntese de cDNA</i>	40
8. <i>RT-PCR em tempo real</i>	41
<i>Resultados</i>	44
1. <i>Isolamento, expansão e caracterização das células</i>	45
2. <i>Citometria de Fluxo</i>	46
3. <i>Transcrição reversa</i>	47
4. <i>Curva de eficiência</i>	48
5. <i>RT-PCR em tempo real</i>	50
5.1 <i>Expressão do colágeno tipo II</i>	50
5.1.1 <i>Células estimuladas com TGF β_3</i>	51
5.1.2. <i>Células estimuladas com IGF-1</i>	51
5.1.3 <i>Células estimuladas com BMP-2</i>	52
5.1.4 <i>Células estimuladas com BMP-6</i>	53
5.2 <i>Expressão do Agrecano</i>	55
5.2.1 <i>Células estimuladas com TGF β_3</i>	55
5.2.2. <i>Células estimuladas com IGF-1</i>	56
5.2.3 <i>Células estimuladas com BMP-2</i>	57
5.2.4 <i>Células estimuladas com BMP-6</i>	58
5.3 <i>Expressão do Sox-9</i>	59
5.2.1 <i>Células estimuladas com TGF β_3</i>	59
5.2.2. <i>Células estimuladas com IGF-1</i>	60
5.2.3 <i>Células estimuladas com BMP-2</i>	61
5.2.4 <i>Células estimuladas com BMP-6</i>	62
6. <i>Western Blotting</i>	62
6.1 <i>Colágeno tipo II com TGF β_3</i>	62
6.2 <i>Colágeno tipo II com IGF-1</i>	62
6.3 <i>Colágeno tipo II com BMP-2</i>	63
6.4 <i>Colágeno tipo II com BMP-6</i>	63
<i>Discussão</i>	65

<i>Conclusão</i>	76
<i>Referências Bibliográficas</i>	78
<i>Anexos</i>	89
1. <i>Parecer comitê de ética em pesquisa CAISM</i>	90
2. <i>Parecer comitê de ética em pesquisa Maternidade de Campinas</i>	91
3. <i>Termo de consentimento livre e esclarecido</i>	92
<i>Apêndice</i>	93
1. <i>Trabalho apresentado no EULAR – 2009</i>	94
2. <i>Artigo submetidos a publicação “Chondrogenesis from umbilical Cord blood Cells stimulated with BMP-2 and BMP- 6”</i>	96
3. <i>Artigo submetidos a publicação “Periosteum as a source of pluripotent mesenchymal stem cells: TGF-β3 effects on cell differentiation”</i>	97
4. <i>Artigo submetidos a publicação “Regulation of Chondrogenesis by TGF-β3 and IGF-1 from human Mesenchymal Umbilical Cord Blood Cells”</i>	98

Lista de Abreviatura

BMP-2	Bone Morphogenetic Protein -2 - do Inglês Proteína Morfogênica do osso – 2
BMP-6	Bone Morphogenetic Protein -6 - do Inglês Proteína Morfogênica do osso – 6
CAISM	Centro de Atendimento Integrado à Saúde da Mulher
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
COMP	Proteína oligomérica da matriz cartilaginosa
CPDA	Citrato-fosfato-dextrose-adenina
CT	Cycle Threshold – do inglês Começo do ciclo
DEPC	Dietilpirocarbonado
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DNase	Desoxiribonuclease
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase – do inglês Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 – do Inglês Fator de crescimento semelhante à Insulina – 1
ITS 1 ⁺	Insulin-transferrin-selenium
MEC	Matriz extra-celular
OA	Osteoartrite
PBS	Phosphate buffer saline - do inglês

	Tampão de fosfato salino
Primers	Iniciadores
qRT-PCR	Transcrição reversa de Reação da cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis - do inglês electroforese em gel de poliacrilamida - Sodium dodecil sulfato
Sox-9	SRY (sex determining region Y)-box 9
TGF - β 3	Transforming Growth Factor β 3 – do Inglês Fator de crescimento transformador – β 3

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1:</i>	<i>Seqüência dos primers (iniciadores) para reação de RT-PCR em tempo real</i>	43
------------------	--	-----------

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema de Proteínas envolvidas na condrogênese	23
Figura 2:	Fases da expressão do Sox-9.....	28
Figura 3:	3.1 Coleta do sangue do cordão	35
	3.2 Coleta do sangue do cordão	35
Figura 4:	Bolsa de sangue com o anticoagulante	36
Figura 5:	Separação de células mononucleares	36
Figura 6:	Células semeadas em garrafas de cultura	37
Figura 7	Processo de Citometria de Fluxo	38
Figura 8:	Células em cultura	46
Figura 9:	Citometria de Fluxo	47
Figura 10:	Gel de agarose a 2% - RNA	48
Figura 11:	Curva de eficiência e dissociação dos primers em diferentes concentrações.....	49
Figura 12	Curva de eficiência para quantidade de cDNA	50
Figura 13	Amplificação do colágeno tipo II	54
Figura 13.1	Curva de dissociação	55
Figura 14	Western Blotting – células estimuladas com TGF- β_3	62
Figura 15	Western Blotting – Células estimuladas com IGF-1	63
Figura 16	Western Blotting – Células estimuladas com BMP-2	63
Figura 17	Western Blotting – Células estimuladas com BMP-6	63

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Expressão do colágeno, no nível gênico, nas células estimuladas com TGF- β_3	51
Gráfico 2	Expressão do colágeno, no nível gênico, nas células estimuladas com IGF-1	52
Gráfico 3	Expressão do colágeno, no nível gênico, nas células estimuladas com BMP-2	53
Gráfico 4	Expressão do colágeno, no nível gênico, nas células estimuladas com BMP-6	54
Gráfico 5	Expressão do Agrecano, no nível gênico, nas células estimuladas com TGF β_3	56
Gráfico 6	Expressão do Agrecano, no nível gênico, nas células estimuladas com IGF-1	57
Gráfico 7	Expressão do Agrecano, no nível gênico, nas células estimuladas com BMP-2	58
Gráfico 8	Expressão do Agrecano, no nível gênico, nas células estimuladas com BMP-6	59
Gráfico 9	Expressão do Sox-9, no nível gênico, nas células estimuladas com TGF β_3	60
Gráfico 10	Expressão do Sox-9, no nível gênico, nas células estimuladas com IGF-1	61
Gráfico 11	Expressão do Sox-9, no nível gênico, nas células estimuladas com BMP-2	61

RESUMO



Resumo. O sangue do cordão umbilical contém células tronco mesenquimais (CTM) indiferenciadas que tem potencial condrogênico e podem ser usadas para reparo de lesão articular. Durante o processo de condrogênese, a atuação de fatores de crescimento ainda não está totalmente elucidada. Este estudo teve como objetivo avaliar a formação de condrócitos, matriz cartilaginosa e colágeno tipo II a partir de células do sangue do cordão umbilical humano, expondo-as a quatro diferentes fatores de crescimento: TGF- β 3, IGF-1, BMP-2 e BMP-6 e cultivando-as em *micromass* e *monolayer*. **Métodos:** Sangue do cordão umbilical foi obtido de gestantes a termo. Células mononucleares foram separadas e colocadas em cultura, para expansão, caracterizadas por citometria de fluxo com anticorpos específicos para CTM e induzidas a diferenciação condrogênica, com TGF- β 3, IGF-1, BMP-2 e BMP-6 em *micromass* e *monolayer*. O fenótipo das células foi avaliado após 21 dias por RT-PCR e Western Blotting para identificação de Colágeno tipo II, Sox-9 e Agrecano. **Resultados:** As células expandidas foram caracterizadas como mesenquimais. A expressão do mRNA para colágeno tipo II e agrecano foi expresso a partir do 14º dia, nas células estimuladas com TGF- β 3, IGF-1, BMP-2 e BMP-6. O fator de transcrição SOX-9 foi expresso pelas células estimuladas com TGF- β 3, IGF-1 e BMP-2, o que mostra que estes fatores de crescimento estão associados com a condrogênese de condrócitos articulares, enquanto que a BMP-6 está associada a condrogênese de condrócitos hipertróficos. No Western Blotting, nós encontramos colágeno tipo II em todos os grupos e a maior expressão foi observada no 14º dia nas células estimuladas com TGF- β 3 em sistema de cultura em *micromass*. Estes resultados mostram que o TGF- β 3 usado em micromass é o melhor fator de crescimento para promover a diferenciação e proliferação celular das células mesenquimais do sangue do cordão umbilical. Embora mais estudos sejam necessários, este fato nos aproxima de uma alternativa para transplantes autólogos.

Abstract. Umbilical cord blood contains undifferentiated mesenchymal stem cells (MSCs) with chondrogenic potential that may be used for the repair of joint damage. The role of growth factors during the process of chondrogenesis is still not entirely understood. The objective of this study was to evaluate the formation of chondrocytes, cartilaginous matrix and type II collagen from human umbilical cord blood stem cells exposed to four different growth factors, TGF- β 3, IGF-1, BMP-6 and BMP-2, while being cultured as a micromass or a monolayer. Umbilical cord blood was obtained from full-term deliveries, and then mononuclear cells were separated and cultured for expansion. Afterwards, these cells were induced to chondrogenic differentiation in micromass and monolayer cultures supplemented with TGF- β 3, IGF-1, BMP-2 and BMP-6. Cellular phenotype was evaluated after 7, 14 and 21 d by RT-PCR and western blot analysis to identify type II collagen, Sox-9 and Aggrecan. The expanded cells displayed surface antigens characteristic of mesenchymal progenitor cells and were negative for hematopoietic differentiation antigens. Type II collagen and aggrecan mRNAs were expressed from day 14 in cells stimulated with TGF- β 3, IGF-1, BMP-2 or BMP-6. The Sox-9 transcription factor was expressed in cells stimulated with TGF- β 3, IGF-1 and BMP-2, which demonstrates those are associated with chondrogenesis in joint chondrocytes while BMP-6 is associated with the chondrogenesis of hypertrophic chondrocytes. Type II collagen was demonstrated by western blotting in all groups, and the greatest expression was observed 14 d after cells were stimulated with TGF. The results of this study demonstrate that TGF- β 3 used in micromass culture is the best growth factor for promoting the proliferation and differentiation of mesenchymal cells from UCB during chondrogenesis. Although more studies are needed, this approach may provide an alternative to autologous grafting.

Introdução

Introdução

1. Células tronco

Uma cadeia de processos ordenada e altamente regulada, envolvendo proliferação, migração, diferenciação e maturação celular levam a produção e suporte da maioria das linhagens celulares em indivíduos adultos. O tipo celular mais primário desta cadeia são as chamadas células tronco (Minguell, Erices et al. 2001).

Células tronco são células indiferenciadas, pluripotentes que possuem habilidade de diferenciação, auto-renovação e expansão. Na última década, diferentes estudos (Alison, Poulsom et al. 2002; Pan, Han et al. 2002; Bunnell, Deng et al. 2005; Huang, Kazmi et al. 2005; Cetrulo 2006; Yamanaka, Li et al. 2008) demonstraram a plasticidade destas células em recuperar tecidos lesados e até mesmo formar um novo órgão. A multipotencialidade, a possibilidade de isolamento e a cultura “*in vitro*”, fazem destas células uma ferramenta terapêutica atrativa usando sua aplicação clínica na terapia celular. Entretanto, para expressar seu programa de diferenciação, as células tronco devem residir num ambiente apropriado (Watt and Hogan 2000).

Apesar de todas as linhagens celulares se iniciarem a partir de uma célula tronco, dando origem às demais células, durante o desenvolvimento de cada linhagem, elas se transformam em células tidas como células maduras, com características definidas, onde a capacidade de regeneração e diferenciação para outras linhagens diminui significativamente. Persiste ainda uma população remanescente de células progenitoras, que quando requisitada, inicia processo de regeneração do tecido. Estas células estão sendo descobertas em diferentes tecidos, mas grande parte, ainda sem marcador específico (Luzo 2005).

Células tronco mesenquimais, presentes no sangue do cordão umbilical, podem ser diferenciadas em alguns tipos celulares, incluindo adipócito, condrócitos, osteócitos, miócitos, entre outros (Goodwin, Bicknese et al. 2001; Bicknese, Goodwin et al. 2002; Lee, Kuo et al. 2004; Wang, Wang et al. 2004; Cetrulo 2006). Neste estudo, foi avaliada a qualidade da matriz extracelular produzida por estas células, em dois diferentes modelos de cultura, “*monolayer*” e “*micromass*” e com quatro tipos diferentes de fatores de crescimento descritos como envolvidos na condrogênese, dos quais três fazem parte da superfamília de fator de crescimento transformador: fator de crescimento transformador- β_3 (TGF- β_3), Proteína Morfogênica do Osso 6 (BMP-6) e Proteína Morfogênica do Osso -2 (BMP-2) e além desses também estudou-se o Fator de Crescimento Insulina-like -1 (IGF-1) (Boskey, Paschalis et al. 2002; Valcourt, Gouttenoire et al. 2002; Kim, Moon et al. 2003; Longobardi, O'Rear et al. 2006).

2. Sistema de Cultura

O sistema de cultura em *micromass* consiste em deixar as células numa alta concentração, num pequeno espaço, de forma que o crescimento das mesmas ocorre de maneira helicoidal. Desta forma as células são submetidas a um estresse e liberam moléculas de adesão que participam da condrogênese (Ahrens, Solursh et al. 1977; San Antonio and Tuan 1986). O sistema de cultura em *monolayer*, por sua vez, consiste em cultivar as células aderidas na placa de cultura, em uma camada única.

3. Superfamília TGF

A superfamília do TGF- β tem sido bem caracterizada por ter um importante papel no desenvolvimento do esqueleto (Centrella, Horowitz et al. 1994). Alguns autores demonstraram que estes fatores induzem à expressão de colágeno tipo II, mostrando que esses desempenham um papel importante no processo de condrogênese, mais

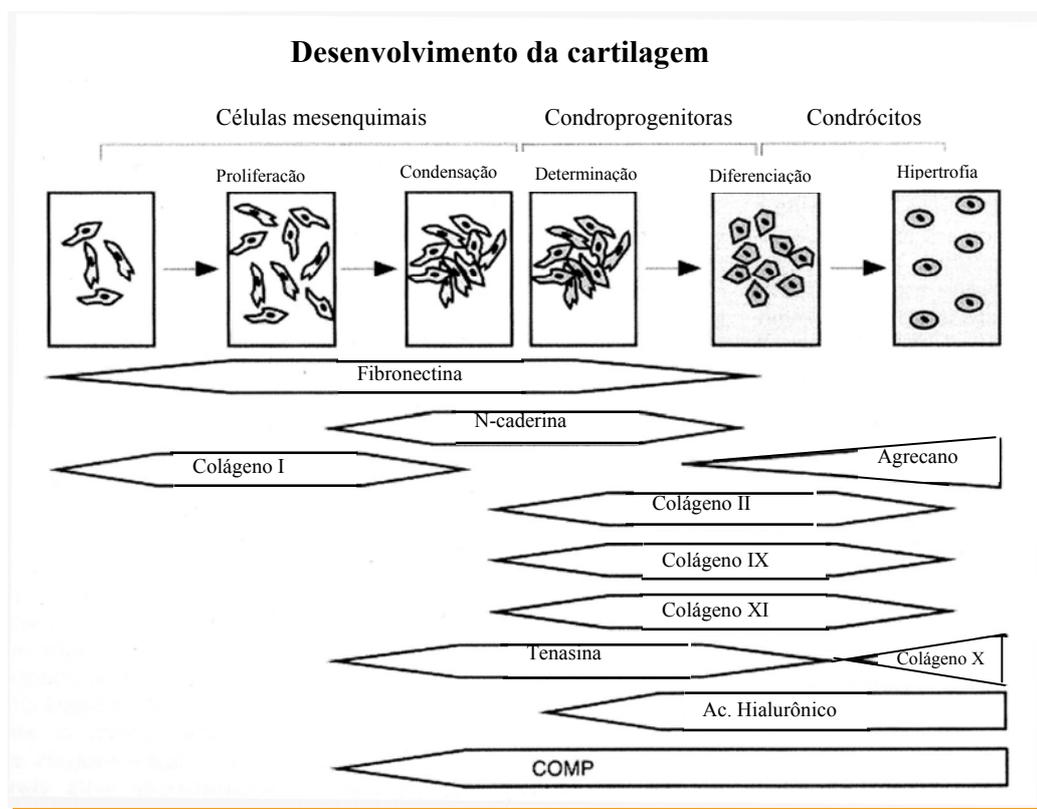
especificamente, a formação de condrócito articular (Fukumoto, Sperling et al. 2003; Shea, Edgar et al. 2003). Em um estudo prévio (Fukumoto, Sperling et al. 2003) pesquisadores usaram células mesenquimais de periósteo de coelhos submetendo-as a condrogênese em meio de cultura suplementado com IGF-1 e TGF- β e observaram a formação de condrócitos articulares. De maneira similar, outro grupo (Shea, Edgar et al. 2003), usando células de linhagem de ratos (C3H10T1/2) induziu a condrogênese expondo-as à BMP-2.

As BMPs formam um subgrupo de moléculas dentro da superfamília do TGF β e foram identificadas pela habilidade de promover formação ectópica de cartilagem e osso (Wozney 1989). Muitos sistemas *in vitro* têm sido estudados para investigar o papel e o caminho das BMPs nos estágios mais precoces da condrogênese, na fase de condensação destas células. Denker et al (Denker, Haas et al. 1999) induziram a condrogênese em células de rato C3H10T1/2 cultivando-as em sistema de cultura em *micromass* com meio de cultura condrogênico suplementado com BMP-2. Além disso, outro estudo (Park, Sugimoto et al. 2005) demonstrou que células progenitoras mesenquimais de sinóvia bovina podem ser induzidas à condrogênese quando expostas a BMP-2 e TGF- β 3. Ainda, em outro estudo concluiu-se que a BMP-2 aumenta a formação de osso e cartilagem, além de inibir a diferenciação celular para músculo, em cultura de células de linhagem de ratos (ROB-C26). (Yamaguchi, Katagiri et al. 1991)

4. Condrogênese e as caderinas

Para iniciação da condrogênese durante a embriogênese ou na sua indução *in vitro*, a condensação celular é um passo requerido, produzindo alterações na forma das células e na atividade da sinalização celular resultando no depósito de matriz cartilaginosa. (Modarresi, Lafond et al. 2005). Um membro da família das caderinas, a N-caderina, uma glicoproteína simples com peso molecular de 150 kD tem uma expressão mais intensa e trabalha como

molécula de adesão durante a formação dos condrocito. Esta proteína tem sido mostrada como essencial neste processo e é expressa de forma mais intensa em células C3H10T1/2 cultivadas em sistema de cultura de alta densidade – *micromass* - adicionado aos fatores de crescimento descritos acima conforme descrito por alguns autores (Oberlender and Tuan 1994; Oberlender and Tuan 1994; Haas and Tuan 1999). As caderinas representam um grupo de glicoproteínas funcionalmente responsáveis pelo mecanismo de adesão célula-célula dependente de cálcio. Esses compostos desempenham um papel na construção de tecidos e de todo o corpo do animal (Woodward and Tuan 1999). Algumas das principais proteínas envolvidas no processo da condrogênese estão esquematizadas na figura 1 (modificada de Shum L., et al (Shum, Coleman et al. 2003).



Modificado a partir de Shum L., et al., *Birth Defects Res* 69:102-122, 2003

Figura 1. Esquema das proteínas envolvidas na condrogênese

Neste diagrama esquemático de diferenciação celular em condrócito se observa as alterações da matriz extracelular. As células mesenquimais, primeiramente livres se proliferam e em seguida se condensam. Este processo é regulado por moléculas de adesão tais como a N-caderina que tem a sua produção aumentada especificamente durante a condensação celular. Quando a diferenciação é determinada, estas moléculas diminuem. A condensação destas células leva a determinação de que elas serão condroprogenitoras, ou seja, se diferenciarão em condrócitos e eventualmente podem se tornar hipertróficos. O processo de condrogênese é acompanhado pelo remodelamento da matriz extra celular (MEC). A produção de fibronectina, que é uma proteína de adesão que auxilia as células a se aderirem à MEC e estabelece ligações com outras moléculas, tais como o colágeno, aumenta durante a fase de proliferação mas diminui quando as células condroprogenitoras se diferenciam em condrócitos. A expressão do agregano na MEC aumenta quando o condrócito se diferencia e se torna hipertrófico. O colágeno tipo I está presente especificamente na matriz das células indiferenciadas e é substituído por colágeno tipo II quando as células progenitoras se diferenciam em condrócitos. O colágeno X está presente somente na MEC de condrócitos hipertróficos. A presença de tenasina na MEC aumenta durante a condensação mesenquimal, é mantida através da diferenciação celular condroprogenitora e é reduzida quando as células se diferenciam. Ácido hialurônico é encontrado na MEC de células condroprogenitoras e é mantido através dos condrócito hipertrófico. A expressão da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP) inicia-se na MEC na fase de condensação da células mesenquimais e permanece na hipertrofia celular (Shum, Coleman et al. 2003).

5. Dexametasona

Além dos fatores de crescimento da superfamília TGF β e o IGF-1, a dexametasona também é utilizada na condrogênese. Trata-se de um glicocorticóide que tem também função de influenciar a condrogênese e osteogênese em diferentes concentrações (Malladi, Xu et al. 2006). Entretanto o efeito da dexametasona não é totalmente entendido e gerou achados conflitantes. Malladi et al (Malladi, Xu et al. 2006) estudando células mesenquimais derivadas de tecido adiposo de camundongos compararam o desenvolvimento destas células na presença de dexametasona, ácido ascórbico e vitamina D e encontraram que a dexametasona inibe a diferenciação celular destas células de forma dose-dependente. Por outro lado Livne et al, (Livne and Weiss 1993) encontraram que a dexametasona exerce um efeito estimulatório na síntese de elementos da matriz articular de células de camundongos com idade de 6 a 12 meses considerados adultos e idosos.

Porém um efeito inibitório foi observado em células de camundongos jovens (de um a três meses), dessa forma, foi concluído neste estudo que a síntese de colágenos e outras proteínas da matriz pelos condrócitos de animais senescentes e maduros podem ser estimuladas pela dexametasona, variando a eficiência da resposta de acordo com a idade do animal. Outro grupo de pesquisadores (Awad, Halvorsen et al. 2003) estudou células adiposas humanas estimulando a condrogênese, dividindo-as em três grupos: o primeiro sem dexametasona e os dois últimos com duas concentrações diferentes. Avaliou-se a síntese de proteínas na matriz extracelular e foi encontrado que a dexametasona diminui a síntese e a acumulação de proteoglicanos.

No entanto um estudo mais recente (Bilgen, Orsini et al. 2007) onde foram analisadas células sinoviais de joelhos de ratos submetidas a diferenciação celular, encontrou-se que a dexametasona aumentou a produção de matriz extracelular, sendo

altamente regulador concomitantemente com outros fatores no meio de cultura, concordando com achados de outro autor (Shirasawa, Sekiya et al. 2006) que relata que a dexametasona adicionada com TGF- β_3 em meio condrogênico é fundamental para condrogênese, sendo que o TGF- β_3 sozinho não é suficiente. Desse modo o estudo concluiu que a dexametasona age como um sinergista, juntamente com outros componentes condrogênicos. Neste estudo nós utilizamos a dexametasona para diferenciação celular.

6. Ácido Ascórbico

O meio de cultura também foi suplementado com ácido ascórbico, que atua como uma enzima co-fator e antioxidante que estimula a transcrição, translação e processo pós-translacional do colágeno nos tecidos conectivos (Mobasher, Vannucci et al. 2002). Apesar da importância da vitamina C para o “*turner over*” do tecido conectivo, há uma informação limitada publicada sobre seu transporte e metabolismo nos condrócitos. Schwartz et al (Schwartz, Oh et al. 1981) desenvolveram um estudo onde a OA foi cirurgicamente provocada em porcos da guiné. Os animais foram divididos em dois grupos: o primeiro foi suplementado com doses mínimas de ácido ascórbico e o segundo com uma dose mais elevada. Foi observado que nos animais que eram suplementados com um nível mínimo de ácido ascórbico a OA foi duas vezes mais agressiva do que o grupo que foi suplementado com uma dose maior. Os pesquisadores concluíram que a vitamina C estimula a síntese de cartilagem articular e protege contra a erosão. Sabe-se também que existem alguns transportadores específicos de vitamina C que as acumulam nos condrócitos. Um estudo anterior mostrou que a síntese de colágeno tipo II e do agregano aumenta quando os condrócitos de linhagem de ratos são expostos ao ácido ascórbico. (Franceschi 1992; Franceschi and Iyer 1992). Neste estudo nós utilizamos o ácido ascórbico nas culturas.

7. Sox-9

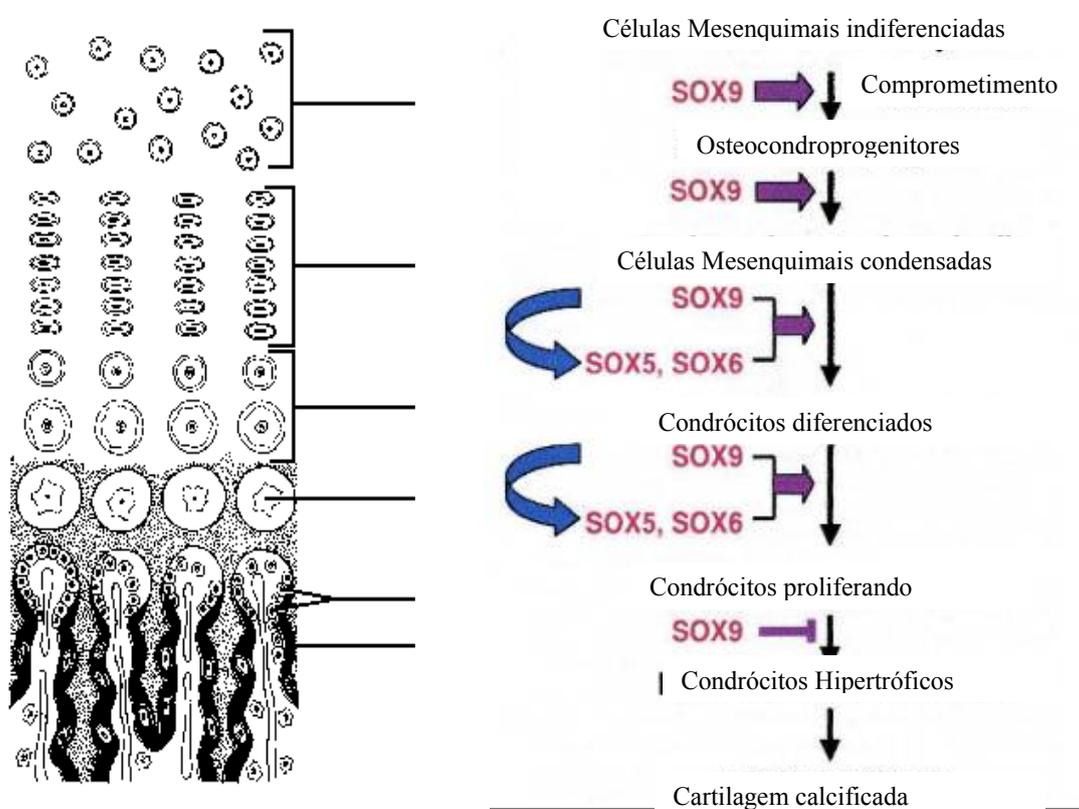
O Sox-9 tem sido descrito como um fator de transcrição requerido para a iniciação do processo de cartilagem durante a embriogênese (Bi, Deng et al. 1999). Fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA de células eucarióticas para permitir que haja uma ligação entre a enzima RNA-polimerase e o DNA, permitindo assim a transcrição e a futura tradução.

Alguns estudos examinaram a relação entre a sinalização das BMPs e a expressão e função do Sox. O Sox-9 é conhecido como o marcador para células envolvidas na condrogênese e seu papel essencial como um regulador da diferenciação condrogênica tem sido confirmado por estudos genéticos (Ng, Wheatley et al. 1997; Bi, Deng et al. 1999). A perda do Sox-9 ou a sua deficiência resulta em perda da maioria dos elementos esqueléticos. Em mutantes de camundongos, onde a região do DNA responsável pela síntese do Sox-9 foi deletada, não houve formação de condensação celular, pré-requisito para a condrogênese, e marcadores específicos da cartilagem não foram expressos (Yoon and Lyons 2004). Além disso, o Sox-9 é expresso até o estágio pré-condrócito hipertrófico, que formará osso, quando então há desaparecimento de produção do colágeno tipo II (Figura 2). Sendo assim o Sox-9 é requerido para manter o fenótipo de condrócito articular (Akiyama, Chaboissier et al. 2002; Yoon and Lyons 2004). Outro estudo ainda mostrou que o Sox-9 se liga ao DNA para ativar elementos a produção de colágeno II, colágeno XI e Agrecano concordando com a definição de que estes genes estão relacionados com o Sox-9 (Lefebvre, Huang et al. 1997).

Muito pouco é sabido a respeito dos eventos intracelulares, especialmente sobre fatores de transcrição que controlam a condrogênese em células mesenquimais indiferenciadas. Durante a condrogênese, o Sox-9 é expresso em todas as células

condroprogenitoras, todos os condrócitos diferenciados, mas não em condrócitos hipertróficos (Ng, Wheatley et al. 1997; Zhao, Eberspaecher et al. 1997). O distormfismo craniofacial, atraso no desenvolvimento do esqueleto e displasia campomélica o qual é caracterizada por hipoplasia da maioria dos ossos endocondrais são causadas por mutação no Sox-9 (Wagner, Wirth et al. 1994).

Figura 2. Fases da expressão do Sox-9



Modificado a partir de Akiyama H., et al., *Genes & Dev* 16:2813-2828, 2002.

Portanto, além de investigarmos a expressão gênica de macromoléculas como o colágeno e agrecano, investigamos também a expressão deste fator transcrição.

Desse modo, neste estudo tivemos como um dos alvos, investigar a diferenciação celular de células do sangue do cordão umbilical humano em condrócitos, observando a formação da matriz extracelular produzida pelas células estimuladas por TGF β 3, IGF-1, BMP-2 e BMP-6, pela expressão gênica do fator de transcrição Sox-9 e o Agrecano, uma macromolécula também produzida pelos condrócitos articulares.

Objetivos



Objetivos

Objetivo Geral:

Avaliar a capacidade de condrogênese das células mesenquimais, presentes no sangue do cordão umbilical humano.

Objetivos específicos

1. Verificar a presença de células mesenquimais no sangue do cordão umbilical
2. Avaliar a viabilidade das células mesenquimais de se diferenciarem em condrócitos
3. Avaliar a eficiência de cada um dos fatores de crescimento os quais as células foram expostas para diferenciação celular através da expressão gênica do colágeno, agrecano e Sox-9.
4. Avaliar qual o melhor tempo para a célula se diferenciar e expressar proteínas características do condrócito.
5. Avaliar qual sistema de cultura (*monolayer ou micromass*) se mostra mais eficiente para condrogênese e manutenção do fenótipo das células diferenciadas.

Hipótese e Justificativa



Hipótese

No sangue do cordão umbilical encontram-se células progenitoras mesenquimais, podendo dar origem a condrócitos, quando submetidas à cultura em presença de fatores de crescimento envolvidos com a condrogênese. Por serem células mais primitivas possuem maior capacidade de diferenciação e proliferação. Uma vez que estas células se diferenciam, poderemos avançar em direção a estudos de enxerto das mesmas em lesões articulares e doenças degenerativas.

Justificativa

Se esta hipótese se mostrar comprovada, uma nova alternativa de tratamento para lesões articulares será possível, uma vez que lesões condrais, assim como doenças tal qual a OA são causadoras de grande morbidade. A possibilidade de terapia celular passa a ser uma alternativa promissora em doenças que comprometam a cartilagem articular. Além disso, o aumento do número de bancos de sangue de cordão, tanto públicos como privados, possibilita um acesso mais fácil a estas células.

Material e Método

A decorative border consisting of two parallel lines forming an L-shape, starting from the left and extending horizontally, then turning vertically to the right.

Materiais e métodos.

1. Coleta do sangue do cordão

Cento e trinta bolsas de sangue umbilical foram colhidas a partir da veia do cordão umbilical após consentimento dos pais, tendo sido o projeto apreciado e aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa de ambas as instituições (Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher - CAISM – da Universidade Estadual de Campinas e Maternidade de Campinas). As gestantes eram a termo (38 - 41 semanas), não apresentavam patologias sistêmicas e eram maiores de 18 anos. O sangue era coletado numa bolsa própria para coleta de sangue do cordão umbilical humano, com anticoagulante CPDA-1 com volume de aproximadamente 20% do volume que se espera coletar de sangue. (figuras 3.1, 3.2 e 4).



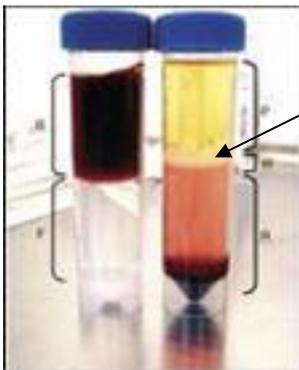
Figura 3.1 e 3.2. Coleta de sangue do cordão



Figura 4. Bolsa de sangue com o anticoagulante.

2. Processamento do Sangue

Em seguida as bolsas eram levadas para o laboratório, em temperatura ambiente, e o sangue processado com até vinte quatro horas após a coleta. Em fluxo laminar, as células mononucleares presentes no sangue do cordão umbilical foram separadas através de gradiente de densidade usando Ficoll Paque™ Premium (GE Healthcare), de acordo com a instrução do fabricante (figura 5).



Células mononucleadas.

Figura 5. Separação de células mononucleares.

Após separação, essas células foram semeadas em garrafas de cultura 75-cm² (Cellstar) com meio de cultura (α -MEM – Invitrogen, 100 U penicilina, 1000 U estreptomicina e 2

mM L-Glutamina e 10 % de soro bovino fetal – FBS, Invitrogen). Após dois dias as células não aderentes foram retiradas pela troca do meio usualmente trocado duas vezes por semana. (figura 6).



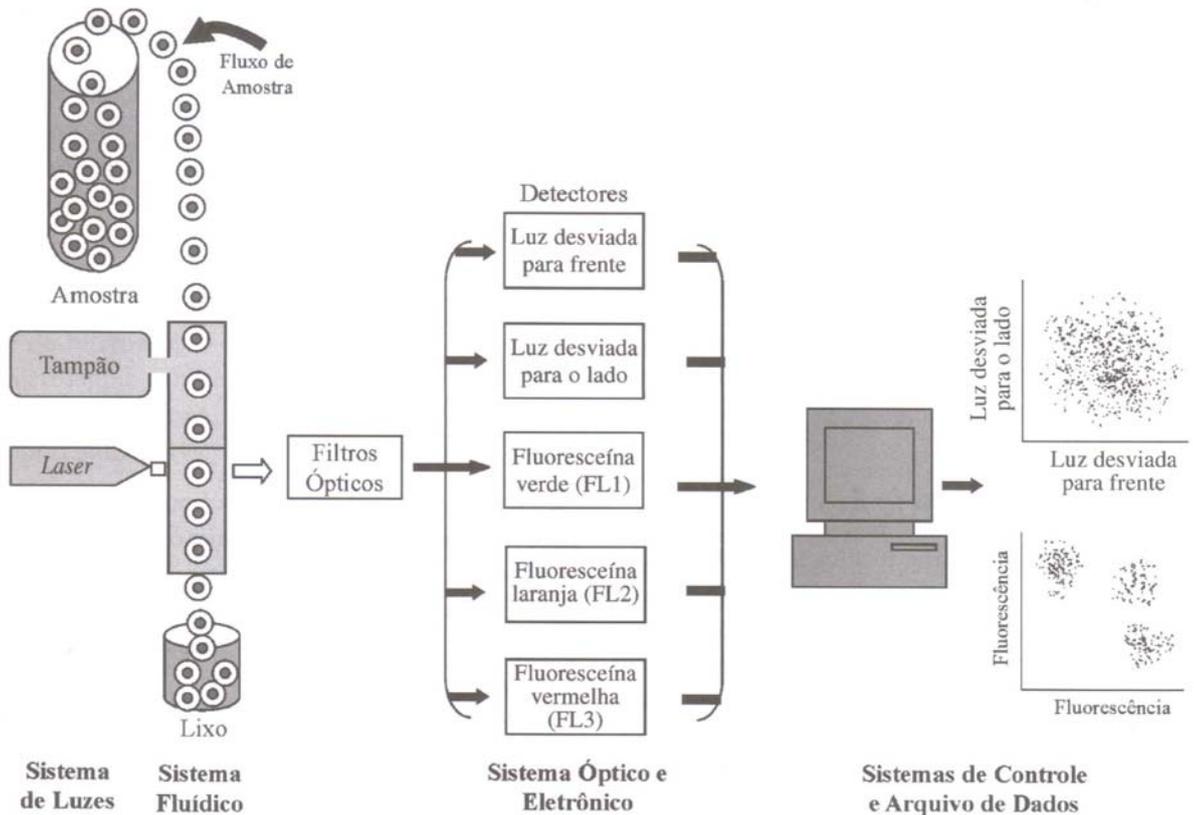
Figura 6. Células semeadas em garrafas de cultura.

Quando as células alcançavam em torno de 80% de confluência, elas eram despregadas da garrafa com 0,25% de trypsin-EDTA (Gibco), lavadas duas vezes com PBS (Phosphate buffer saline) com centrifugação à 1200 rpm por 10 minutos e ressemeadas a 1:3 sob as mesmas condições de cultura. Foi permitida a expansão destas células até duas passagens, por 21 dias.

3. Citometria de Fluxo

Depois de duas passagens, as células obtidas foram submetidas à citometria de fluxo usando-se para sua caracterização os seguintes anticorpos: CD90-PECY5, CD 105-PE, CD 29-FITC, CD73-PE, STRO-PE, CD34-PE, CD 45-SPRD e HLA DR-FITC. Um sistema fluídico transporta as partículas de uma suspensão para que estas sejam interceptadas por um laser gerado pelo sistema de iluminação. A luz desviada e a fluorescência emitida após a interceptação são coletados pelo sistema óptico e eletrônico, que traduz os sinais luminosos em informações armazenadas no sistema de controle e arquivo de dados. Após a

aquisição dos dados, podem ser realizadas análises gráficas dos resultados, utilizando programas específicos (Figura 7)



Jaroszkeski et al, 1999

Figura 7. Processo de citometria de fluxo

4. Diferenciação Celular

Em seguida, as células foram submetidas à diferenciação pelo estímulo com fatores de crescimento em dois modelos distintos de cultura: *micromass* e em *monolayer*. As células colocadas em cultura de alta densidade (*micromass*) foram diluídas em aproximadamente $10\text{-}15 \times 10^6$ células/ml de meio, colocadas gotas de $10\mu\text{l}$ contendo aproximadamente 2×10^5 células em placas de 96 poços (Corning, NY). Estas placas eram levadas para incubadora

Materiais e métodos

por duas horas a 37^o C com intuito das células aderirem à placa e depois as células foram submersas delicadamente de forma que a gota não se desmanchasse, em meio de cultura para diferenciação. As células em *monolayer* por sua vez, foram colocadas em placas com 6 poços (corning, NY) e a princípio estavam re-suspensas no meio e colocadas para aderência de forma uniforme para diferenciação. O meio de cultura utilizado foi *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) com alta concentração de glicose e suplementado com ácido ascórbico (50µg/ml – Sigma Alderich), Prolina (40 µg/ml - Sigma Alderich); insulín-transferrín-selenium (ITS+1- 1% - Sigma Alderich) e dexametasona (0,1µM- Sigma Alderich). Depois os fatores de crescimento foram adicionados nos diferentes grupos de células: TGF-β₃ – 10ng/ml, IGF-1 10ng/ml, BMP-6 500ng/ml e BMP-2 500ng/ml (Sigma-Alderich). O meio de cultura foi trocado sistematicamente duas vezes por semana. O meio de cultura obtido das trocas foi armazenado para posterior precipitação de proteínas.

5. Proteínas do meio de cultura

As proteínas contidas no meio de cultura foram precipitadas usando-se 2 mg/ml de Pepsina (Sigma-Aldrich) e 30µl/ml de ácido acético glacial. O “*pool* de meio” o era mantido em 30^o C por trinta minutos e, em seguida, colocado na geladeira por 12 horas sob agitação constante. Após esse tempo as amostras eram centrifugadas por noventa minutos em 5000 G. Finalmente o botão formado no tubo de centrifugação (*pelete*) era lavado duas vezes com PBS e ressuspendido em 30µl de água dietilpirocarbonado (DEPC). A quantidade de proteína obtida era determinada pelo espectrofotômetro *gene quantus* no comprimento de onda de 595 Å.

6. Western Blotting

Após a quantificação, trinta microgramas da proteína obtida eram separadas por SDS-PAGE a 10% e transferida para uma membrana de nitrocelulose (Amersham). A membrana era bloqueada com 5% (v/v) de leite desnatado em PBS, contendo 0,1% de Tween 20%. Em seguida a membrana era incubada com anticorpo contra colágeno tipo II, diluído 1:800 (Chemicon), por doze horas e então a membrana era lavada três vezes com PBS contendo 0,1% Tween 20, seguida pela incubação com o anticorpo secundário e peroxidase conjugada. Os sinais eram visualizados usando o kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce) e a auto radiografia realizada em filmes da marca Kodak.

7. Extração de RNA e síntese de cDNA

Após 7, 14 e 21 dias de cultura de cada grupo, o RNA era extraído usando-se o reagente TRIZOL, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Um micrograma do RNA total foi tratado com 1 U de desoxyribonuclease I (DNase I) (Invitrogen™ Life Technologies CA) para evitar contaminação com DNA genômico. A transcrição reversa foi feita com SuperScriptII (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante.

8. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

A técnica de real time é baseada no monitoramento da fluorescência emitida durante a reação em cadeia da polimerase (PCR). É denominado qRT-PCR porque utiliza como fita modelo (template) o cDNA obtido pela transcrição reversa do RNA. A qRT-PCR é baseada na ligação de um corante específico (SYBRGreen), na fita recém sintetizada. O SYBRGreen se intercala em fitas duplas de DNA emitindo uma fluorescência que é captada ciclo a ciclo pelo equipamento. A reação foi realizada em placas de 96-poços, no

equipamento ABI Prism 7000 Sequence Detection machine (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). O volume total de cada reação de PCR foi de 12 μ l, contendo 6 μ l Sybr Green PCR Master Mix, 10 ng cDNA (3 μ l), and 150 pM (3 μ l) de senso e antisenso dos iniciadores (*primers*). Todas as amostras foram quantificadas em duplicata.

A qRT-PCR foi realizada a 95°C por 10 min (ativação), 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 20 s, e 72°C por 20 s (amplificação), e 72°C por 1 min (extensão final). Foi feita a curva de dissociação depois da PCR completa para certificação de que a fluorescência não estava sendo gerada por amplificação inespecífica dos *primers*, confirmando a especificidade dos produtos amplificados. Esta curva se baseia no T_m (Melting Temperature) de cada produto, que é determinada pela sua composição de nucleotídeos. A cada variação da temperatura, que acontece entre 60° C a 95° C logo após o término do PCR, são coletados os dados de fluorescência. A curva de dissociação se dá quando em determinada temperatura o produto da PCR separa suas fitas e ocorre queda de fluorescência gerada pelo SYBRGreen, uma vez que este intercala somente dupla fita. Controles sem a adição do *template* (NTC) foram incluídos para cada par de *primers*.

Para quantificação da expressão dos genes utilizamos o método de “análise relativa dos dados”, onde a expressão dos genes selecionados foi quantificada em relação a um gene de controle endógeno de expressão, o *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH).

Para a análise dos dados, primeiro fizemos a normalização dos mesmos, onde obtivemos os níveis de expressão gênica das amostras sempre em relação a amostra calibradora Δ CT (Δ CT da amostra a ser quantificada menos Δ CT da amostra calibradora). Após esta normalização, foi realizada então a calibração dos mesmos, utilizando situações

onde a expressão do gene alvo é inexistente, levando ao segundo passo da derivação aritmética denominada $\Delta\Delta CT$, isto é, (ΔCT da amostra a ser quantificada menos ΔCT da amostra calibradora) menos o CT calibrador da amostra que o gene alvo não é expresso. E finalmente fizemos a análise relativa dos dados pela fórmula aritmética $2^{\Delta\Delta CT}$ (Bustin 2002) obtendo-se o número relativo de cópias amplificadas.

ct gene alvo	ct gapdh	$\Delta ct(\text{ct gene alvo} - \text{ct GAPDH})$	$\Delta\Delta ct(\Delta ct - \Delta ct \text{ calibrador})$	$2^{(-\Delta\Delta ct)}$
--------------	----------	--	---	--------------------------

Para que a reação de PCR em tempo real seja confiável e reprodutiva é necessário que a reação ocorra em condições ótimas, com 90 a 100% de eficiência (Pfaffl 2001).

As reações de PCR em tempo real foram otimizadas testando-se várias concentrações de iniciadores (primers) em uma diluição seriada de cDNA.

Os dados para serem aplicados à fórmula aritmética foram coletados na forma de emissão de fluorescência na fase exponencial da reação pela determinação de um único *Threshold*. O *Threshold* nada mais é que uma linha traçada na horizontal no gráfico de amplificação. O ponto de encontro entre esta linha e a curva de amplificação determina o *Cycle Threshold*, ou CT.

Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 1:

Tabela 1. Sequência dos iniciadores (Primers) utilizados na qRT-PCR.

Colágeno Tipo II	Senso	5'-GGCAATAGCAGGTTACGTACA-3'
	Antisenso	5'-CGATAACAGTCTTGCCCCACTT-3'
Agregano	Senso	5'-TCGAGGACAGCGAGGCC-3'
	Antisenso	5'-TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA-3'
Sox-9	Senso	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
	Antisenso	5'- CCACTTGATTTTGGAGGGATCT-3'
GAPDH	Senso	5'-GACTTCCGCGACGTGGAC-3'
	Antisenso	5'-GTTGGGCGGCAGGTACTG-3'

9. Análise Estatística

A análise estatística foi desenvolvida pela one-way analysis of variance (ANOVA), usando o software comercialmente disponível (InStat; GraphPad Software, San Diego, <http://www.graphpad.com>). O intervalo de confiança foi 95%. Levando em conta as comparações múltiplas entre grupos, valores que foram menores que 0.05 foram considerados significantes.

Resultados



Resultados

1. Isolamento, expansão e caracterização das células:

Foram coletas e processadas 130 bolsas de sangue de cordão, das quais as células mesenquimais de apenas 40 foram submetidas à diferenciação, o que representa um sucesso de aproximadamente 30%, corroborando com dados da literatura que referem eficiência baixa na obtenção destas células. (Manca, Zwart et al. 2008; Rebelatto, Aguiar et al. 2008). O sangue do cordão umbilical foi coletado de gestantes de média gestacional de 39 semanas ± 1.5 semanas, com volume de 80 ml ± 20 ml, incluído o volume do anticoagulante CPDA. Foi obtido uma média de células nucleadas de $9,5 \pm 2,7 \times 10^8$. O sangue era processado até 24 horas após a coleta. Nenhuma relação foi encontrada entre a idade gestacional e o número de células. Depois de 15 dias, as células aderentes adquiriram uma morfologia fibroblastóide. (figura 8).

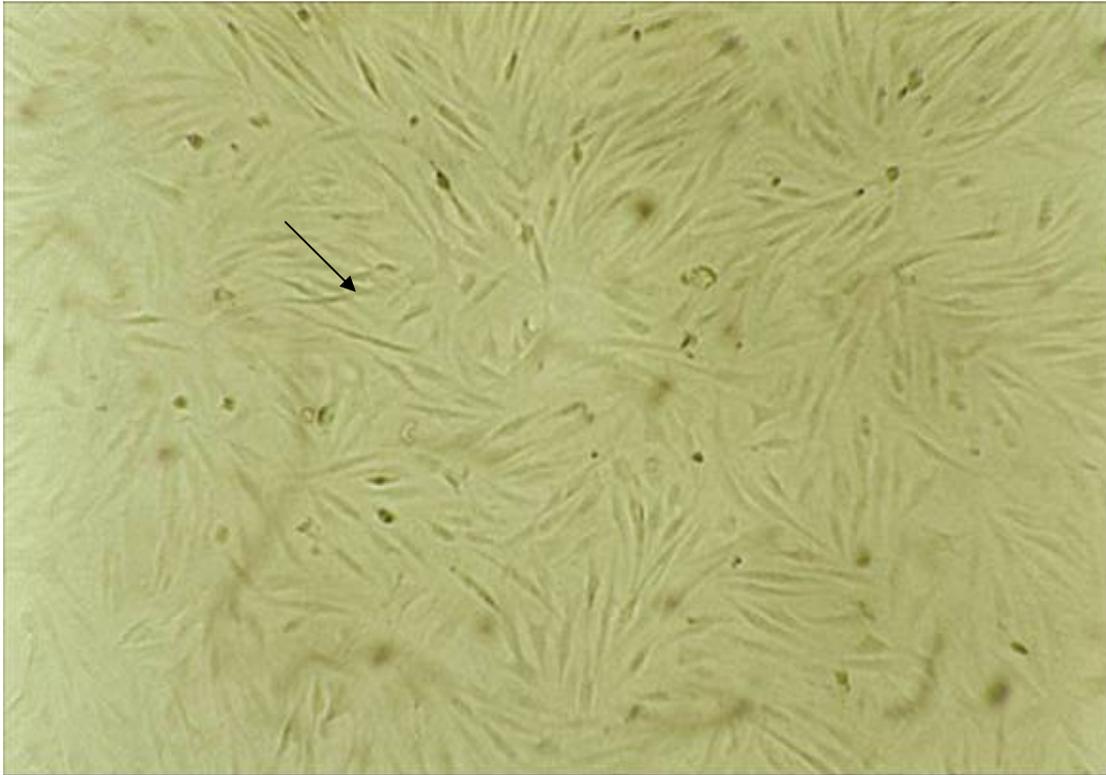


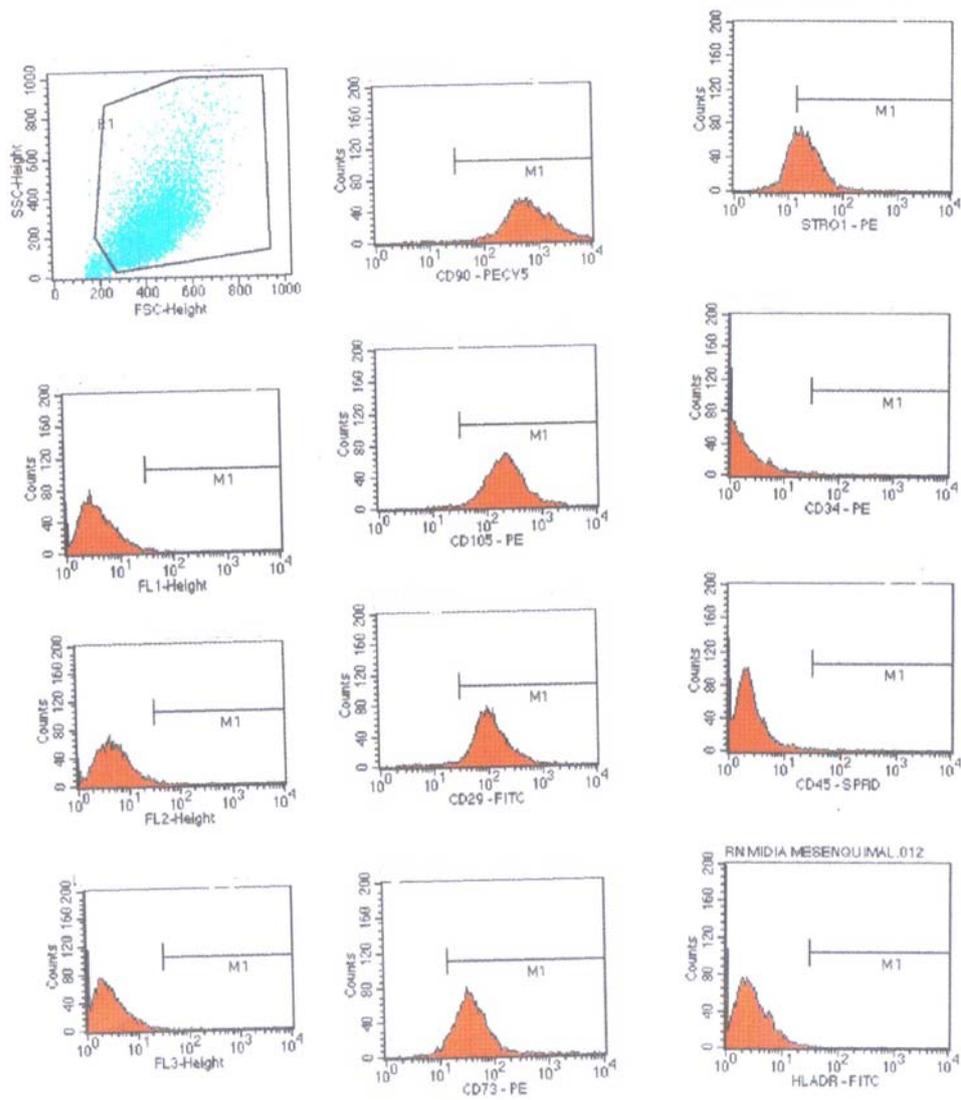
Figura 8. Células do sangue do cordão umbilical, 15 dias de cultura.

2. Citometria de Fluxo.

Na caracterização imunofenotípica das células mesenquimais de sangue de cordão umbilical (porcentagem de células positivas para os marcadores de superfície celular analisados por citometria de fluxo) obtivemos os seguintes resultados:

CD90 PE 95.36%, CD 105 PE 95.35%, CD 29 FITC 92.28%, CD73 90.20%, STRO 1 PE 65.29%, CD 34 PE 0.15%, CD 45 S PRD 0.41%, HLA DR – FITC 0.03% (figura 9).

Figura 9. Citometria de Fluxo de células do sangue do cordão.



3. Transcrição reversa

Após a extração de RNA, um gel de agarose a 2% foi corrido para visualizar a presença do RNA, assim como avaliar a qualidade do mesmo. Foi verificada a presença das suas

subunidades do RNA (18s e 28s) Em seguida, fazíamos a quantificação com o espectrofotômetro para iniciar o tratamento com a DNase e posterior transcrição reversa.

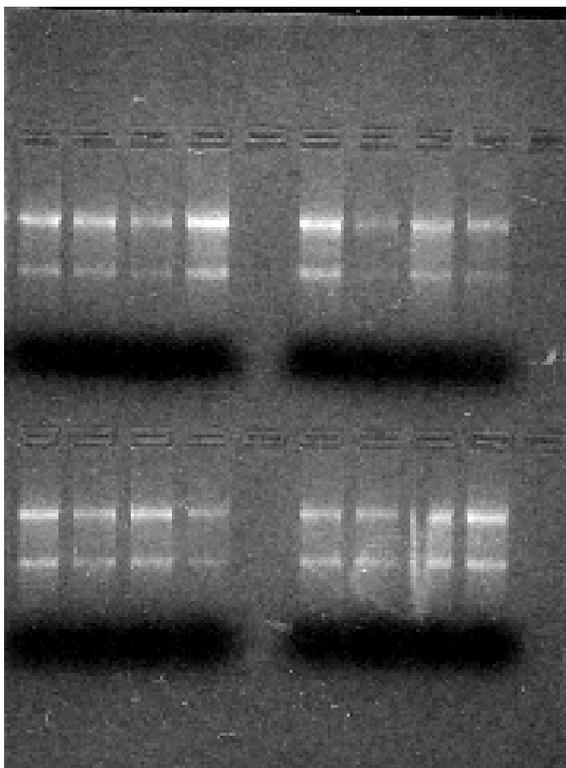


Figura 10. Gel de agarose a 2% com RNA, com as duas subunidades do RNA (18S e 28S).

4. Curva de eficiência dos primers

Após a reação de transcriptase reversa, fizemos uma curva de eficiência dos *primers*, onde estes eram diluídos em 150nM, 300 nM, 600nM e 900nM. Usamos cDNA de condrócitos normais para amplificação dos genes procurados, obtidos através amputação e obtivemos amplificação de todos os primers com 150 nM. (colágeno tipo II, Agrecano, Sox-9, GAPDH)

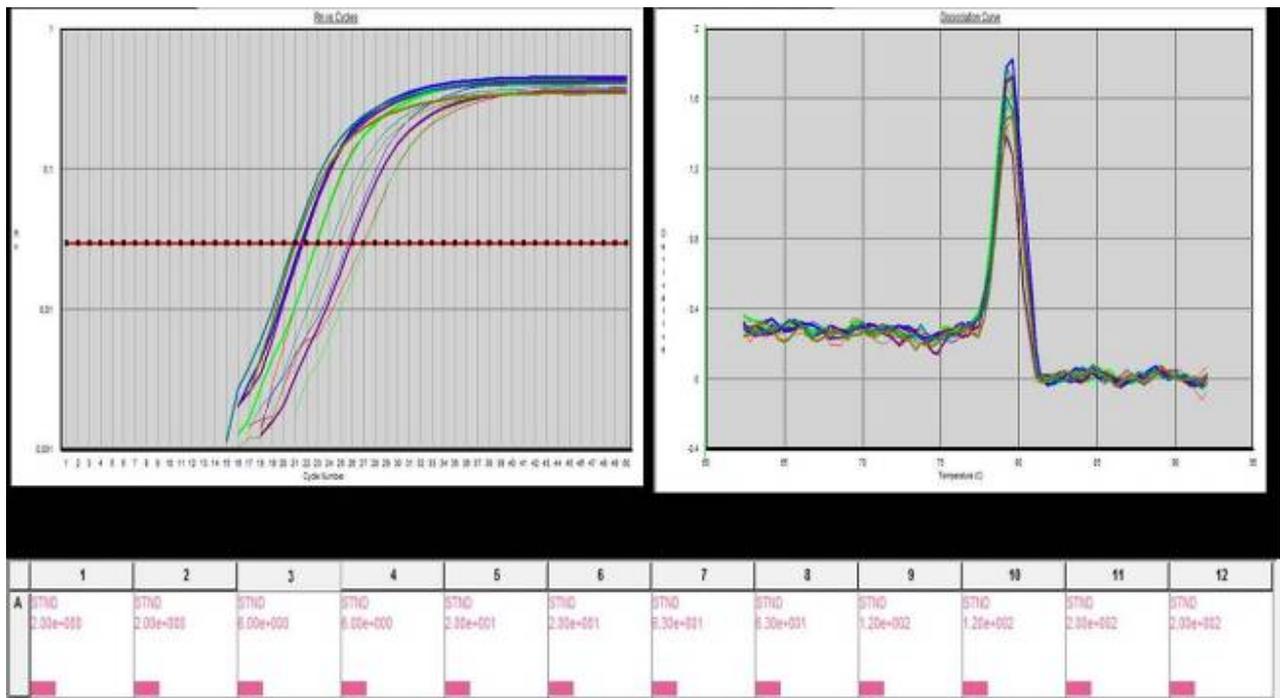


Figura 11. Curva de eficiência e dissociação dos primers em diferentes concentrações.

Também fizemos uma curva de eficiência para determinarmos a quantidade de cDNA. A quantidade de cDNA foi determinada após a diluição em concentrações que variavam em escala logarítmica. Obtivemos a amplificação com 10 ng de cDNA.

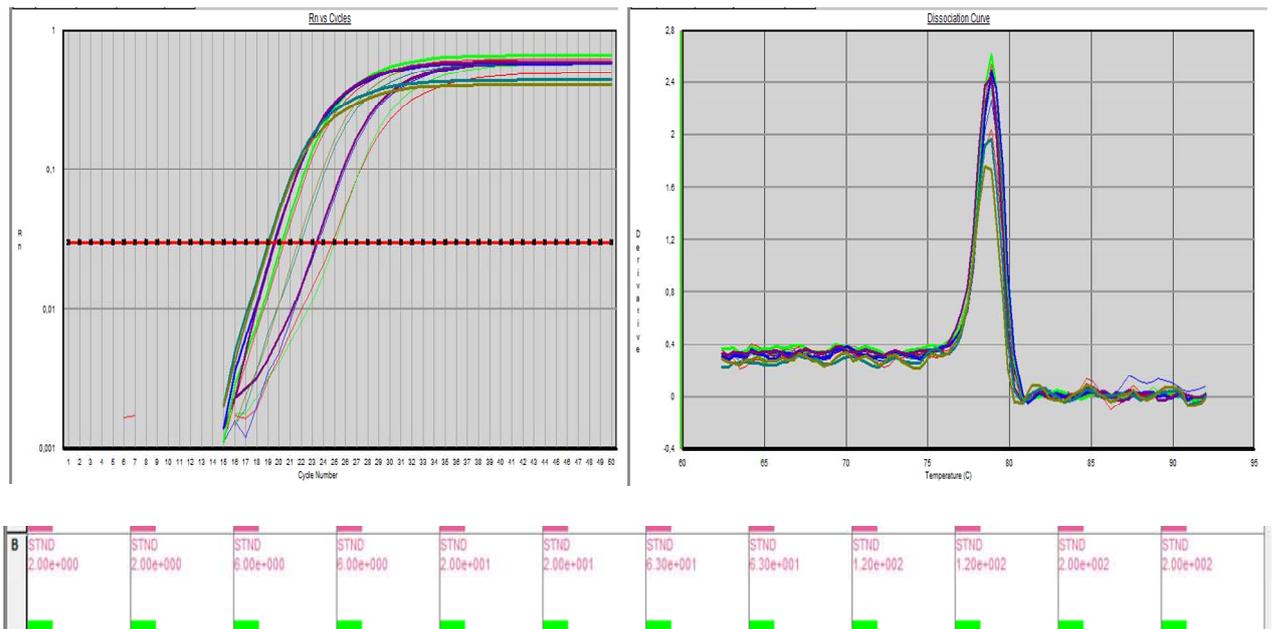


Figura 12. Curva de eficiência para quantidade de cDNA.

5. RT-PCR em Tempo Real

5.1. Expressão de colágeno tipo II

Em relação ao colágeno tipo II, no nível gênico, com sete dias não se observou a sua expressão, tanto nas células que foram cultivadas no sistema de cultura em *monolayer*, quanto nas células que foram cultivadas em *micromass*, em todos os grupos estimulados com os diferentes fatores de crescimento aqui estudados. Em alguns experimentos, no entanto, observou-se esta expressão já num número elevado de ciclos e ainda assim, numa ínfima quantidade de cópias. Deve ser observado, que as escalas dos gráficos estão diferentes para cada um dos estímulos

5.1.1 Células estimuladas com TGF- β 3

Nas células que foram estimuladas com TGF- β 3, após 14 dias em *monolayer* a expressão de colágeno foi maior do que em *micromass* no mesmo tempo de cultura ($P < 0.001$). No entanto, neste mesmo grupo, a expressão diminuiu no 21º dia ($P < 0.001$). Observamos também que não houve diferença estatística significativa entre as células cultivadas em *micromass* no 14º e no 21º dia. Também não houve diferença estatística da expressão do colágeno entre os dois modelos de cultura no 21º dia.

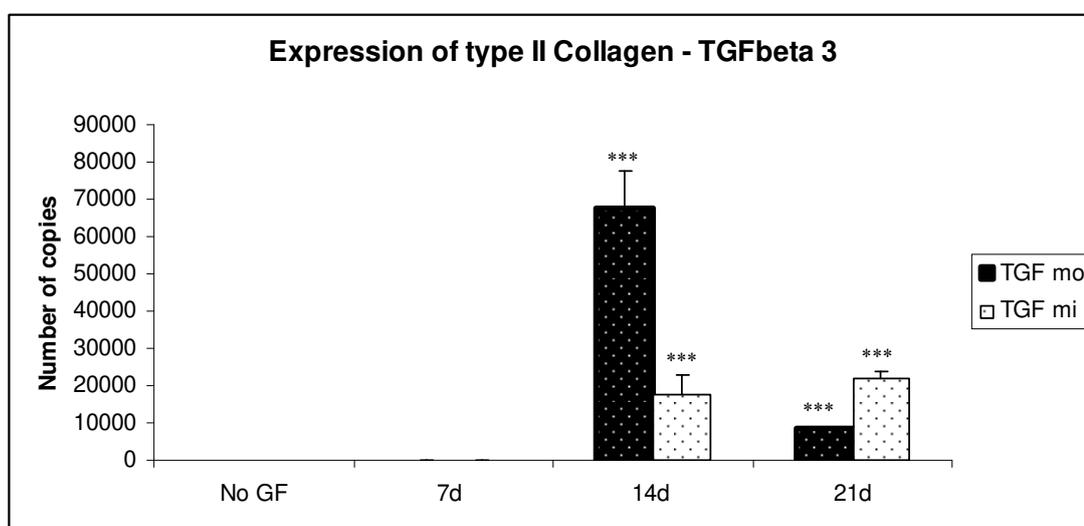


Gráfico 1. Expressão do colágeno, no nível gênico, nas células estimuladas com o TGF β_3 . ($P < 0.001$ - ***)

5.1.2 Células estimuladas com IGF-1

Nas células estimuladas com IGF-1 a expressão do colágeno em ambos os modelos de cultura mostrou-se tempo-dependente, ou seja, no 21º dia o nível de expressão foi maior que no 14º dia, tanto em *monolayer* quanto em *micromass* ($P < 0.001$). Além disso, a expressão do 14º em *micromass* foi maior que no 14º dia em *monolayer* ($P < 0.01$) e maior que no 21º em *monolayer* ($P < 0.05$) (Gráfico 2).

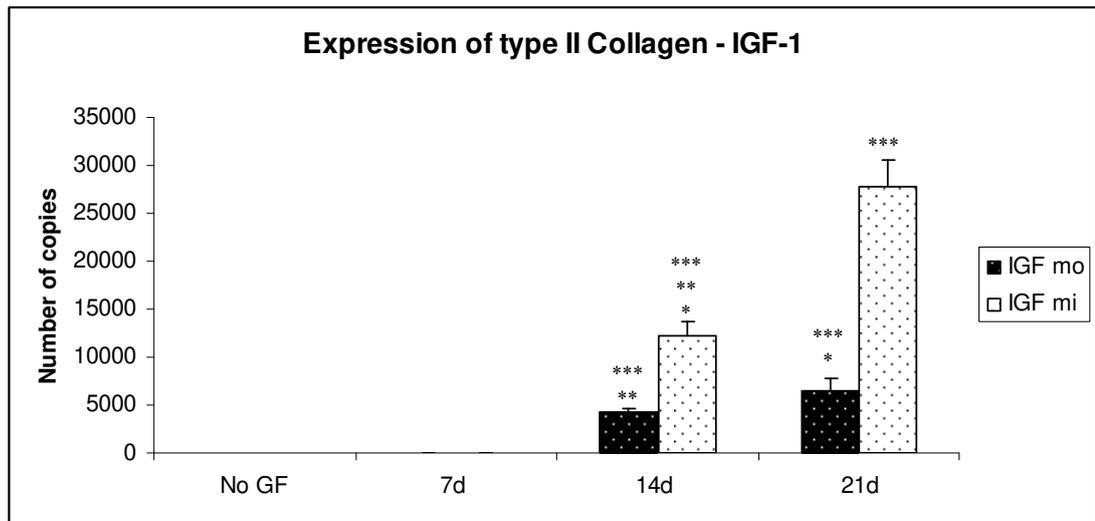


Gráfico 2. Expressão do colágeno, no nível gênico, nas células estimuladas com o IGF -1.

P<0.001- ***; P<0.01 -**; P<0.05 - *

5.1.3 Células estimuladas com BMP-2

Nas células estimuladas com BMP-2, após 14 dias, o sistema de cultura não interferiu na quantidade de colágeno produzida. Com 21 dias, no entanto, as células cultivadas *micromass* mostraram-se mais eficientes no que diz respeito à expressão deste gene do que aquelas cultivadas pelo mesmo período em *monolayer* ($P<0.001$). Em *micromass* verificou-se também uma relação tempo-dependência entre o 14º e o 21º dia ($P<0.001$), diferente do sistema em *monolayer* onde não houve diferença estatística entre esses dias (gráfico 3).

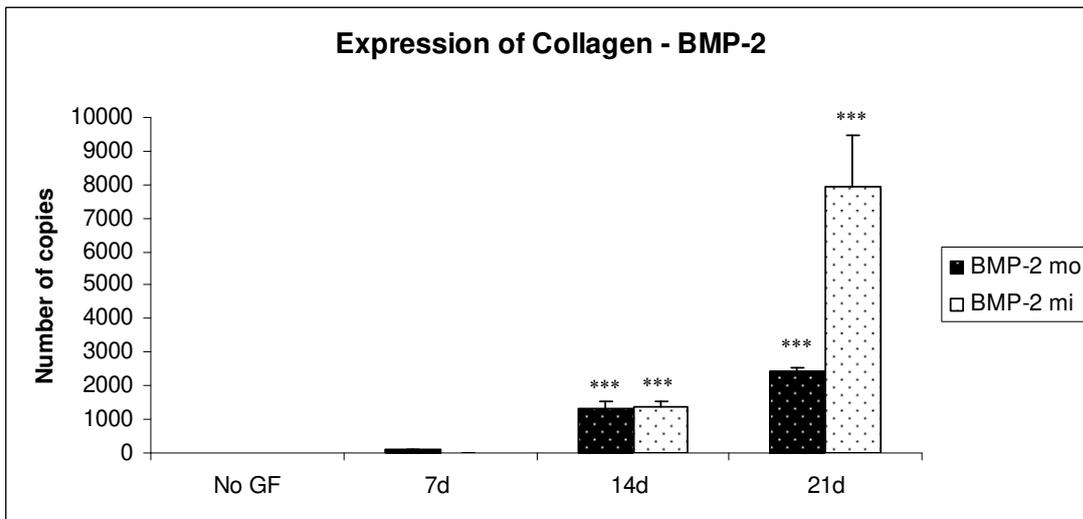


Gráfico 3. Expressão do colágeno, no nível gênico, nas células estimuladas com o BMP-2. $P < 0.001$ - ***;

5.1.4 Células estimuladas com BMP-6

Nas células estimuladas com BMP-6, em *monolayer* houve uma maior expressão do colágeno do que a observada naquelas cultivadas em micromass e estimuladas durante 14 dias ($P < 0.001$). Em relação às células cultivadas por 21 dias, as que estavam em *micromass* expressaram mais colágeno do que as cultivadas em *monolayer* ($P < 0.001$). Observou-se ainda naquelas cultivadas em *micromass* uma relação de tempo-dependência, diferentemente do observado entre cultivadas em *monolayer*. Não houve diferença estatística da expressão do colágeno entre as células mantidas 21 dias em *micromass* em 14 dias e em *monolayer*.

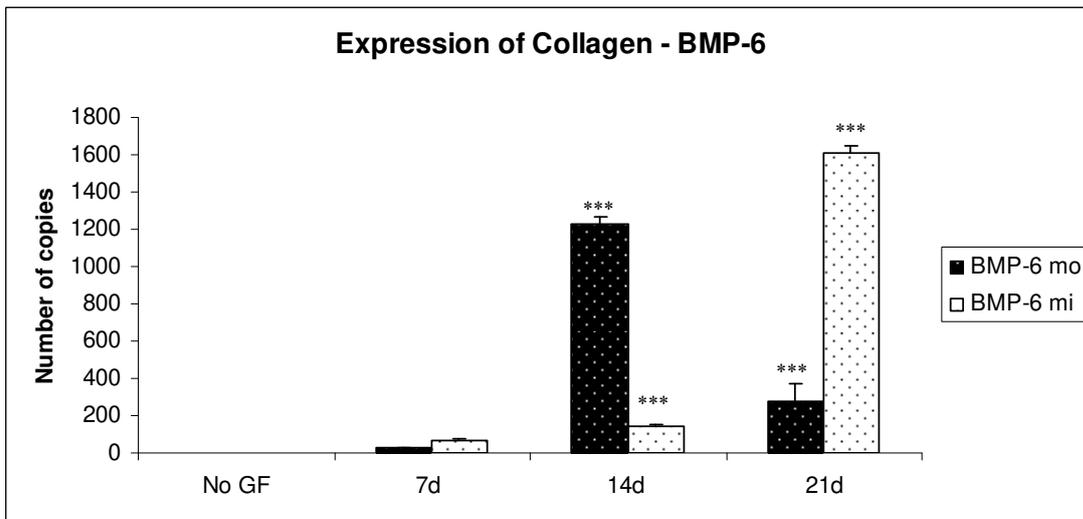


Gráfico 4. Expressão do colágeno, no nível gênico, nas células estimuladas com o BMP-6. $P < 0.001$ - ***;

A figura 13 mostra a amplificação do colágeno na RT-PCR m tempo real, A figura 13.1 mostra a curva de dissociação, confirmando a ausência de amplificação de produtos específicos.

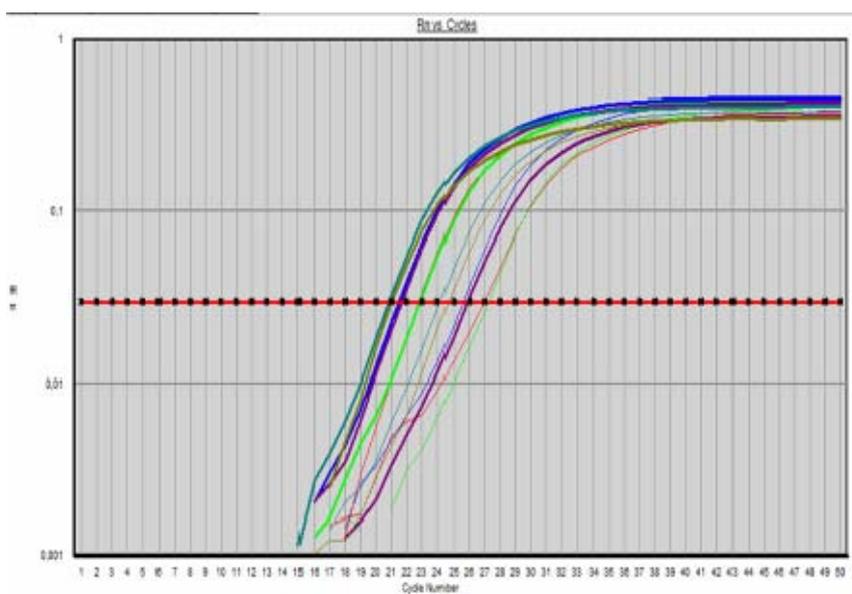


Figura13. Amplificação do Colágeno tipo II

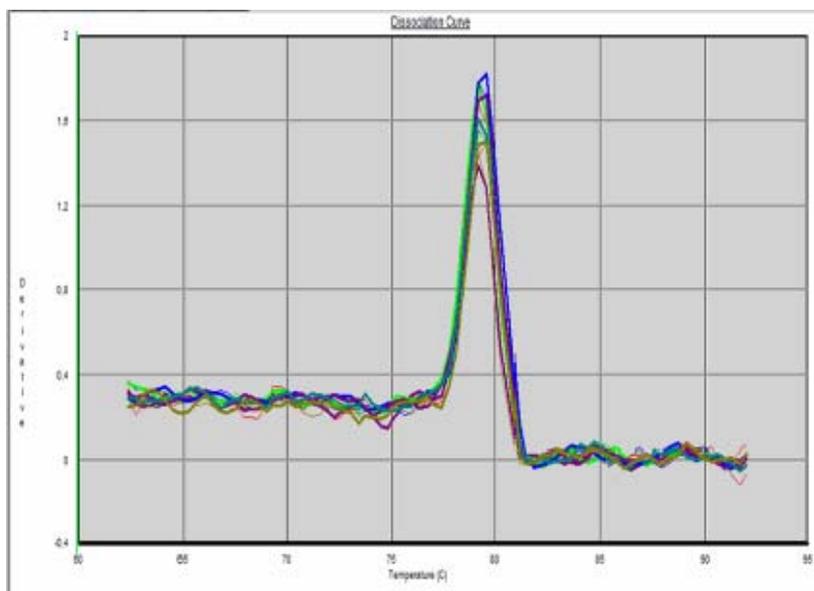


Figura 13.1. Curva de dissociação.

5.2 Expressão do gene Agrecano

Em relação ao Agrecano, no nível gênico, com sete dias, também não se observou expressão gênica, tanto nas células que foram cultivadas no sistema de cultura em *monolayer*, quanto nas células que foram cultivadas em *micromass*, em todos os grupos de fatores de crescimento estudados, ou quando isso ocorreu foi ínfimo.

5.2.1 Células estimuladas com TGF β_3

As células mantidas por 14 dias em *micromass* expressaram maior quantidade de agrecano do que as mantidas em *monolayer* por 21 dias ($P < 0.001$). Além disso o nível de expressão também foi maior no 14º dia em *micromass* do que as células mantidas em *monolayer* pelo mesmo período ($P < 0.01$). As células mantidas em *monolayer* por 14 dias expressaram

Resultados

mais colágeno do que as mantidas em *micromass* por 21 dias ($P<0.05$). Não houve diferença estatística significativa entre os dois sistemas no 21º dia.

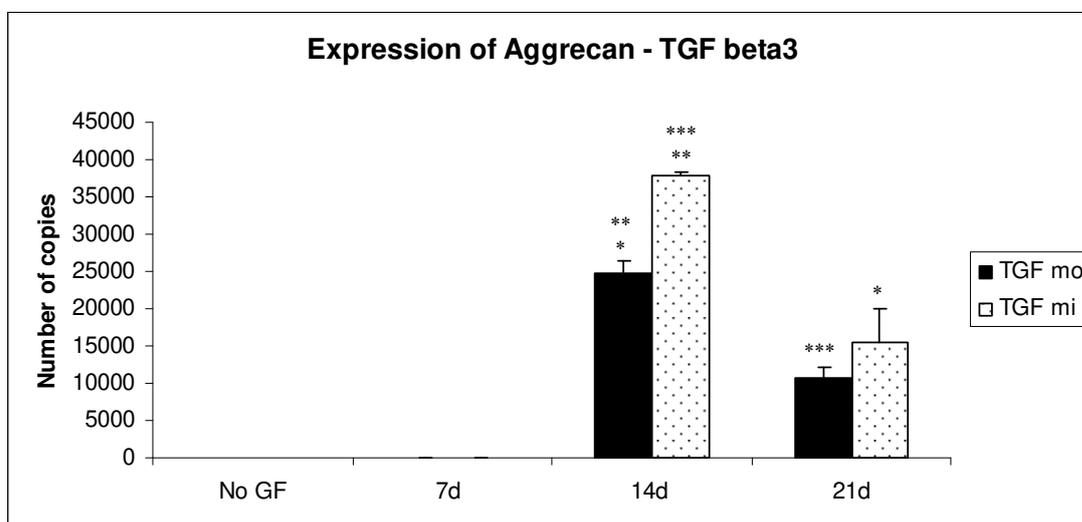


Gráfico 5. Expressão de agrecano nas células estimuladas com o TGF β_3 .

$P<0.001$ - ***; $P<0.01$ - **; $P<0.05$ - *

5.2.2 Células estimuladas com IGF-1

A expressão de agrecano in *monolayer* foi menor no 14º dia do que no 21º dia ($P<0.05$)

A mesma relação de tempo-dependência também foi observada em *micromass* ($P<0.001$).

No 14º dia, no entanto, não houve diferença estatística entre os dois sistemas de cultura.

No 21º dia o nível de expressão foi maior em *micromass* do que em *monolayer* ($P<0.001$) (gráfico 6).

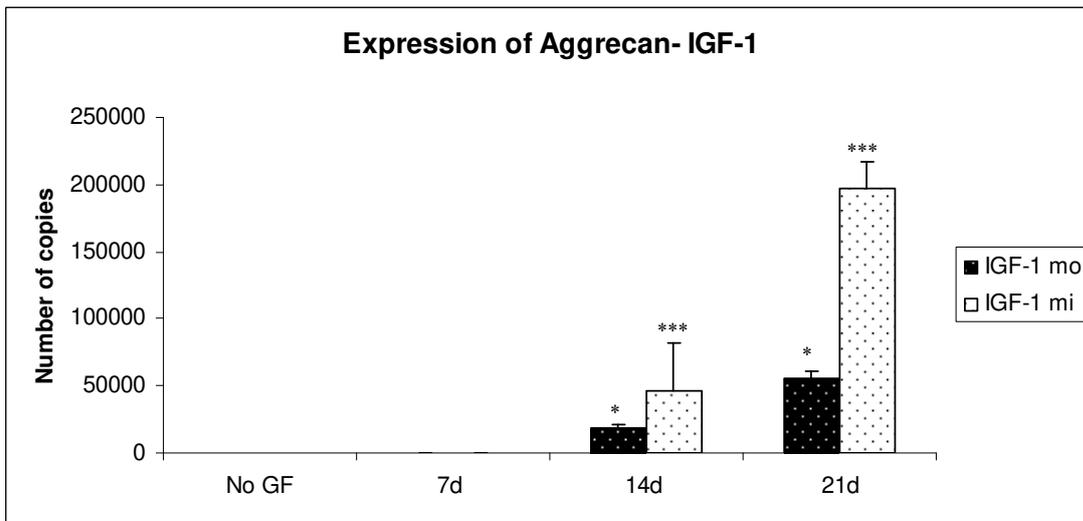


Gráfico 6. Expressão de agrecano nas células estimuladas com o BMP-2. $P < 0.001$ - ***; $P < 0.05$ - *

5.2.3 Células estimuladas com BMP-2

Nas células que foram estimuladas com BMP-2 a expressão deste gene foi bem acentuada. Em *monolayer* e em *micromass* por 14 dias, não houve diferença estatística. Já no 21º dia as células cultivadas em *micromass* diminuíram a produção de agrecano em relação ao 14º dia ($P < 0.01$) enquanto que as que estavam em *monolayer* no 14º dia aumentaram a expressão no 21º dia ($P < 0.001$) mostrando neste último caso, uma relação tempo-dependente. Estes dados podem ser vistos no gráfico 7.

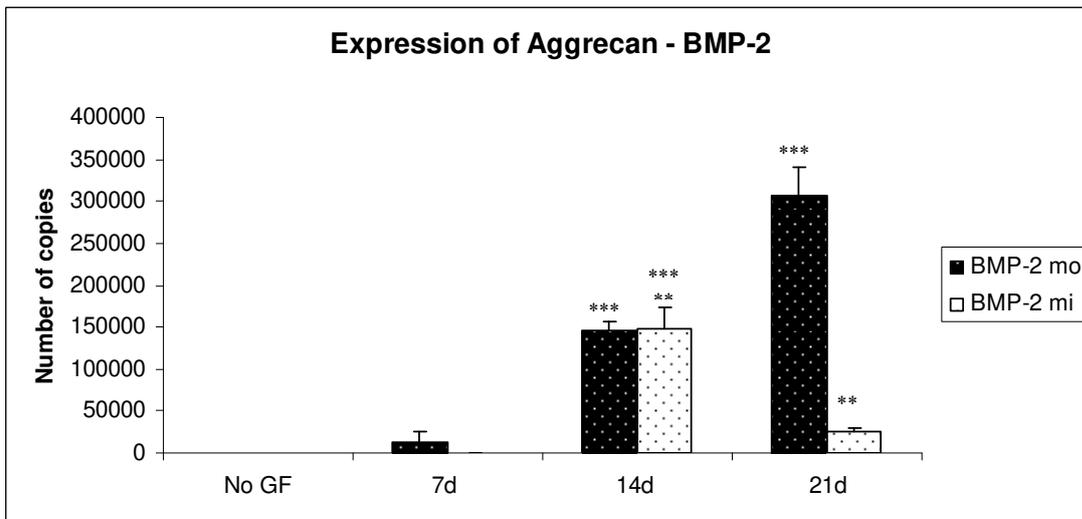


Gráfico 7. Expressão de agrecano nas células estimuladas com BMP-2.

P<0.001- ***; P<0.01 -**;

5.2.4 Células estimuladas com BMP-6

Nas células estimuladas com BMP-6, a expressão de agrecano foi bem pequena (menos que 3.500 cópias) quando comparada com a expressão deste gene pelo outros fatores de crescimento, mesmo no 21º dia. Embora se observe uma pequena expressão no 7º dia de estímulo, isso somente ocorreu em ciclos muito altos, sendo possível visualizá-los no gráfico em razão da baixa expressão nos outros dois tempos estudados. Ainda assim, foi possível observar que no 14º em *monolayer* a expressão do agrecano foi maior do que no mesmo tempo em *micromass* ($P<0.001$). Quando analisamos o 14º dia em *micromass* verificamos que também foi menor que o 21º dia em *monolayer* ($P<0.05$) em todos os tempos estudados. Não houve diferença significativa entre o 14º e o 21º dia (Gráfico 8).

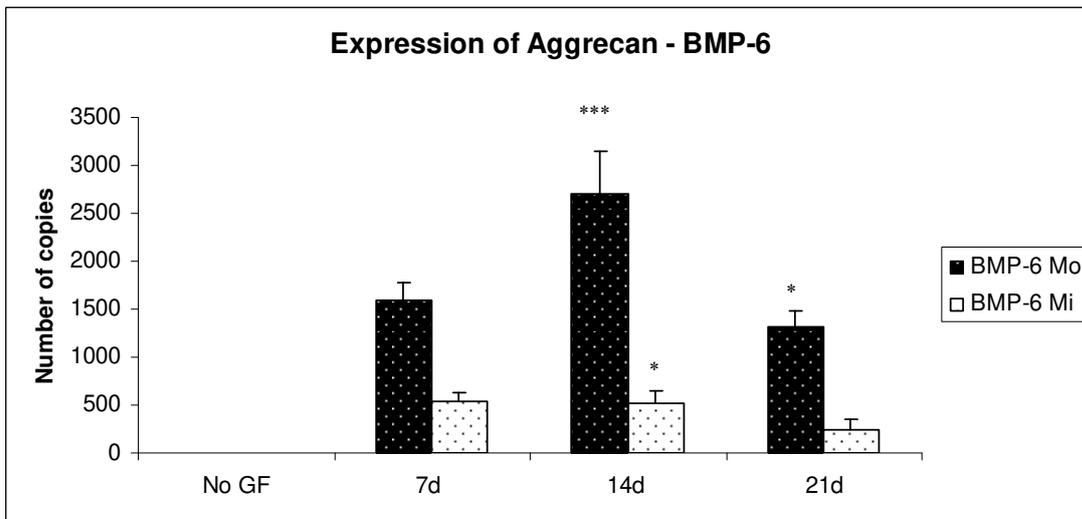


Gráfico 8. Expressão de agrecano nas células estimuladas com BMP-6. $P < 0.001$ - ***; $P < 0.05$ - *

5.3 Expressão de Sox-9

Tratando-se de um fator de transcrição, a expressão gênica é menor do que os demais genes estudados, o que requer uma escala diferente na construção dos gráficos. A expressão de Sox-9 em células estimuladas com BMP-6 em *micromass* e em *monolayer* no 14º dia não mostrou diferença significativa no nível de expressão deste gene. No 21º dia, em *monolayer* a expressão foi menor do que a verificada no 14º dia em *monolayer* ($P < 0.001$). Quando comparado os dois sistemas de cultura no 21º dia, observou-se uma diferença significativamente maior em *micromass* ($P < 0.001$). Também verificou-se uma diferença

Da mesma forma que observado em relação aos genes anteriores, não houve expressão de Sox-9 no dia 7 em nenhum dos grupos, ou quando isso ocorreu o número de cópias foi muito pequeno.

5.3.1 Células estimuladas com TGF β_3

As células estimuladas com TGF β_3 em *micromass* e em *monolayer* no 14º dia não mostraram diferença significativa no nível de expressão deste gene. No 21º dia, em *monolayer* a expressão foi menor do que a verificada no 14º dia em *monolayer* ($P < 0.001$). Quando comparado os dois sistemas de cultura no 21º dia, observou-se uma diferença significativamente maior em *micromass* ($P < 0.001$). Também verificou-se uma diferença

estatística menor em *micromass* no 21º d quando comparada com o 14º dia ($P < 0.05$), como visualizado no gráfico 9.

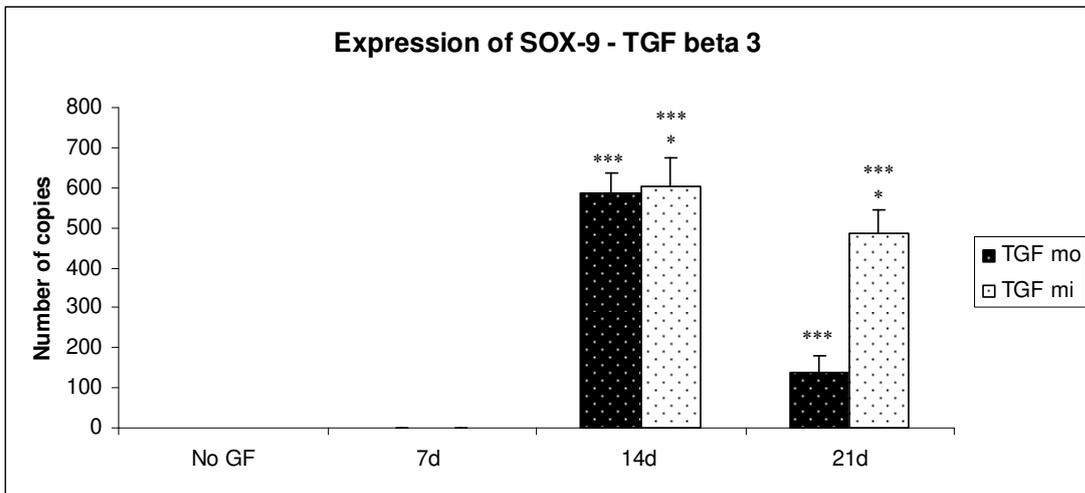


Gráfico 9. Expressão de SOX-9 nas células estimuladas com TGF β_3 . $P < 0.001$ - ***; $P < 0.05$ - *

5.3.2 Células estimuladas com IGF-1

As células estimuladas com IGF-1 mostraram uma relação tempo-dependente quando cultivadas em *micromass* e expressaram significativamente este gene aos 21 dias, quando comparado como os outros tempos de cultura ($P < 0.001$). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (*monolayer* e *micromass*) no 14º dia, assim como, quando comparou-se em *monolayer* no 21º dia. Estes dados podem ser vistos no gráfico 10.

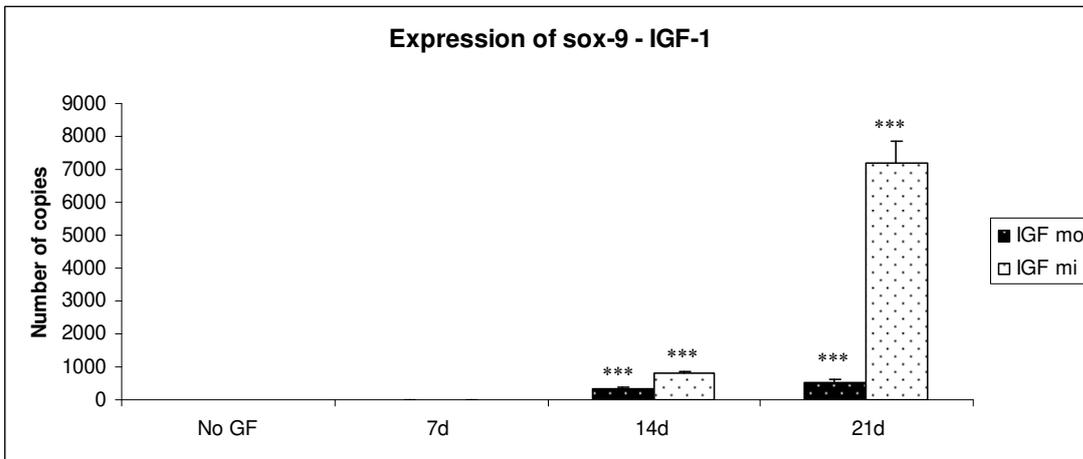


Gráfico 10. Expressão de SOX-9 nas células estimuladas com IGF-1. $P < 0.001$ - ***;

5.2.3 Células estimuladas com BMP-2

As células que foram estimuladas com BMP-2 expressaram significativamente este gene no 14º dia, aumentando no 21º dia tanto em *monolayer* ($P < 0.001$) como em *micromass* ($P < 0.001$), demonstrando uma relação de tempo-dependência em ambos os modelos de cultura. Não houve diferença estatística entre os dois sistemas no 21º dia, diferente do observado no 14º dia ($P < 0.01$) observado no gráfico 11.

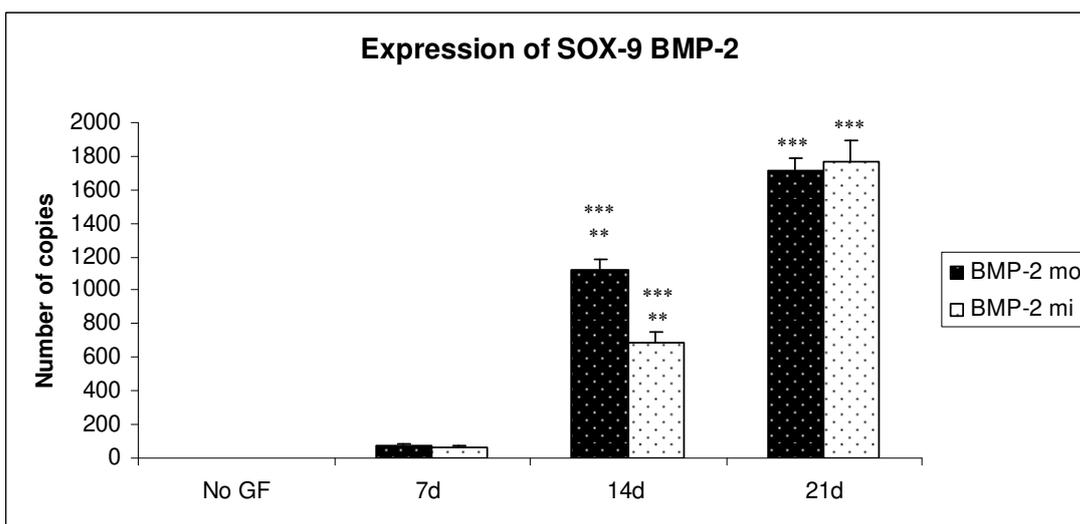


Gráfico 11. Expressão de SOX-9 nas células estimuladas com BMP-2.

$P < 0.001$ - ***; $P < 0.01$ - **; $P < 0.05$ - *

5.2.4 Células estimuladas com BMP-6

As células que foram estimuladas com BMP-6 em *monolayer* e em *micromass*, em ambos os modelos de cultura não mostraram expressão deste gene em qualquer um dos tempos.

6. Western Blotting

Colágeno tipo II

Observou-se a presença de colágeno no meio de cultura a partir de sete dias, diferentemente da PCR em tempo real, explicado pelo *pool* de meios formado pelas trocas duas vezes por semana que foi aglomerando pequenas quantidades desta proteína. Também observou-se que no dia 14 a quantidade foi maior.

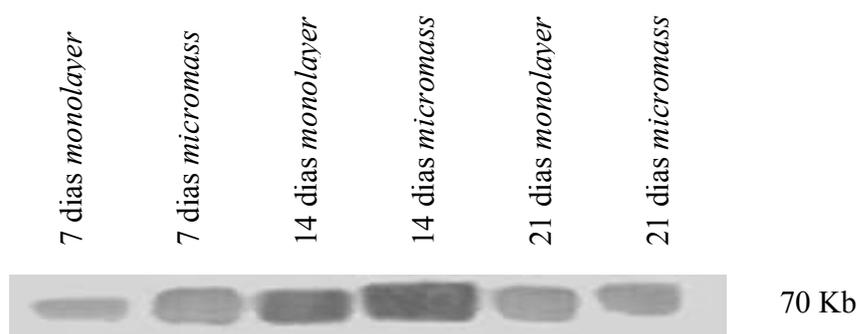


Figura 14. Western Blotting colágeno tipo II – Células estimuladas com TGF β 3

No meio de cultura das células que foram cultivadas com IGF-1, também encontramos o colágeno presente, a partir do dia 7, também explicado pela formação de um *pool* de meio. Também podemos confirmar a produção desta proteína nos dias 14 e 21.

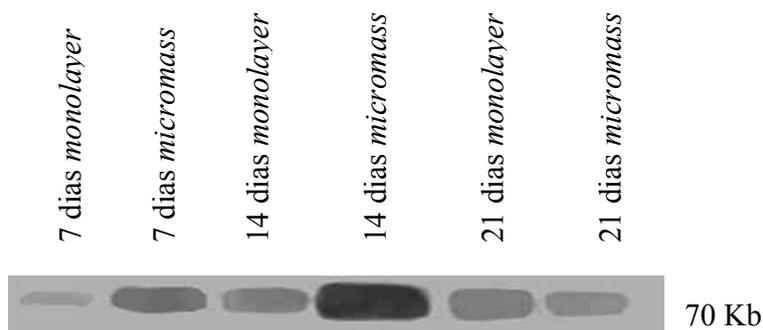


Figura 15. Western Blotting Colágeno tipo II – Células estimuladas com IGF-1

Da mesma forma encontramos essa proteína expressa nas células que foram cultivadas e estimuladas com BMP-2, no dia 7, 14 e 21, de mesmo modo que foi observado nos resultados do PCR em tempo real.

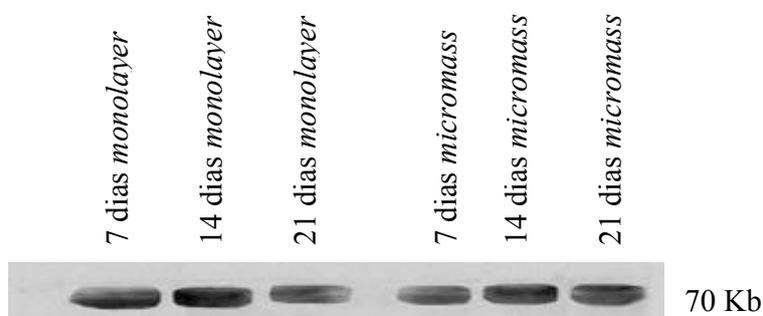


Figura 16. Western Blotting Colágeno tipo II – Células estimuladas com BMP-2

Finalmente, em relação às proteínas encontradas no meio de cultura das células estimuladas com BMP-6, também foi encontrada a presença de colágeno no meio de cultura onde estas

células foram cultivadas, no dia 7, 14 e 21. Também em concordância com os resultados obtidos na PCR em tempo real.

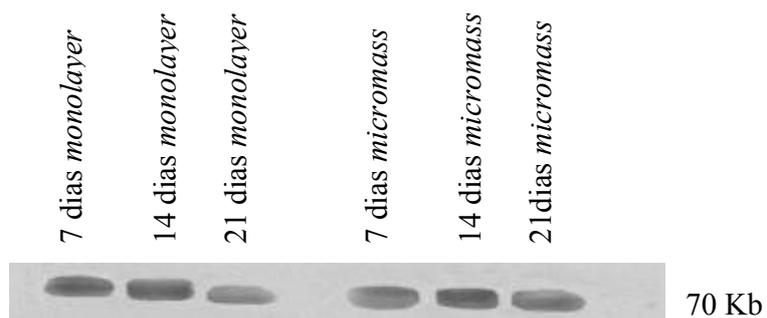


Figura 17. Western Blotting Colágeno tipo II – Células estimuladas com BMP-6

Discussão

Discussão

O potencial esperado de células progenitoras mesenquimais é um assunto de grande relevância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no contexto da terapia celular. Embora as características biológicas das células tronco mesenquimais tenham sido um assunto de intensa investigação dos últimos anos, não há uma definição universalmente aceita deste tipo de célula.

Apesar da identificação destas células no sangue do cordão umbilical humano ter sido previamente descrita (Erices, Conget et al. 2000; Goodwin, Bicknese et al. 2001) outros autores negam a presença destas células no sangue do cordão umbilical humano e defendem que há somente células de linhagem hematopoiética (Gutierrez-Rodriguez, Reyes-Maldonado et al. 2000; Mareschi, Biasin et al. 2001; Wexler, Donaldson et al. 2003). Nos experimentos conduzidos neste estudo, após isolamento das células mesenquimais pelo critério de aderência e posteriormente a avaliação por citometria de fluxo, foram identificadas células com marcadores em suas superfícies considerados positivos para linhagem de células mesenquimais e negativos para linhagem hematopoiética, além disso, observamos que quanto menor o tempo entre a coleta e o processamento do sangue, maiores seriam as chances de sucesso no isolamento das células, concordando com resultados da literatura (Kang, Zang et al. 2006). Morfologicamente, estas células adquiriram o formato fibroblastóide, também característico de células tronco mesenquimais, confirmando a existência destas células neste tecido, em concordância com os achados de outros autores (Pittenger, Mackay et al. 1999; Minguell, Conget et al. 2000). A porcentagem de êxito obtido aqui no isolamento destas células também concordam com os dados descritos na literatura, em trabalhos realizados recentemente (Kang, Zang et al.

2006; Manca, Zwart et al. 2008). Kang et al (Kang, Zang et al. 2006) estudaram diferenciação de células do sangue do cordão umbilical em osteoblastos, adipócitos e neurônios, obtendo um êxito na obtenção de células mesenquimais em 20% das amostras analisadas, semelhante a obtida neste estudo, além disso foi observado que, nas bolsas de sangue que foram processadas até 6 horas após o parto, o êxito na obtenção destas células era melhor, de forma semelhante ao que ocorreu com o observado neste trabalho, onde percebemos que a bolsa de sangue processada logo após a coleta resultava em células mais viáveis para diferenciação celular, embora esses dados não tenham sido quantificados. Outro estudo caracterizou as células mesenquimais do sangue do cordão umbilical e concluiu que é possível isolar estas células, porém com uma baixa eficiência, com padrões de crescimento e potenciais de diferenciação variados entre as amostras (Manca, Zwart et al. 2008), semelhante ao que encontramos nas nossas amostras.

Embora o sangue do cordão umbilical não apresente a mesma magnitude que a medula óssea e o tecido adiposo no que diz respeito ao conteúdo de células tronco mesenquimais (Mannello and Tonti 2007), a disponibilidade e o alto potencial hematopoiético induziram a criação de uma rede de banco de sangue de cordão umbilical e o desenvolvimento de esforços para o seu uso prático na medicina, desencadeando a realização de diversos estudos, inclusive o presente. Dessa forma avaliou-se aqui a viabilidade da condrogênese a partir de células mesenquimais oriundas do sangue do cordão, por meio de técnica atuais que analisaram quantitativamente a expressão de genes específicos da cartilagem articular humana, tais como colágeno do tipo II e o Sox-9, fator de transcrição importante porque precede a produção do colágeno tipo II, como já comentado. Uma vez que este fator de transcrição é expresso indica que a célula sintetiza colágeno tipo II caracteristicamente produzido por condrócitos articulares, diferentemente

dos condrócitos que após hipertrofia induzem a formação de colágeno tipo I, matriz osteóide e osso (Akiyama, Chaboissier et al. 2002; Poole 2003). Quando o condrócito não expressa este fator de transcrição ele se hipertrofia e produz cartilagem calcificada (Akiyama, Chaboissier et al. 2002). Verificou-se ainda no presente estudo a presença do proteoglicano agrecano, macroagregado mais frequente na cartilagem humana, embora não seja exclusivamente presente neste tecido, podendo ser encontrado em tendão (Vogel, Sandy et al. 1994), placa de crescimento (Shum, Coleman et al. 2003), e que está diretamente ligada à sua função, através da observação da expressão do seu gene. Além da expressão destes genes pelas células neoformadas, também foi objetivo no corrente estudo, avaliar a produção destas proteínas, analisadas pela realização de *imunoblottings*, por meio da precipitação destas a partir de um *pool* de meio de cultura armazenado a partir de suas trocas.

Estudos prévios mostram o papel crucial da cascata de sinalização ativada pelos membros da família de TGF- β , promovendo a expressão dos genes específicos de cartilagem (Tuli, Seghatoleslami et al. 2002; Lee, Kim et al. 2004). Tuli et al (Tuli, Tuli et al. 2003) estudaram o papel do TGF- β na condrogênese e o envolvimento da N caderina - em células progenitoras mesenquimais derivadas de osso trabecular humano, mostrando que o TGF- β inicia e mantém a condrogênese envolvendo um aumento dos níveis de N-caderina que se expressa durante a condensação celular pela regulação das moléculas de adesão. Este fato sugere que a condensação celular *in vitro* promoveria uma condrogênese mais aproximada da que ocorre *in vivo*, resultando em uma matrix cartilaginosa mais eficiente e próxima da encontrada na MEC normal. Mello e Tuan (Mello and Tuan 1999) desenvolveram estudos com células mesenquimais de embrião de galinha, submetendo-as a cultura em *micromass*, uma vez que a condensação celular é um pré-estágio para

condrogênese estimulando o aumento da liberação de N-caderina. Desse modo eles estudaram o papel desta proteína com embriões mutantes para esta molécula, isto é, embriões cuja sequencia genética responsável pela síntese desta proteína foi deletada do DNA, e embriões selvagens, ou seja, onde a sequência de DNA estava íntegra. A condrogênese foi então caracterizada através de marcadores fenotípicos de condrócitos. Observaram então que os embriões com mutação deletada para N-caderina diminuíram a condensação celular e houve alteração na condrogênese enquanto que as culturas realizadas com o tipo selvagem de embrião se condensaram normalmente, mostrando que a regulação da N-caderina é um passo importante na condrogênese a partir de células mesenquimais. Pensando nestes resultados apresentados por eles é que se optou no corrente estudo, avaliar-se a diferenciação das células mesenquimais em condrócitos em dois modelos de cultura: *monolayer* e *micromass*, com a hipótese de que, pelo fato das células estarem condensadas, liberariam mais N-caderina e se diferenciariam em condrócitos com maior semelhança ao que acontece *in vivo*.

No entanto, diferentemente do que se esperava, observou-se sim a produção de colágeno tipo II também em *monolayer*, e não apenas em *micromass*, já a partir do 14º dia em todos os grupos que foram estimulados com os quatro fatores de crescimento estudados. No entanto, nas células cultivadas em *monolayer* e estimuladas com TGF- β 3 a produção de colágeno foi ainda maior do que a observada com os demais fatores de crescimento, de maneira similar ao observado em outros estudos realizados e que demonstraram a produção do colágeno a partir de 14 dias em células mesenquimais de medula óssea, indicando desta forma que as células derivadas do cordão umbilical podem se comportar de maneira semelhante às células derivadas de outros tecidos. (Lee, Kim et al. 2004; Neumann, Dehne et al. 2008). Este fato pode estar associado à ação isolada destes fatores de crescimento,

particularmente do TGF- β 3. Depois de 21 dias em cultura, observou-se que a expressão do colágeno diminuiu em *monolayer* e se manteve em *micromass*, provavelmente em razão da desdiferenciação celular que ocorre com condrócitos mantidos em *monolayer*. É sabido que condrócitos em *monolayer* perdem seu fenótipo e passam a expressar colágeno tipo I ao invés do colágeno tipo II e uma vez que isso ocorre o tecido formado é fibrocartilagenoso com propriedades inferiores à cartilagem hialina, própria da cartilagem articular (Hickok, Haas et al. 1998).

A expressão de agrecano nas células estimuladas com TGF β 3, da mesma forma que o colágeno, também apareceu a partir do 14º dia, não somente em *micromass*, mas surpreendentemente de maneira expressiva também em *monolayer*. Este fato pode ser em parte explicado pela não especificidade deste gene, que pode também aparecer em outros tecidos, como por exemplo o tendão (Vogel, Sandy et al. 1994), placa de crescimento (Shum, Coleman et al. 2003), condrócitos hipertróficos (Shum, Coleman et al. 2003) e que também, ao que parece, estão sujeitos também a outros mecanismos de regulação que não aqueles envolvidos pela liberação de moléculas de adesão, como ocorre em relação ao colágeno do tipo II e ao Sox-9 neste sistema de cultura, onde a alta densidade celular induz ao aumento de produção de N-caderina conforme descrito anteriormente (Tuli, Tuli et al. 2003). Todavia, no 21º dia de cultura a expressão foi maior em *micromass* concordando com estudo anterior (Xu, Wang et al. 2008).

Da mesma forma, foi observado que a expressão do Sox-9 também se manteve igual no 14º dia e 21º dia nas células cultivadas em *micromass*, porém, a expressão do Sox-9 diminuiu no 21º dia das células cultivadas em *monolayer*. Estudos anteriores realizados em ratos mostraram que o Sox-9 é altamente expresso durante o processo de formação do condrócito, assim como, durante o desenvolvimento gonadal (Wright, Hargrave et al. 1995;

Kent, Wheatley et al. 1996). Além disso, outros estudos relatou que o Sox-9 é expresso em todas as células precursoras condrogênicas e em condrócitos que produzem colágeno tipo II (Zhao, Eberspaecher et al. 1997), estudo este, o qual avaliou-se o papel do Sox-9 na formação da cartilagem em vários estágios de desenvolvimento de embriões de camundongos e observou-se uma perfeita correlação entre os níveis de Sox-9 e a expressão do colágeno tipo II. Sox-9 não foi observado em condrócitos hipertróficos, que podem se tornar osso como demonstrado por Benya et al. em 1982 (Benya and Shaffer 1982) quando notaram que a expressão do colágeno II se perde após três passagens em cultura em *monolayer*, mas que também é possível recuperar o fenótipo de condrócito quando estas células são transferidas para o sistema de cultura tridimensional (Benya and Shaffer 1982). Esta alteração de fenótipo é denominada desdiferenciação e descreve, como já comentado, a conversão dos condrócitos em células com aspecto semelhante ao dos fibroblastos. O mecanismo pelo qual este processo ocorre permanece por ser elucidado, já tendo sido observado que começa a ocorrer nos primeiros dias de cultura (Darling and Athanasiou 2005). Estes achados foram posteriormente confirmados por outros (Lemare, Steimberg et al. 1998; Haudenschild, McPherson et al. 2001; Stokes, Liu et al. 2001; Lee, Reisler et al. 2003; Lin, Fitzgerald et al. 2008). Assim pode se explicar a diminuição da expressão do Sox-9, nas células estimuladas com TGFβ3 no 21ºd quando mantida em *monolayer*, ao passo que as células que estavam em *micromass* mantiveram o nível de expressão deste gene tal qual ocorrido no presente estudo.

Estes resultados indicam que, ao trabalhar-se com condrócitos diferenciados a partir de células mesenquimais provenientes de cordão umbilical, cultivados em *micromass*, o fenótipo é mantido, ao passo que, no cultivo destas células em *monolayer* o fenótipo é

alterado mais rapidamente, provavelmente comprometendo a qualidade da matriz produzida.

Também observou-se que bastam 14 dias de cultura com TGF β 3 para se obter uma célula íntegra produzindo os constituintes mais abundantes e funcionais da cartilagem. Obviamente mais estudos, avaliando-se também outros componentes menores deste tecido, tais como os colágenos dos tipos IX e XI, proteoglicanos menores, e outras tantas proteínas colagênicas e não colagênicas que também compõem a MEC da cartilagem este tecido serão necessários para corroborar estes achados.

Tem sido relatado que o IGF-1 tem efeito na atividade mitogênica e síntese de matriz articular (Fukumoto, Sperling et al. 2003). Fukumoko et al, mostrou que em células contidas no periósteo de coelhos, o IGF-1 promove condrogênese, porém quando combinado com TGF β 3 ocorre uma maior expressão do colágeno tipo II. No corrente estudo, nas células estimuladas com IGF-1 sozinho e mantidas em cultura de *micromass* foi observado a produção de colágeno tipo II a partir do 14º dia, com o aumento desta no 21º de forma significativamente maior do que as células que foram cultivadas em *monolayer*, Nestas últimas, a expressão do colágeno se manteve constante após o 14º dia. Este achado demonstra que o IGF-1 é um indutor da condrogênese em concordância com o que já se conhecia na literatura em relação à formação de condrócitos a partir de outras fontes de células mesenquimais, como por exemplo, os achados de um estudo recente (Uebersax, Merkle et al. 2008), onde induziu-se a condrogênese a partir de células da medula óssea com IGF-1. Num outro trabalho ainda (Wang and Detamore 2009) induziu-se a condrogênese em células do sangue do cordão umbilical humano em gel tridimensional com IGF-1 combinando com TGF- β 1. Apesar do IGF-1 ter se mostrado indutor da condrogênese, neste nosso estudo onde comparou-se ambos os fatores de crescimento

isoladamente, houve uma expressão mais significativa quando utilizado o TGF- β 3. A razão para esta diferença provavelmente se relaciona ao fato de que nos estudos referidos não se analisou a ação isolada destes fatores de crescimento, no presente estudo, embora comparação estatística não tenha sido realizada, observou-se que o número de cópias relativas deste gene foi maior nas células cuja diferenciação foi feita com TGF- β 3.

A expressão do Sox-9 nas células estimuladas com IGF-1 foi maior no 21º dia, em células mantidas em *micromass*. Mais uma vez, atribuí-se esse fato ao sistema de cultura em *monolayer* que diminui a expressão do Sox-9.

A família das BMPs são distinguidas dos TGF β por apresentarem duas cisteínas extras conservadas, e também por serem potentes fatores de diferenciação *in vitro*. Várias BMPs, incluindo as BMP-2, BMP-4, BMP-6 e BMP-7 induzem a diferenciação de células multipotentes mesenquimais de linhagens celulares, como por exemplo, C3H10T1/2 (linhagem de células de ratos) em células precursoras osteocondrogênicas ou osteoblásticas, e até a diferenciação de condrócitos isolados (Haas and Tuan 1999; Shea, Edgar et al. 2003; Wan and Cao 2005). A necessidade das BMPs para manter a expressão do gene Sox é consistente com o resultado de outros estudos demonstrando um contínuo recrutamento das BMPs durante a diferenciação condrogênica e regulação do colágeno tipo II (Shea, Edgar et al. 2003; Park, Sugimoto et al. 2005).

Dessa forma, observou-se aqui a expressão do colágeno tipo II e agrecano, sendo que em *micromass*, no 21º dia, a expressão foi maior para os dois genes nas células quando estimuladas com BMP-2 e BMP-6, tanto em *monolayer* quanto em *micromass*, porém, as células estimuladas com BMP-6 não expressaram Sox-9. Este achado pode estar relacionado ao fato deste fator de crescimento estar envolvido com a produção de condrócitos hipertróficos, os quais dão origem ao tecido ósseo, isto é, são osteogênicas e

não condrogênicas, mostrados por Boskey et al quando em células mesenquimais de galinhas, induziu-se as células à uma estrutura cartilaginosa semelhante a epífise de crescimento com BMP-6 e não cartilagem hialina (Boskey, Paschalis et al. 2002). As células estimuladas com BMP-2, por sua vez, expressaram agregano e Sox-9, concordando com estudos prévios, onde o envolvimento da BMP-2 na diferenciação de condrócito articular e expressão do Sox-9 foi verificada (Shea, Edgar et al. 2003; Park, Sugimoto et al. 2005; Pan, Yu et al. 2008). A expressão do Sox-9, no corrente estudo, foi tempo-dependente e similar, tanto em *monolayer* quanto em *micromass*. Os achados aqui encontrados demonstram que em estudos futuros o uso de BMP-2 ou IGF-1 será suficiente, assim como TGF- β 3 também se mostrou eficiente quando utilizado isoladamente no estímulo para a diferenciação de células mesenquimais em condrócitos. Os achados aqui apresentados permitem afirmar no entanto que dos fatores de crescimento estudados, o TGF- β 3 isoladamente se mostrou o melhor fator de diferenciação quando usados em células mesenquimais provenientes do sangue do cordão umbilical cultivadas em *micromass*. Este sistema também foi importante na manutenção do fenótipo obtido na diferenciação.

Este estudo permitiu, portanto, demonstrar enfaticamente que o uso do sangue de cordão, ao lado do tecido adiposo e de células de medula óssea, é viável e que a qualidade dos condrócitos diferenciados a partir desta fonte é tão boa opção quanto aquelas provenientes dos demais tecido, apresenta grande disponibilidade e, diferentemente destas outras fontes citadas, não necessita de procedimentos invasivos como a punção da medula, da lipoaspiração ou ainda a retirada cirúrgica de tecidos adiposo. Além disso, o fato destas células possuírem HLA classe II reduz significativamente a possibilidade de rejeição em caso de enxerto. O sangue do cordão umbilical abre perspectivas para estudos futuros destes condrócitos, principalmente com o uso de matrizes feitas com diferentes polímeros e

sobre o seu comportamento em modelos *ex vivo*. Estes fatos poderão levar a uma substancial redução nos custos da diferenciação das células em condrócitos.

Conclusão



Conclusão

1) Células mesenquimais estão presentes no sangue do cordão umbilical humano, embora numa porcentagem baixa, mas ainda assim podem ser isoladas.

2) Estas células são viáveis e podem induzir a condrogênese quando estimuladas com fatores de crescimento envolvidos com a diferenciação em condrócito.

3) O TGF- β 3, o IGF-1, e a BMP-2 são capazes de induzir o processo de diferenciação para condrócito articular, e a BMP-6 envolvida com condrogênese de condrócito hipertrófico.

4) A diferenciação pode ser vista a partir do 14º dia de estímulo.

5) Dentre esses fatores de crescimento para diferenciação, o TGF- β 3 se mostrou mais eficiente; sendo capaz de manter por maior tempo o fenótipo da célula, por um período maior. O melhor tempo para se observar a diferenciação celular é após 21 dias de estímulo.

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

- Ahrens, P. B., M. Solursh, et al. (1977). "Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture." Dev Biol **60**(1): 69-82.
- Akiyama, H., M. C. Chaboissier, et al. (2002). "The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6." Genes Dev **16**(21): 2813-28.
- Alison, M. R., R. Poulson, et al. (2002). "An introduction to stem cells." J Pathol **197**(4): 419-23.
- Awad, H. A., Y. D. Halvorsen, et al. (2003). "Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells." Tissue Eng **9**(6): 1301-12.
- Benya, P. D. and J. D. Shaffer (1982). "Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels." Cell **30**(1): 215-24.
- Bi, W., J. M. Deng, et al. (1999). "Sox9 is required for cartilage formation." Nat Genet **22**(1): 85-9.
- Bicknese, A. R., H. S. Goodwin, et al. (2002). "Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia." Cell Transplant **11**(3): 261-4.
- Bilgen, B., E. Orsini, et al. (2007). "FBS suppresses TGF-beta1-induced chondrogenesis in synoviocyte pellet cultures while dexamethasone and dynamic stimuli are beneficial." J Tissue Eng Regen Med **1**(6): 436-42.

- Boskey, A. L., E. P. Paschalis, et al. (2002). "BMP-6 accelerates both chondrogenesis and mineral maturation in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell cultures." J Cell Biochem **84**(3): 509-19.
- Bunnell, B. A., W. Deng, et al. (2005). "Potential application for mesenchymal stem cells in the treatment of cardiovascular diseases." Can J Physiol Pharmacol **83**(7): 529-39.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." J Mol Endocrinol **29**(1): 23-39.
- Centrella, M., M. C. Horowitz, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta gene family members and bone." Endocr Rev **15**(1): 27-39.
- Cetrulo, C. L., Jr. (2006). "Cord-blood mesenchymal stem cells and tissue engineering." Stem Cell Rev **2**(2): 163-8.
- Darling, E. M. and K. A. Athanasiou (2005). "Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations." J Orthop Res **23**(2): 425-32.
- Denker, A. E., A. R. Haas, et al. (1999). "Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures." Differentiation **64**(2): 67-76.
- Erices, A., P. Conget, et al. (2000). "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood." Br J Haematol **109**(1): 235-42.
- Franceschi, R. T. (1992). "The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation." Nutr Rev **50**(3): 65-70.

- Franceschi, R. T. and B. S. Iyer (1992). "Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells." J Bone Miner Res **7**(2): 235-46.
- Fukumoto, T., J. W. Sperling, et al. (2003). "Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro." Osteoarthritis Cartilage **11**(1): 55-64.
- Goodwin, H. S., A. R. Bicknese, et al. (2001). "Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers." Biol Blood Marrow Transplant **7**(11): 581-8.
- Gutierrez-Rodriguez, M., E. Reyes-Maldonado, et al. (2000). "Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood." Stem Cells **18**(1): 46-52.
- Haas, A. R. and R. S. Tuan (1999). "Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function." Differentiation **64**(2): 77-89.
- Haudenschild, D. R., J. M. McPherson, et al. (2001). "Differential expression of multiple genes during articular chondrocyte redifferentiation." Anat Rec **263**(1): 91-8.
- Hickok, N. J., A. R. Haas, et al. (1998). "Regulation of chondrocyte differentiation and maturation." Microsc Res Tech **43**(2): 174-90.
- Huang, J. I., N. Kazmi, et al. (2005). "Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison." J Orthop Res **23**(6): 1383-9.

- Kang, X. Q., W. J. Zang, et al. (2006). "Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro." Cell Biol Int **30**(7): 569-75.
- Kent, J., S. C. Wheatley, et al. (1996). "A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination." Development **122**(9): 2813-22.
- Kim, D. J., S. H. Moon, et al. (2003). "Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells." Spine **28**(24): 2679-84.
- Lee, D. A., T. Reisler, et al. (2003). "Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques." Acta Orthop Scand **74**(1): 6-15.
- Lee, J. W., Y. H. Kim, et al. (2004). "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications." Yonsei Med J **45 Suppl**: 41-7.
- Lee, O. K., T. K. Kuo, et al. (2004). "Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." Blood **103**(5): 1669-75.
- Lefebvre, V., W. Huang, et al. (1997). "SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene." Mol Cell Biol **17**(4): 2336-46.
- Lemare, F., N. Steimberg, et al. (1998). "Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1beta." J Cell Physiol **176**(2): 303-13.
- Lin, Z., J. B. Fitzgerald, et al. (2008). "Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation." J Orthop Res.

- Livne, E. and A. Weiss (1993). "In vitro effect of hormones and growth factors on the incorporation of [3H]leucine, [35S]sulfate and [3H]proline by chondrocytes of aging mice." Mech Ageing Dev **72**(3): 213-29.
- Longobardi, L., L. O'Rear, et al. (2006). "Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling." J Bone Miner Res **21**(4): 626-36.
- Luzo, A. C. M. (2005). Análise da Expressão Gênica das Células Mononucleares de Sangue de Cordão Umbilical Humano: Implicação no Ciclo Celular. Faculdade de Ciências Médicas. Campinas, Universidade Estadual de Campinas. **Doutorado**.
- Malladi, P., Y. Xu, et al. (2006). "Functions of vitamin D, retinoic acid, and dexamethasone in mouse adipose-derived mesenchymal cells." Tissue Eng **12**(7): 2031-40.
- Manca, M. F., I. Zwart, et al. (2008). "Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood." Cytotherapy **10**(1): 54-68.
- Mannello, F. and G. A. Tonti (2007). "Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!" Stem Cells **25**(7): 1603-9.
- Mareschi, K., E. Biasin, et al. (2001). "Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood." Haematologica **86**(10): 1099-100.
- Mello, M. A. and R. S. Tuan (1999). "High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development." In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**(5): 262-9.

- Minguell, J. J., P. Conget, et al. (2000). "Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells." Braz J Med Biol Res **33**(8): 881-7.
- Minguell, J. J., A. Erices, et al. (2001). "Mesenchymal stem cells." Exp Biol Med (Maywood) **226**(6): 507-20.
- Mobasheri, A., S. J. Vannucci, et al. (2002). "Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis." Histol Histopathol **17**(4): 1239-67.
- Modarresi, R., T. Lafond, et al. (2005). "N-cadherin mediated distribution of beta-catenin alters MAP kinase and BMP-2 signaling on chondrogenesis-related gene expression." J Cell Biochem **95**(1): 53-63.
- Neumann, K., T. Dehne, et al. (2008). "Chondrogenic differentiation capacity of human mesenchymal progenitor cells derived from subchondral cortico-spongious bone." J Orthop Res **26**(11): 1449-56.
- Ng, L. J., S. Wheatley, et al. (1997). "SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse." Dev Biol **183**(1): 108-21.
- Oberlender, S. A. and R. S. Tuan (1994). "Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis." Development **120**(1): 177-87.
- Oberlender, S. A. and R. S. Tuan (1994). "Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme." Cell Adhes Commun **2**(6): 521-37.
- Pan, Q., Y. Yu, et al. (2008). "Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter." J Cell Physiol **217**(1): 228-41.

- Pan, X. H., Y. B. Han, et al. (2002). "[Pluripotential of human adult stem cells and its application in reparative and reconstructive surgery]." Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi **16**(5): 329-32.
- Park, Y., M. Sugimoto, et al. (2005). "BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel." Osteoarthritis Cartilage **13**(6): 527-36.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Poole, A. R. (2003). "What type of cartilage repair are we attempting to attain?" J Bone Joint Surg Am **85-A Suppl 2**: 40-4.
- Rebelatto, C. K., A. M. Aguiar, et al. (2008). "Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue." Exp Biol Med (Maywood) **233**(7): 901-13.
- San Antonio, J. D. and R. S. Tuan (1986). "Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations." Dev Biol **115**(2): 313-24.
- Schwartz, E. R., W. H. Oh, et al. (1981). "Experimentally induced osteoarthritis in guinea pigs: metabolic responses in articular cartilage to developing pathology." Arthritis Rheum **24**(11): 1345-55.
- Shea, C. M., C. M. Edgar, et al. (2003). "BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis." J Cell Biochem **90**(6): 1112-27.

- Shirasawa, S., I. Sekiya, et al. (2006). "In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells." J Cell Biochem **97**(1): 84-97.
- Shum, L., C. M. Coleman, et al. (2003). "Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton." Birth Defects Res C Embryo Today **69**(2): 102-22.
- Stokes, D. G., G. Liu, et al. (2001). "Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors." Biochem J **360**(Pt 2): 461-70.
- Tuli, R., M. R. Seghatoleslami, et al. (2002). "p38 MAP kinase regulation of AP-2 binding in TGF-beta1-stimulated chondrogenesis of human trabecular bone-derived cells." Ann N Y Acad Sci **961**: 172-7.
- Tuli, R., S. Tuli, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk." J Biol Chem **278**(42): 41227-36.
- Uebersax, L., H. P. Merkle, et al. (2008). "Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." J Control Release **127**(1): 12-21.
- Valcourt, U., J. Gouttenoire, et al. (2002). "Functions of transforming growth factor-beta family type I receptors and Smad proteins in the hypertrophic maturation and osteoblastic differentiation of chondrocytes." J Biol Chem **277**(37): 33545-58.
- Vogel, K. G., J. D. Sandy, et al. (1994). "Aggrecan in bovine tendon." Matrix Biol **14**(2): 171-9.

- Wagner, T., J. Wirth, et al. (1994). "Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9." Cell **79**(6): 1111-20.
- Wan, M. and X. Cao (2005). "BMP signaling in skeletal development." Biochem Biophys Res Commun **328**(3): 651-7.
- Wang, J. F., L. J. Wang, et al. (2004). "Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation." Haematologica **89**(7): 837-44.
- Wang, L. and M. S. Detamore (2009). "Insulin-like growth factor-I improves chondrogenesis of predifferentiated human umbilical cord mesenchymal stromal cells." J Orthop Res **27**(8): 1109-15.
- Watt, F. M. and B. L. Hogan (2000). "Out of Eden: stem cells and their niches." Science **287**(5457): 1427-30.
- Wexler, S. A., C. Donaldson, et al. (2003). "Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not." Br J Haematol **121**(2): 368-74.
- Woodward, W. A. and R. S. Tuan (1999). "N-Cadherin expression and signaling in limb mesenchymal chondrogenesis: stimulation by poly-L-lysine." Dev Genet **24**(1-2): 178-87.
- Wozney, J. M. (1989). "Bone morphogenetic proteins." Prog Growth Factor Res **1**(4): 267-80.
- Wright, E., M. R. Hargrave, et al. (1995). "The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos." Nat Genet **9**(1): 15-20.

- Xu, J., W. Wang, et al. (2008). "Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate gels." Tissue Eng Part A **14**(5): 667-80.
- Yamaguchi, A., T. Katagiri, et al. (1991). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro." J Cell Biol **113**(3): 681-7.
- Yamanaka, S., J. Li, et al. (2008). "Pluripotency of embryonic stem cells." Cell Tissue Res **331**(1): 5-22.
- Yoon, B. S. and K. M. Lyons (2004). "Multiple functions of BMPs in chondrogenesis." J Cell Biochem **93**(1): 93-103.
- Zhao, Q., H. Eberspacher, et al. (1997). "Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis." Dev Dyn **209**(4): 377-86.

Anexos



Comissão de Pesquisa 2005

Campinas, 20 de agosto de 2005

O protocolo de pesquisa "INDUÇÃO DA CONDRÓGENESE EM CÉLULAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO ESTIMULADO COM TGF- β 1 E IGF". da pesquisadora Cristiane Sampaio de Mara, foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/FCM/UNICAMP

Atenciosamente,



Profa. Dra. Lúcia Helena Costa Paiva

Presidente da Comissão de Pesquisa
Departamento de Tocoginecologia - DTG/FCM/UNICAMP

Comissão de Pesquisa-FCM-DTG-UNICAMP
Rua Alexander Fleming, 101 - Cidade Universitária Zeferino Vaz - Campinas/SP
Fones: (019) 3788-9402/3788-9403

Anexo 1. Parecer Comitê de Ética em Pesquisa CAISM



MATERNIDADE DE CAMPINAS

Campinas, 26 de Abril de 2005.

A/C Cristiane Sampaio de Mara

Venho por meio desta informar que a Comissão de Ética Médica aprovou o projeto de pesquisa **“Indução da condrogênese em células de cordão umbilical humano estimulado com TGF-B1 e 1GF”**, salientando também que não há impedimentos do ponto de vista ético para a realização do estudo na Instituição.

Atenciosamente,

Dr. Carlos Alberto Politano

-Presidente da Comissão de Ética Médica da Maternidade de Campinas-

SOCIEDADE CIVIL BENEFICENTE - INSTITUIÇÃO DE UTILIDADE PÚBLICA
(Dec. Federal Nº 46140 de 04/06/59) - (Dec. Estadual Nº 165 de 29/10/73) - (Dec. Municipal Nº 1622 de 19/10/56)
Av. Orosimbo Maia, 165 - PAEX (19) 3731-5000 - CEP 13023-910 - V. Itapura - Campinas - SP - E-mail: diretoria@maternidadedecampinas.com.br
CNPJ 46.043.980/0001-00 (Inscrição Estadual - Isento)

Anexo 2. Parecer Comitê de Ética em Pesquisa Maternidade de Campinas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar voluntariamente de um estudo de pesquisa para melhor conhecer o funcionamento da cartilagem e para poder auxiliar no tratamento de pessoas que sofrem de doenças como a artrose. Esta folha de informação tem como objetivo fornecer-lhe maiores detalhes sobre este estudo de forma que você possa decidir ou não participar do mesmo. É importante que você entenda que não há nenhum risco adicional para você e nem para a criança uma vez que será utilizado o cordão umbilical que alimentava a criança enquanto ele estava sendo gerada na barriga da mãe, e que, após o parto, este material seria descartado. Os benefícios deste estudo estão relacionados ao melhor conhecimento do funcionamento da cartilagem e com isto ampliar as possibilidades de tratamento para doenças articulares como a artrose.

Procedimento do Estudo

Para participar deste estudo você deve estar disposto a permitir que seja utilizado o cordão umbilical de seu filho após o parto e que será utilizado para formação de células da cartilagem. Este tecido seria descartado se não fosse utilizado para este estudo. Caso não deseja participar desta pesquisa, sua atitude não afetará seu tratamento na UNICAMP E nem de seu filho.

Termo de participação

Pesquisa: Indução da condrogênese em células de cordão umbilical humano estimulado com TGF - β 1 e IGF

Responsável: Cristiane Sampaio de Mara

Dados do País:

Nome Pai: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ RG: _____

Endereço: _____ Tel. _____

HC _____

Nome Mãe: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ RG: _____

Endereço: _____ Tel _____

HC _____

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pela criança: _____

Eu abaixo assinado, expliquei e discuti todos os detalhes relevantes deste estudo com os pais da criança, usando linguagem compreensível e apropriada

Assinatura do responsável pelo estudo: _____

Cristiane Sampaio de Mara

Fone: 019- 37887776 ou 019-37887773 (ambulatório de reumatologia)

Data : ____/____/____

Comitê de Ética para reclamações: Fone: 019- 37888936

Anexo 3. Termos de consentimento.

Apêndice



THU0088] CHONDROGENESIS DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD WITH TGF BETA 3 AND IGF-1

C.S. Mara, A.R. Sartori, A.S. Duarte, A.C. Luzo, A.M. Samara, I.B. Coimbra. Molecular Biology Laboratory of Cartilage - Internal Medicine, State University of Campinas - UNICAMP, Campinas, Brazil

Background: Mature articular cartilage is vulnerable to injuries and disease processes that cause irreversible tissue damage related to its limited capacity for self-repair. The numerous experimental attempts aimed to induce the healing of histologic and macroscopic lesions within mature articular cartilage in order to re-establishing a structurally and functionally competent repair tissue of an enduring nature. Recently, adult mesenchymal stem cells (MSCs) have been focused as an alternative source of cells for cartilage repair. It is well accepted that umbilical cord blood can be one of the sources of MSCs, which can produce cells of different lineages such as cartilage, bone and fat. Cellular condensation is a require step in the initiation of mesenchimal chondrogenesis. Thus in this study we attempted to differentiate cells from umbilical cord blood into chondrocytes in high density *micromass* culture and *monolayer* to evaluate the expression of type II collagen, Agrecan and SOX-9.**Methods:** Umbilical cord blood (UCB) from 130 patients was harvested. Mononuclear cells were isolated with Ficoll-Hystopaque. The mononuclear cells were set in culture flasks. The adherent cells were expanded and after the 2nd passage they were cultured 3 weeks in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with transforming growth factor-beta 3(TGF-beta 3)in a final concentration of 10 ng/ml and insulin-like growth factor-1 (IGF-1),final concentration of 100ng/ml in *monolayer* and *micromass* culture. After 7, 14 and 21 days, cell differentiation was verified using qRT-PCR for the type II collagen gene, aggrecan gene and western blotting analysis of the secreted collagen II protein in the culture medium.**Results:** Expanded cells showed typical cell surface antigens known from mesenchymal stem and progenitor cells. They were homogenously positive (79,56%) for CD90, and negative for antigens of hematopoetic differentiation. The relative expression of the mRNA for type II collagen, aggrecan and sox-9 was found after 14 days in TGF-beta 3 stimulated cells and IGF-1 cells in both systems of culture (*monolayer* and *micromass*).On 21 day in *micromass* culture the expression of all genes was greater, except for the collagen gene, which in *monolayer* in the presence of TGF-beta 3, was over expressed on the 14th day.These results showed us that TGF-beta-3 was more efficient in chondrogenesis than IGF-1. As far as the protein levels were concerned, in the western blotting, we found a greater expression of type II collagen in *micromass* culture with

TGF beta-3, after 3 weeks. **Conclusion:** The results of this study demonstrate that TGF-beta 3 in *micromass* culture can be the best growth factor, acting to the regulation, proliferation and differentiation of mesenchymal cells from UCB during chondrogenesis. This approach may provide an alternative to autologous grafting, more study using this approach are necessary.

Disclosure of Interest: This study was support by a grant from CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento). Project number 552195/05-7

Ann Rheum Dis 2009;68(Suppl3):200

Date: Thursday, June 11, 2009

Session Info: Cartilage and synovial-like fibroblasts



Chondrogenesis from Umbilical Cord Blood Cells stimulated with BMP-2 and BMP-6

Journal:	Connective Tissue Research
Manuscript ID:	GCTS-2009-0087
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	01-Oct-2009
Complete List of Authors:	Hara, Cristiane; State University of Campinas, Department of Clinical Medicine Duarte, Adriana; State University of Campinas, Department of Clinical Medicine Sartori, Angélica; State University of Campinas, Department of Clinical Medicine Colmbra, Ibsen; State University of Campinas, Department of Clinical Medicine
Keywords:	Umbilical cord blood, Mesenchymal stem cells, Chondrogenesis, Monolayer culture, Micromass culture, BMP-2, BMP-6



URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/gcts>

Periosteum as a source of pluripotent mesenchymal stem cells: TGF- β 3 effects on cell differentiation

Journal:	<i>European Journal of Clinical Investigation</i>
Manuscript ID:	EJCI-2009-0435
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	06-Oct-2009
Complete List of Authors:	Mara, Cristiane; State University of Campinas, Department of Clinical Medicine Sartori, Angélica; State University of Campinas, Department of Clinical Medicine Duarte, Adriana; State University of Campinas, Department of Clinical Medicine Andrade, Andre; State University of Campinas, Department of Clinical Medicine Pedro, Marcio; State University of Campinas, Department of Clinical Medicine Coimbra, Ibsen; State University of Campinas, Department of Clinical Medicine
Keywords:	Periosteum, Mesenchymal Stem Cells, Chondrogenesis, High Density Culture, Monolayer Culture, TGF beta 3

**Regulation of Chondrogenesis by TGF- β 3 and IGF-1 from
 Human Mesenchymal Umbilical Cord Blood Cells**

Journal:	<i>The Journal of Rheumatology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Manuscript
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Mara, Cristiane; State University of Campinas, - Department of Clinical Medicine Duarte, Adriana; State University of Campinas, Clinical Medicine Sartori, Anelica; State University of Campinas, Clinical Medicine Luzo, Anela; State University of Campinas, Clinical Medicine Saad, Sara; State University of Campinas, Clinical Medicine Coimbra, Ibsen; State University of Campinas, Clinical Medicine
Keywords:	Stem cells, Osteoarthritis, Chondrocytes, Collagen, Stem cell transplantation



view