ANDRESA FORTE

Expansão *ex vivo* das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical: análise comparativa da proliferação celular em cocultura de células-tronco mesenquimais provenientes do endotélio vascular do cordão umbilical e do tecido adiposo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Forte, Andresa

Expansão *ex vivo* das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical : análise comparativa da proliferação celular em cocultura de células-tronco mesenquimais provenientes do endotélio vascular do cordão umbilical e do tecido adiposo / Andresa Forte. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Proliferação de células 3.Células-tronco adultas 4.Células progenitoras hematopoiéticas 5.Técnicas de cocultura 6.Sangue fetal 7.Tecido adiposo 8.Cordão umbilical

USP/FM/DBD-378/14

DEDICATÓRIA

Aos meus pais...

minha referência de perseverança, dedicação e amor pela medicina.

Com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida e sempre me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar a vida, saúde e as oportunidades que tive até aqui.

Aos meus pais, Niolanda e Adelson, meu alicerce e o meu maior exemplo de vida e luta. Agradeço o amor, compreensão e dedicação contínua.

Ao meu querido irmão, Carlos Eduardo, por me colocar pra cima nos momentos mais difíceis, por me ensinar a ver as coisas de uma forma mais leve e por ser tão companheiro. Sei que sempre poderei contar contigo.

Aos meus irmãos que a vida me deu de presente, Rodrigo, Bruno e Milene, por terem me aceito de braços abertos, pelo apoio, incentivo, pelo carinho que me demonstram todos os dias e por me fazerem sentir que nunca estarei sozinha.

Ao meu marido, Lucas, pela paciência, carinho, respeito, amor, por ser meu lado de equilíbrio e por ser esse companheiro incrível que está ao meu lado sempre, independente da situação em que estou vivenciando.

Ao Dr. Sérgio Bydlowski, pela oportunidade em seu laboratório e por me manter calma nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Aos queridos Débora e Jorge, pela ajuda e ensinamentos precisos.

À toda equipe do LIM-31 pelo apoio.

À toda equipe do Departamento de Obstetrícia, pelo auxílio na coleta de amostras.

À CordCell – Stem Cell Banking, pelo apoio financeiro e por permitir eu dedicar uma parte do meu tempo à essa pesquisa.

EPÍGRAFE

“Todos os nossos sonhos podem se tornar realidade – se tivermos a coragem de
perseguir-los.” – Walt Disney

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviações

Lista de figuras e tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Células-tronco embrionárias.....	3
1.2	Células-tronco adultas	5
1.2.1	Células-tronco mesenquimais	6
1.2.2	Células-tronco hematopoiéticas	9
1.3	Sangue do cordão umbilical	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	MÉTODOS	17
3.1	Coleta de amostras e elegibilidade	18
3.1.1	Sangue e tecido do cordão umbilical	18
3.1.2	Tecido adiposo	21
3.2	Isolamento e congelamento das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical	22
3.3	Isolamento das células-tronco do tecido do cordão umbilical	23
3.4	Caracterização das células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais	23
3.4.1	Ensaio clonogênico	23
3.4.2	Imunofenotipagem das células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais	24
3.4.3	Capacidade de diferenciação mesodérmica das células-tronco mesenquimais	25
3.5	Expansão ex vivo das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical em sistema de cocultura com células-tronco mesenquimais	26
4	RESULTADOS	32

4.1 Análises pré-expansão <i>ex vivo</i>	33
4.1.1 Imunofenotipagem de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais	33
4.1.2 Diferenciação mesodérmica das células-tronco mesenquimais	35
4.2 Análises pós-expansão <i>ex vivo</i>	36
4.2.1 Índice de proliferação das células nucleadas totais	38
4.2.2 Índice de proliferação da população CD133 ⁺ /CD34 ⁺	42
4.2.3 Índice de proliferação das células formadoras de colônias da linhagem hematopoiética	46
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

BFU-E	Colônia de células progenitoras eritróides primitivas
CD	Antígenos de diferenciação celular presentes na superfície da membrana celular
CFU-GEMM	Colônia progenitora multipotente única de granulócito, macrófago, eritrócito e megacariócito
CFU-GM	Colônia de células progenitoras de granulócito-macrófagos
CTH	Células-tronco Hematopoiéticas
CTM	Células-tronco Mesenquimais
DMSO	Dimetilsulfóxido - Criopreservante
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G-CSF	Fator de estimulação de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator de estimulação de colônia de granulócito-macrófago
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
Flt3	Mfs (major facilitator superfamily) relacionados à tirosina quinase 3 – citocina
SCF	Fator de célula-tronco
n=	Número de amostragem
PBS	Tampão fosfato salino
RPMI	Meio de cultura
SBF	Soro fetal bovino

SCU	Sangue do cordão umbilical
TA	Tecido adiposo
TCU	Tecido do cordão umbilical

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração do comprometimento das células-tronco conforme estágio de diferenciação. Modificado: Witkowska-Zimny & Wrobel, 2011	3
Figura 2	Esquema ilustrativo da hematopoiese. Modificado: Matsumoto, A. <i>et al.</i> , 2012.	10
Figura 3	Proliferação das células-tronco mesenquimais. A) Curva de crescimento das células-tronco mesenquimais do TCU (vermelho) e do TA (verde). B) Tempo de dobramento das células-tronco mesenquimais ($p=0,2925$) do TCU(36,01 horas) e do TA (40,99)	20
Figura 4	Unidades formadoras de colônias da linhagem hematopoiética do sangue do cordão umbilical pós-descongelamento. A) CFU-GM. B) BFU-E. C) CFU-GEMM.	24
Figura 5	Análise morfológica das células-tronco mesenquimais. A) Células-tronco mesenquimais do TA subconfluentes em quarta passagem. B) Células-tronco mesenquimais do TA confluentes em quarta passagem. C) Células-tronco do TCU subconfluentes em quarta passagem. D) Células-tronco mesenquimais do TCU confluentes em quarta passagem	27
Figura 6	Ilustração do desenho do estudo.	28
Figura 7	Sangue do cordão umbilical pós-descongelamento. A) Viabilidade celular das amostras de SCU (n=10). B) Análise gráfica da viabilidade celular por citometria de fluxo (Kit Live/Dead®) da amostra SCU #9.	33

Figura 8	Marcadores de células-tronco mesenquimais. Painel de marcadores positivos (CD 90, CD 105 e CD 73) e negativos (CD 34, CD 11b, CD 19 e HLA-DR) das células-tronco mesenquimais de TA e TCU.	34
Figura 9	Diferenciação mesodérmica das células-tronco mesenquimais. A) Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais do TCU e TA com coloração por Alcian Blue. B) Diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais do TCU e do TA com coloração por Vermelho de Alizarina S. C) Diferenciação adipogênica das células-tronco mesenquimais do TCU e do TA com coloração por Oil Red O.	35
Figura 10	Células-tronco hematopoiéticas após sete dias de expansão ex vivo em meio líquido e em sistema de cocultura com e sem adição de coquetel de citocinas exógenas. A) Controle I – expansão em meio líquido (StemSpan H3000 + 10% de SFB + CC100) COM adição de coquetel de citocinas exógenas no meio de cultura. B) Controle II – expansão em meio líquido (StemSpan H3000 + 10% de SFB) SEM adição de coquetel de citocinas exógenas no meio de cultura. C) Grupo I – cocultura com CTM subconfluentes de TA. D) Grupo I – cocultura com CTM confluyente de TA. E) Grupo II – cocultura com CTM subconfluyente de TA. F) Grupo II – cocultura com CTM confluyente de TA. G) Grupo I – cocultura com CTM subconfluyente de TCU. H) Grupo I – cocultura com CTM confluyente de TCU. I) Grupo II – cocultura com CTM subconfluyente de TCU. J) Grupo II – cocultura com CTM confluentes de TCU.	37
Figura 11	Índice de proliferação das células nucleadas totais após sete dias de expansão ex vivo. Análise do Grupo I. A) Comparação da expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em meio SEM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – t test. B) Comparação do índice de proliferação entre expansão em meio líquido com adição de citocinas ($p < 0,0001$) e expansão ex vivo no sistema de cocultura com CTM confluentes provenientes do TA e TCU – Bonferroni post-test. C) Análise entre expansão em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas de TCU e TA ($p = 0,0028$) e expansão em meio líquido com adição de citocinas (Controle I) – Bonferroni post-test. D) Análise do índice de proliferação em	

sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes de TA ($p < 0,0001$) – t test. **E)** Análise do índice de proliferação entre expansão *ex vivo* e, sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes obtidas do TCU ($p = 0,0037$) – t test.

39

Figura 12 Índice de proliferação das células nucleadas totais após sete dias de expansão *ex vivo*. Análise do Grupo II. A) Comparação da expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em meio SEM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – t test. **B)** Análise comparativa entre expansão em cocultura com CTM confluentes obtidas de TA e TCU e expansão em meio líquido SEM adição de citocinas exógenas ($p = 0,0011$) – Bonferroni post-test. **C)** Análise da proliferação entre expansão em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas de TA e TCU e expansão em meio líquido COM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – Bonferroni post-test. **D)** Análise do índice de proliferação em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes do TA ($p = 0,0260$) – t test. **E)** Análise do sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes obtidas do TCU ($p = 0,0869$) – t test.

40

Figura 13 Índice de proliferação da população CD133⁺/CD34⁺ após sete dias de expansão *ex vivo*. Análise do Grupo I. A) Comparação da proliferação na expansão em meio líquido COM e SEM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – t test. **B)** Comparação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas ($p < 0,0001$) e em sistema de cocultura com CTM confluentes provenientes de TA e TCU com Bonferroni post-test. **C)** Análise comparativa da expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas de TA ($p = 0,0027$) e TCU ($p < 0,05$) com Bonferroni post test. **D)** Análise da proliferação entre expansão *ex vivo* do SCU em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes de TA ($p = 0,0137$) – t test. **E)** Análise da proliferação entre expansão *ex vivo* em sistema de cocultura com células mesenquimais confluentes e subconfluentes obtidas do TCU ($p = 0,0016$) – t test.

42

Figura 14 Índice de proliferação da população CD133⁺/CD34⁺ após sete dias de expansão ex vivo. Análise do Grupo II. **A)** Comparação da proliferação na expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em meio SEM citocinas ($p < 0,0001$) – t test. **B)** Comparação do índice de proliferação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas ($p < 0,0001$) e em cocultura com CTM confluentes provenientes do TA e TCU através do Bonferroni post-test. **C)** Análise comparativa da proliferação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas a partir de TA e TCU ($p < 0,0001$) através do Bonferroni post-test. **D)** Análise do índice de proliferação entre expansão em meio líquido com adição de citocinas e em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes de TA ($p = 0,8335$) utilizando o t test. **E)** Análise do índice de proliferação entre expansão ex vivo em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes obtidas a partir do TCU ($p = 0,5466$) com o t test.

43

Figura 15 Capacidade clonogênica das células do sangue do cordão umbilical após sete dias de expansão ex vivo. Análise do Grupo I. **A)** Comparação do índice de proliferação na expansão em meio líquido (StemSpan H3000 + 10% SFB) COM e SEM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – t test. **B)** Comparação do índice de proliferação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas e expansão ex vivo em cocultura com CTM confluentes provenientes de TCU e TA – Bonferroni post-test ($p < 0,0001$). **C)** Análise comparativa da proliferação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas e expansão em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas de TA e TCU ($p < 0,0001$) – Bonferroni post-test. **D)** Análise do índice de proliferação entre expansão em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes do TA ($p = 0,0049$) – t test. **E)** Análise do índice de proliferação entre expansão em cocultura com CTM confluentes e subconfluentes obtidas do TCU ($p = 0,0228$) – t test.

46

Figura 16 Capacidade clonogênica das células do sangue do cordão umbilical após sete dias de expansão *ex vivo*. Análise do Grupo II. A) Comparação do índice de proliferação na expansão em meio líquido COM e SEM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – t test **B)** Comparação do índice de proliferação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas e expansão *ex vivo* em cocultura com CTM confluentes provenientes do TCU e TA ($p < 0,0001$) – Bonferroni post-test. **C)** Análise comparativa da proliferação das unidades formadoras de colônia entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas de TA e TCU ($p < 0,0001$) – t test. **D)** Análise do índice de proliferação entre expansão em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes de TA ($p < 0,0001$) – t test. **E)** Análise do índice de proliferação entre expansão em cocultura com CTM confluentes e subconfluentes obtidas do TCU ($p = 0,3012$) – t test.

47

Figura 17 Unidades formadoras de colônias da linhagem hematopoiética de células expandidas. A) Análise do Controle I – presença de BFU-E e CFU-GEMM. **B)** Análise do Controle II – presença de BFU-E. **C)** Análise do Grupo I – TA confluyente: Presença de CFU-GM e CFU-GEMM. **D)** Análise do Grupo I – TA subconfluyente: Presença de CFU-GEMM. **E)** Análise do Grupo II – TA confluyente: Presença de BFU-E, CFU-GM e CFU-GEMM. **F)** Análise do Grupo II – TA subconfluyente: Presença de CFU-GM e CFU-GEMM. **G)** Análise do Grupo II – TCU confluyente: Presença de BFU-E e CFU-GM. **H)** Análise do Grupo I – TCU subconfluyente: Presença de CFU-GM e CFU-GEMM. **I)** Análise do Grupo II – TCU confluyente: Presença de BFU-E e CFU-GEMM. **J)** Análise do Grupo II – TCU subconfluyente: Presença de CFU-GEMM e BFU-E.

48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios mínimos para caracterização das células-tronco mesenquimais.	9
Tabela 2	Amostras utilizadas para o experimento de expansão das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical em sistema de cocultura. Combinação de cada amostra de célula-tronco mesenquimal utilizada para cada amostra de sangue de cordão umbilical – FMUSP LIM31 – 2014.	19
Tabela 3	Tabela 3 – Densidade de células-tronco mesenquimais de tecido do cordão umbilical e tecido adiposo plaqueadas inicialmente para apresentarem posteriormente mesma quantidade de células mesenquimais para cada sistema de cocultura.....	29

RESUMO

Forte A. *Expansão ex vivo das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical: análise comparativa da proliferação celular em cocultura de células-tronco mesenquimais provenientes do endotélio vascular do cordão umbilical e do tecido adiposo* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: As células-tronco hematopoiéticas (CTH) do sangue do cordão umbilical (SCU) têm sido utilizadas com sucesso para o tratamento de doenças malignas e não malignas. No entanto, algumas unidades de SCU podem apresentar baixa quantidade de células nucleadas totais (CNT). Algumas abordagens têm sido sugeridas para evitar problemas em relação à baixa concentração de CTH no transplante, como a administração de duas unidades de SCU para o paciente e a expansão *ex vivo* de CTH. **OBJETIVO:** Avaliar as taxas de proliferação celular na expansão *ex vivo* do SCU em sistema de cocultura com células-tronco mesenquimais (CTM) obtidos a partir de diferentes fontes com alta e baixa confluência e adicionando-se ou não coquetel de citocinas no meio de cultura. **MÉTODOS:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. A coleta do SCU (n =10) foi realizada após o nascimento do bebê e expulsão da placenta. O processamento foi realizado utilizando o método de redução de volume, o qual consiste em depleção de eritrócitos. As amostras de CTM provenientes do endotélio vascular do cordão umbilical foram obtidas de doadores diferentes (n=3) e o tecido adiposo (n=3) do inventário do LIM-31. A expansão das CNT e das células com expressão de marcadores CD133⁺/CD34⁺ foram observados depois de sete dias de cultura. Além disso, o ensaio para análise de unidades de formadoras de colônias (UFC) foi realizado em todas as amostras antes e depois da expansão do SCU. Para a expansão em sistema de cocultura foi separado dois grupos para ambas as fontes de CTM (Grupo I - cocultura com adição de coquetel de citocinas vs. Grupo II - cocultura sem citocinas). **RESULTADOS:** Após sete dias, no grupo I com cocultura confluenta, a taxa de proliferação de CNT foi duas vezes maior ao comparar com cocultura subconfluenta (35 vs. 16 vezes). No mesmo grupo também foi possível evidenciar elevada taxa de proliferação de células CD133⁺/CD34⁺. O índice de proliferação das UFC no grupo I aumentou até oito vezes. A cocultura subconfluenta tanto do endotélio vascular do cordão umbilical como do tecido adiposo apresentou menor rendimento em comparação as CTM confluentes. A expansão das células na presença de citocinas apresentou maior proliferação celular ao comparar às coculturas sem adição de citocinas. **CONCLUSÃO:** Este estudo mostrou que para alto rendimento de células do SCU, o sistema de cocultura requer adição de coquetel de citocinas e CTM confluenta independentemente da fonte utilizada.

DESCRITORES: Células-tronco; Proliferação de células; Células-tronco adultas; Células progenitoras hematopoiéticas; Técnicas de cocultura; Sangue fetal; Tecido adiposo; Cordão umbilical

ABSTRACT

Forte A. *Cord blood hematopoietic stem cells ex vivo expansion: Comparative analysis of cell proliferation promoted by adipose tissue and umbilical cord endothelium mesenchymal stem cells in coculture system* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

INTRODUCTION: Umbilical cord blood (UCB) hematopoietic stem cells have been successfully used for the treatment of both malignant and non-malignant diseases. Nevertheless, some UCB units could have low total nucleated cells (TNC) dose. Several approaches have been suggested to avoid inadequacy problems of hematopoietic stem cells (HSC) number for transplantation, such as administration of two UCB units to the patient and HSC *ex vivo* expansion. **OBJECTIVE:** Evaluate UCB *ex vivo* expansion proliferative rates in a high and low mesenchymal stem cells (MSC) confluence feeder layer obtained from different MSC sources and by adding or not cytokines cocktail into the medium. **METHODS:** This study was approved by the Research Ethic Committee (CAPESQ) of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. The collection of UCB (n=10) was made after delivery of the infant and the expulsion of placenta. Processing was performed using volume reduction method which consists in red blood depletion. MSC samples from umbilical cord endothelium were obtained from three different donors and adipose tissue (n=3) obtained from LIM31's pattern inventory. The total nucleated cell (TNC), expression of hematopoietic surface markers such as CD133⁺/CD34⁺ were observed after seven days of culture. Beyond that, colony forming unit assay (CFU) was performed before and after UCB expansion. The expansion by coculture method was observed in two groups (Group I – coculture with cytokines cocktail added vs. Group II- coculture without cytokines cocktail) for both MSCs sources. **RESULTS:** After seven days, analysis of confluent coculture showed that TNC proliferation rate were almost 2 times higher than in subconfluent coculture (35 vs. 16-fold) in Group I and also revealed higher proliferative rate in CD133⁺/CD34⁺ cells considering. CFU showed similar increase after seven days of culture in comparison of day 0 (up to 8-fold). Subconfluent coculture for both umbilical cord endothelium and adipose tissue showed lower yield compared with those with high MSC confluence. The expansion in the presence of cytokines showed higher cell proliferation compared to the cocultures without addition of cytokines. **CONCLUSION:** This study showed that coculture system may require the addition of cytokines cocktail in the media and confluent MSC regardless of source for high yield of UCB cells.

DESCRIPTORS: stem cells; cell proliferation; adult stem cells; hematopoietic progenitor cells; coculture techniques; fetal blood; adipose tissue; umbilical cord.

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco são células primitivas que possuem a capacidade de autorrenovação e podem dar origem às células mais especializadas. Possuem diferentes fenótipos e podem ser encontradas em vários tecidos.

A distinção para as outras células do organismo consiste em três características importantes: são células indiferenciadas e não-especializadas; são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes; são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular¹.

O avanço no entendimento da biologia das células-tronco tem aprimorado o conhecimento sobre o desenvolvimento do organismo e o interesse em investigar o potencial de reparo de células saudáveis em um tecido lesionado. Com isso, uma nova área é discutida na medicina, a terapia celular.

A capacidade de regeneração da célula-tronco está associada à fonte de obtenção e sua potência (Figura 1). Dois dos tipos de classificação das células-tronco são: as embrionárias (pluripotentes) e as adultas (multipotentes). Há uma vasta discussão sobre a plasticidade das células-tronco. Acredita-se que o microambiente, em condições específicas, pode influenciar a proliferação e a diferenciação celular².

Figura 1 – Ilustração do comprometimento das células-tronco conforme estágio de diferenciação. Modificado: Witkowska-Zimny & Wrobel, 2011

1.1 Células-tronco embrionárias

Na espécie humana, como em todos os organismos multicelulares apresentando reprodução sexuada, a fusão dos pronúcleos, resultando em um número diplóide de cromossomos é convencionalmente tomada como ponto de partida para o desenvolvimento embrionário³. Após a formação do zigoto, é iniciada a primeira de uma série de divisões mitóticas, levando à sua progressiva subdivisão em células filhas. Este processo é considerado clivagem e as novas células assim obtidas denominam-se blastômeros. À medida que ocorre a transição de oito para dezesseis blastômeros, estes começam a agrupar-se

firmemente, maximizando seus contatos intercelulares como uma esfera maciça de células, considerada blastocisto, achatadas na superfície e compactas internamente. Nesse estágio, as células mais superficiais estão restritas a uma diferenciação de linhagens extra-embriônicas, portanto somente as células da massa celular interna ainda mantêm o potencial de contribuir para todos os tecidos do embrião, sendo consideradas células-tronco embrionárias devido a potencia em formar qualquer tecido^{4,5}.

Essas células podem ser cultivadas e diferenciadas *in vitro* em todas as células somáticas de diferentes tecidos, incluindo cardiomiócitos, músculo esquelético, neurônios e células da glia, células das ilhotas pancreáticas, entre outras⁶.

Apesar de apresentarem um grande potencial de aplicação terapêutica e no estudo de desenvolvimento de doenças, há uma infindável discussão ética, política e religiosa em relação a essa fonte de obtenção de células-tronco.

Contudo, Takahashi e Yamanaka⁷ em 2006 demonstraram a reprogramação *in vitro* de células somáticas ao estágio pluripotente. Esse estudo foi considerado um grande avanço da ciência e na pesquisa com células-tronco. Portanto, em 2012, o pesquisador Shinya Yamanaka recebeu o prêmio Nobel. A técnica proposta por ele tem sido aperfeiçoada e atualmente as células iPS (*Induced Pluripotent Stem Cells*) tem ganhado cada vez mais espaço nas pesquisas em terapia celular^{8,9,10}.

1.2 Células-tronco adultas

Em um organismo vivo, o papel das células-tronco adultas é manter e reparar o tecido no qual são encontradas. Para serem classificadas como tal, precisam ser capazes de se autorrenovarem durante a vida do indivíduo. Outra característica desse tipo de célula é ser clonogênica, em outras palavras, uma única célula-tronco poderá gerar uma linhagem de células geneticamente iguais e que darão origem ao tecido em que residem. Deverão promover o desenvolvimento de células diferenciadas que sejam fenotipicamente maduras, ter a capacidade de desenvolver funções especializadas do tecido, possuir a mesma morfologia, interação com as outras células, incluindo a matriz extra-celular, expressar os mesmos marcadores de superfície de membrana e ainda o mesmo comportamento das células do tecido, a exemplo de secreção, contração ou transmissão de sinapses¹¹.

As células-tronco adultas podem ser isoladas de diferentes tecidos, como cordão umbilical e outras fontes não embrionárias. A identificação desse tipo de células-tronco depende dos marcadores presentes na superfície da membrana, antígenos de diferenciação celular (CD), o qual indica a expressão de uma proteína associada geneticamente a um estágio particular de diferenciação. Portanto, para analisar uma população específica de células é necessário primeiro identificar os antígenos de superfície e posteriormente avaliar a capacidade de diferenciação para evidenciar a multipotência das células¹².

1.2.1 Células-tronco mesenquimais

Em 1987 Friedenstein *et al.*¹³ foram os primeiros a demonstrar que na medula óssea havia células-tronco com a capacidade osteogênica, as quais atuavam como precursoras para formação de osso e cartilagem. Todavia, o nome “células-tronco mesenquimais” foi usado pela primeira vez por Caplan *et al.*¹⁴ em 1991 ao se referir à células com aderência ao plástico e capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos.

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células de formato fibroblastóide que possuem propriedades regenerativas e podem se diferenciar em tecidos da linhagem mesodérmica¹⁵. Atualmente, são aplicadas nos estudos voltados para a terapia celular e engenharia de tecidos.

Há relatos de isolamento dessas células a partir de diferentes tecidos, como sangue periférico, medula óssea fetal e adulta, cordão umbilical, fígado, líquido amniótico, cartilagem, músculo, tendões, tecido adiposo, tecido fetal, líquido sinovial, dente de leite e derme¹⁶⁻²².

Todavia, para a prática clínica, é necessário avaliar a fonte que traga maior quantidade de células e facilidade de coleta. Por muitos anos, a medula óssea foi considerada a principal fonte de CTM, porém a coleta dessas células é desconfortável e dolorosa para o paciente. Na população celular da medula, as CTM correspondem a uma quantidade muito reduzida (0.001%-0.01%)²³⁻²⁶.

O cordão umbilical (tecido) possui diversas vantagens, como: (a) coleta autóloga ou alogênica não invasiva; (b) menor risco de infecção; (c) multipotência

e (d) baixa imunogenicidade e capacidade imunossupressora. Portanto, torna-se uma fonte de CTM bastante atrativa^{27,28,29}.

Alguns grupos as têm obtido a partir de diferentes compartimentos do cordão umbilical humano, tais como áreas perivasculares dos vasos³⁰, geleia de Wharton³¹ e da veia do cordão umbilical^{32,33,34}.

Devido à facilidade e segurança da coleta, obtenção de grande quantidade de tecido em procedimento de coleta pouco invasivo e por obter alta dose de células, o tecido adiposo (TA) também tem se mostrado uma excelente fonte para obtenção das CTM³⁵. Nos últimos dez anos, a gordura tem sido reconhecida não apenas como um reservatório de energia, mas também como uma fonte rica em células-tronco multipotentes. As células-tronco derivadas desse tecido foram definidas inicialmente em 2001 por Zuk *et al.*³⁶

Espera-se que, independente da fonte de obtenção, as CTM possuam potencial em diferenciação mesodérmica. No entanto, apenas uma fração das células isoladas e aderidas ao plástico apresentam multipotencia, o que indica presença de uma população heterogênea de células com diferentes comprometimentos de linhagem, podendo estar relacionada com o microambiente *in vivo*³⁷.

Devido à heterogeneidade dessa população de células, é possível evidenciar diferença no perfil de expressão de proteína, de liberação de citocinas ou na potência das CTM de diferentes fontes.

Os estudos clínicos que empregam as CTM foram iniciados para o tratamento de várias doenças e lesões, como infarto do miocárdio³⁸, osteogênese imperfecta³⁹, doença do enxerto versus hospedeiro⁴⁰, doença de Crohn⁴¹, lesão medular⁴² e também diabetes⁴³. Acredita-se que as CTM podem exercer os efeitos terapêuticos por diferentes mecanismos: (a) capacidade de migração para os locais da inflamação após lesão do tecido; (b) diferenciação celular; (c) liberação de múltiplas moléculas bioativas capazes de estimular a recuperação de células lesionadas e inibir a inflamação e (d) pela imunomodulação⁴⁴.

Após isolamento, as CTM podem ser expandidas *in vitro*, o que permite alcançar a quantidade de células desejada para aplicação clínica. Devido à diversidade entre os estudos em relação à identificação, isolamento e metodologia para o cultivo dessas células, a Sociedade Internacional de Terapia celular definiu critérios mínimos para caracterização das CTM⁴⁵ (Tabela 1).

Tabela 1 - Critérios mínimos para caracterização das células-tronco mesenquimais

Critérios mínimos		
1. Aderência ao plástico em condições de cultura padronizadas		
2. Fenótipo	Positivo ($\geq 95\% +$)	Negativo ($\leq 2\% +$)
	CD105	CD45
	CD90	CD34
	CD73	CD14 ou CD11b
		CD79 α ou CD19
		HLA-DR
3. Diferenciação <i>in vitro</i> : Osteócitos, adipócitos, condrócitos (demonstrados por coloração)		

FONTE: Dominici M, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4): 315-17.

1.2.2 Células-tronco hematopoiéticas

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são assim chamadas, pois possuem a capacidade de gerar todas as células sanguíneas e do sistema imunológico. Na hematopoiese a cascata de evolução dessas células é separada por nível hierárquico, o qual define o grau de comprometimento (diferenciação) de cada linhagem⁴⁶ (Figura 2).

Figura 2 – Esquema ilustrativo da hematopoiese. Modificado: Matsumoto, A. *et al.*, 2012

O sistema hematopoiético adulto é mantido por um pequeno número de células estaminais que residem na medula óssea num microambiente especializado, chamado “o nicho”⁴⁷. Diferentes tipos de células têm sido encontradas no nicho, incluindo osteoblastos⁴⁸, as células endoteliais⁴⁹, as células perivasculares⁵⁰, as CTM^{51,52} e células de Schwann⁵³. Todas elas, através da liberação de fatores solúveis e o contato célula-célula, proporcionam um microambiente ideal para sustentar a autorrenovação, diferenciação e o estado

quiescente das CTH. As proteínas envolvidas no ciclo celular são as responsáveis por esse processo⁵⁴.

Há duas populações que estão relacionadas à permanência do estágio indiferenciado: CTH com longo e curto tempo de autorreplicação⁵⁵. A primeira possui a capacidade de autorrenovação ao longo da vida de um indivíduo e a outra possui habilidade limitada e pode dar esse suporte por no máximo seis semanas, pois originam as células progenitoras multipotentes que, por sua vez, contribuem para formação de todas as células maduras da linhagem⁵⁶⁻⁵⁹.

Progenitores Linfóides podem se diferenciar em todos os tipos de linfócitos (linfócitos T e B) e nas células natural killer (NK). Da mesma forma, Progenitores Mielóides podem dar origem aos megacariócitos e eritrócitos^{60,61}.

Assim como acontece com a grande maioria, a CTH só pode ser identificada após isolamento e ensaios *in vitro*. Elas são identificadas mais por aspectos funcionais do que morfológicos. Algumas características são consenso geral como, por exemplo, sua heterogeneidade com relação a tamanho, densidade e perfil antigênico.

Em 1988, Weissman *et al.*⁶² voltaram a atenção a uma série de superfícies de membrana de células sanguíneas de rato que foram associados a probabilidade de que seriam CTH. Alguns anos depois o mesmo grupo fez uma comparação com as células humanas e o marcador CD34⁺ foi considerado o principal marcador hematopoiético. Aproximadamente, 1% a 3% das células mononucleares da medula óssea expressam esta proteína, cuja função parece

estar relacionada aos processos de localização/adesão das células-tronco e progenitores. Outro marcador hematopoiético é o CD133⁺, o qual está relacionado a células mais primitivas. Conforme as células começam a se diferenciar não é mais possível identificar esses marcadores⁶³.

1.3 Sangue do cordão umbilical

Existem diferentes fontes para obtenção de CTH, como exemplo: medula óssea, sangue periférico mobilizado, sangue placentário ou sangue do cordão umbilical (SCU).

Após o primeiro transplante em uma criança com Anemia de Fanconi em 1988, o SCU tem sido utilizado para tratamento de doenças hematológicas malignas e não malignas tanto em crianças como em adultos, em transplantes autólogos e alogênicos^{64,65,66}.

Há diversas vantagens ao compará-lo com as outras fontes de obtenção de CTH: (a) a coleta é indolor, rápida e fácil, diminuindo risco de infecção; (b) as células podem ser imersas em nitrogênio líquido até a utilização, tornando-as disponíveis para uso⁶⁷; (c) as células-tronco do SCU possuem maior taxa de proliferação e tolerância imunológica; quando são disponibilizadas para transplante alogênico, apresentam menor risco do enxerto versus hospedeiro, pois as células imunológicas ainda estão em um estágio primitivo⁶⁸; (d) baixo risco de transmissão de citomegalovirus (CMV)^{69,70}.

Atualmente, pode ser considerada fonte para tratamento de mais de 70 doenças, incluindo câncer e imunodeficiência. Além disso, tem o potencial de ser utilizada para tratar uma ampla variedade de indicações no futuro⁷¹.

Apesar das evidências que mostram a importância do SCU na medicina regenerativa, ainda há uma questão amplamente discutida, a dose celular. A maior limitação dessa fonte é a quantidade de células-tronco existentes em uma unidade coletada ao comparar com a medula óssea e com sangue periférico após mobilização. O tratamento com doses menores pode apresentar algumas intercorrências, tais como: demora da reconstituição da medula, podendo contribuir para a taxa de mortalidade do transplante e o risco de infecção. A dose celular recomendada para um transplante em adulto é de $2,5 \times 10^5/\text{kg}$ de células CD34^+ e $2,5 \times 10^7/\text{kg}$ de células nucleadas totais^{72,73,74}.

As possibilidades mais conhecidas e estudadas para solucionar esse problema e conseqüentemente diminuir o tempo para reconstituição da medula após o transplante são duas: alguns pesquisadores discutem sobre o transplante duplo, o qual utiliza duas unidades de sangue de cordão umbilical, de doadores distintos, previamente congeladas e armazenadas⁷⁵, e a expansão *ex vivo* antes do transplante⁷⁶. A segunda opção tem sido amplamente estudada nos últimos anos e evidências comprovam que a capacidade de migração⁷⁷, e as características biológicas e genéticas básicas têm sido preservadas após o transplante com células hematopoiéticas expandidas⁷⁸, mostrando a possibilidade de aplicação clínica. Não há padronização do método, então há uma vasta discussão sobre qual é a melhor forma de cultivar essas células. No entanto,

sabe-se que durante o período de cultura qualquer protocolo de expansão deve tentar simular o mais próximo possível a hematopoiese *in vivo*.

Alguns trabalhos tem discutido a importância das CTM, obtidas de diferentes fontes, como células de suporte para expansão das CTH do SCU, pois através do contato célula-célula liberam moléculas bioativas que contribuem para proliferação e *in vivo* diminuem o tempo para a recuperação de neutrófilos e plaquetas após transplante em adultos⁷⁹. Contudo, não há nenhum estudo que demonstre a expansão *ex vivo* das células hematopoiéticas do SCU em cocultura com CTM obtidas do endotélio vascular do cordão umbilical, nem mesmo análise comparativa do índice de proliferação de CTH entre cocultura com células mesenquimais provenientes do cordão umbilical e tecido adiposo. Também não há relato relacionado à análise da confluência da cocultura para expansão.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o resultado da proliferação celular das CTH do SCU em expansão *ex vivo* através do método de cocultura com células-tronco mesenquimais, comparando duas fontes distintas para obtenção dessas células: tecido adiposo obtido de lipoaspiração e tecido do cordão umbilical obtido a partir do endotélio vascular.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar o isolamento das células-tronco mesenquimais obtidas do endotélio vascular do cordão umbilical e avaliar as características de expansão;
- Analisar a proliferação do número de células nucleadas totais, população CD133⁺/CD34⁺ e unidades formadoras de colônias das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical após sete dias de expansão *ex vivo* em sistema de cocultura com:
 - o presença e ausência de citocinas recombinantes;
 - o células-tronco mesenquimais provenientes do endotélio vascular do cordão umbilical e do tecido adiposo;
 - o células-tronco mesenquimais confluentes e subconfluentes tanto do tecido adiposo como do tecido do cordão umbilical.

3. MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras e elegibilidade

3.1.1 Sangue e tecido do cordão umbilical

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Todos os doadores assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta das amostras. Os critérios de inclusão estabelecidos para este estudo foram: (a) gravidez de baixo risco, (b) mulheres com mais de 18 anos de idade, (c) idade gestacional acima de 32 semanas, (d) parto normal ou cesariana e (e) mulheres com sorologia negativa. Os principais critérios de exclusão considerados foram: sofrimento fetal grave e bolsa rota superior a 18 horas.

A coleta foi realizada após o nascimento do bebê e a expulsão da placenta. As unidades de SCU foram obtidas de 10 doadores diferentes e os tecidos do cordão umbilical utilizados no presente estudo foram obtidos de outros três doadores, ou seja, não os mesmos que doaram o SCU. Antes da coleta, o cordão foi limpo com clorexidina alcoólica 2% para garantir a esterilidade do procedimento. O cordão umbilical foi puncionado e o sangue transferido para uma bolsa específica para coleta do SCU (JP Indústria Farmacêutica SA). Após a coleta do sangue, o cordão foi cortado, desprendendo-o da placenta, e colocado em um recipiente com solução salina tamponada com fosfato (PBS)⁸⁰.

A distribuição das CTM isoladas do tecido do cordão umbilical para a realização dos experimentos do estudo encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Amostras utilizadas para o experimento de expansão das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical em sistema de cocultura. Combinação de cada amostra de célula-tronco mesenquimal utilizada para cada amostra de sangue de cordão umbilical – FMUSP LIM31 - 2014

Tecido do cordão umbilical (TCU)	Tecido Adiposo (TA)	Bolsas com sangue do cordão umbilical (SCU)
TCU#1	TA#1	SCU#1
		SCU#2
		SCU#3
		SCU#4
TCU#2	TA#2	SCU#5
		SCU#6
		SCU#7
TCU#3	TA#3	SCU#8
		SCU#9
		SCU#10

3.1.2 Tecido adiposo

As células-tronco derivadas do tecido adiposo (TA) utilizadas nesse trabalho foram obtidas do inventário de células do Laboratório de Genética e Hematologia Celular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. As células armazenadas foram isoladas do TA obtido da região do abdome através de lipoaspiração. A distribuição das CTM dessa fonte para realização dos

experimentos de expansão das CTH do SCU pelo sistema de cocultura do estudo encontram-se na Tabela 1.

Para os experimentos de expansão *ex vivo* das CTH do SCU as células foram descongeladas para realizar a curva de crescimento e avaliar o tempo de dobramento das células. Para esse ensaio foi plaqueado 1×10^4 células em placas de 12 poços. Durante cinco dias as células foram contadas em triplicata em câmara de Neubauer utilizando como corante celular azul de tripan (Figura 3).

Figura 3 – Proliferação das células-tronco mesenquimais. A) Curva de crescimento das células-tronco mesenquimais do TCU (vermelho) e do TA (verde). **B)** Tempo de dobramento das células-tronco mesenquimais ($p=0,2925$) do TCU(36,01 horas) e do TA (40,99).

3.2 Isolamento e congelamento das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical

Todas as bolsas com SCU foram processadas da mesma forma. Antes da redução de volume foi realizada a contagem de células nucleadas totais através de um contador hematológico. O isolamento das células foi realizado pela metodologia manual, a qual consiste em duas etapas: retirada de hemácia e de plasma.

A primeira centrifugação foi realizada com a bolsa invertida (1040 x g por 7 minutos). Com auxílio de uma seringa de 60 mL dois terços das hemácias foram retiradas. A bolsa foi homogeneizada e centrifugada novamente (1848 x g por 15 minutos), nessa etapa a bolsa não foi invertida. Com auxílio de um extrator, dois terços do plasma foi retirado com uma seringa de 60mL. Esse procedimento permitiu alta recuperação de células nucleadas totais^{81,82}.

O concentrado de células nucleadas (buffy coat), foi transferido para uma bolsa criogênica com dois compartimentos, a qual possui volume máximo de 30mL. A bolsa foi resfriada e posteriormente foi adicionada lentamente uma solução crioprotetora composta por 10% de dimetilsulfóxido e dextrano v/v. O congelamento foi realizado por um congelador com controle do decaimento de temperatura. No final do processo, as células foram armazenadas em ultra freezers com temperatura constante de -86 ° C^{83,84,85}.

3.3 Isolamento das células-tronco do tecido do cordão umbilical

As CTM foram isolados a partir do endotélio vascular do cordão umbilical através de uma adaptação do protocolo de Covas *et al.*⁸⁶. Foi introduzida uma cânula na veia umbilical; realizada lavagem com PBS; a veia foi preenchida posteriormente com uma solução de colagenase a 0,1% e a extremidade distal foi clampeada. Após incubação a 37°C durante 30 minutos, a veia foi lavada duas vezes com PBS suplementado com 5% de SFB e as células do endotélio e camadas subendoteliais foram recolhidas. A suspensão de células foi centrifugada a 200xg durante 5 minutos e o sedimento ressuspendido em meio DMEM suplementado com 10% SFB e solução de antibiótico antimicótico (10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 ug de anfotericina B) a 2%.

As células foram contadas utilizando câmara de Neubauer e coradas com azul de tripan para, em seguida, serem transferidas para frascos de cultura de 25 cm² com concentração aproximada de 1×10^5 células/ mL e mantidas em incubadora com temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após três dias o meio foi trocado, as células não aderentes foram removidas e as células aderentes continuaram em meio de cultura até as CTM alcançarem aproximadamente 80% de confluência. As células aderentes foram descoladas do plástico por digestão enzimática com tripsina EDTA 0,25%, e transferidas para um frasco de cultura de 75 cm². As CTM foram cultivadas até a quarta passagem. Após contagem celular com azul de tripan em câmara de Neubauer, uma parte das células foi congelada (solução contendo 10% DMSO com 80% de SFB e 10% de DMEN), 1×10^5 células

foram ressuspensas em PBS para caracterização celular por imunofenotipagem e outra parte foi plaqueada em três recipientes de cultura distintos: o primeiro para os experimentos de expansão *ex vivo* das CTH do SCU; o segundo para diferenciação celular e o terceiro para curva de crescimento.

Para avaliar o tempo de dobramento, as células foram semeadas em uma densidade de 1×10^4 células em placas de 12 poços. Durante cinco dias as células foram contadas em triplicata com azul de tripan em câmara de Neubauer (Figura 3).

3.4 Caracterização das células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais

3.4.1 Ensaio clonogênico

Para cada amostra de sangue de cordão umbilical pós-descongelamento e após a expansão *ex vivo*, foi avaliado o potencial clonogênico com objetivo de evidenciar unidades formadoras de colônia de progenitores granulócito-macrófago, (CFU-GM - Figura 4A); eritrócito (BFU-E - Figura 4B) e colônia única multipotente de granulócito-macrófago-eritrócito-megacariócito (CFU-GEMM - Figura 4C). Os ensaios foram realizados em duplicata em meio de cultura semi-sólido com metilcelulose (Methocult - StemCell Technologies) suplementado com SFB, albumina de soro bovino, 2-βmercaptoetanol, fator de células estaminais, GM-CSF, G-CSF, IL-3 e eritropoietina, como descrito nas instruções do fabricante. As

células foram mantidas em um ambiente a 37 °C e com 5% de CO₂. Após 14 dias foi realizada a identificação e contagem total das colônias⁸⁷.

Figura 4 - Unidades formadoras de colônias da linhagem hematopoiética do sangue do cordão umbilical pós-descongelamento. A) CFU-GM. B) BFU-E. C) CFU-GEMM.

3.4.2 Imunofenotipagem das células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais

A imunofenotipagem é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas suspensas em meio líquido. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente. Geralmente é utilizada quando é preciso diferenciar células que têm o aspecto físico muito semelhante ao microscópio, mas que têm moléculas diferentes em sua membrana, atribuindo-lhes funções diferentes.

As análises por citometria de fluxo foram realizadas para determinar: (a) a viabilidade celular do SCU pós-descongelamento; (b) a expressão da população

de células CD133⁺/CD34⁺ pós-descongelamento e após o processo de expansão *ex vivo* e (c), para confirmar o fenótipo das CTM derivadas do TCU e TA.

As CTH foram marcadas com o kit Live/dead® (Invitrogen), allophicocianin (APC) conjugado a anti-CD45 (BD – Clone HI30), peridina Clorofila Protein Complex (PerCP) conjugado a anti-CD34 (BD – clone 563) e ficoeritrina (PE) conjugado a anti-CD133 (Macs – clone AC133) de acordo com as instruções do fabricante. Foram também utilizados isotipo de células CD34 + (IgG1, K), CD45 + (IgG1, K) e CD133 + (IgG2b).

Para fenotipagem das CTM, seguiu-se os critérios mínimos descritos em 2006 por Dominici *et al.*⁶⁹ (Tabela 1). Após a quarta passagem, as CTM, tanto do TCU como do TA, foram analisadas quanto à expressão de marcadores positivos para CD105, CD90, CD73 e negativos para CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR.

3.4.3 Capacidade de diferenciação mesodérmica das células-tronco mesenquimais

Os ensaios para analisar a diferenciação das CTM do TCU e TA foram realizados na quarta passagem. Seguindo as instruções do fabricante as células foram ressuspendidas em meio para diferenciação adipogênica (STEMPRO® Kit de diferenciação adipogênica, Gibco®), condrogênica (STEMPRO® Kit de diferenciação condrogênica, Gibco®) e osteogênica (STEMPRO® Kit de diferenciação osteogênica, Gibco®). Posteriormente as células foram transferidas

para uma placa de 12 poços com uma densidade de 1×10^4 células. Após duas semanas, a diferenciação adipogênica foi confirmada através da coloração por uma solução de Oil read O (Sigma) contendo 60% de isopropanol. A diferenciação em condrócitos foi confirmada após coloração por Alcian Blue (Sigma). Após quatro semanas as células foram coradas com uma solução aquosa a 2% de vermelho de alizarina S (Sigma) para evidenciar os depósitos de cálcio^{88,89,90}.

3.5 Expansão *ex vivo* das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical em sistema de co-cultura com células-tronco mesenquimais

A expansão *ex vivo* das CTH foi realizada com unidades de SCU previamente criopreservadas. Os experimentos permitiram avaliar índice de proliferação de células nucleadas totais, população CD133⁺/CD34⁺ e unidades formadoras de colônias (CFU-GM, BFU-E e CFU-GEMM) após sete dias em cocultura com CTM de tecido de cordão umbilical e TA confluentes, 90% confluência, (Figura 5 – B e D) e subconfluentes, 30% confluência, (Figura 5 – A e C) com e sem adição de coquetel de citocinas.

Figura 5 – Análise morfológica das células-tronco mesenquimais (10x aumento). **A)** Células-tronco mesenquimais do TA subconfluentes em quarta passagem. **B)** Células-tronco mesenquimais do TA confluentes em quarta passagem. **C)** Células-tronco do TCU subconfluentes em quarta passagem. **D)** Células-tronco mesenquimais do TCU confluentes em quarta passagem.

Os experimentos foram divididos em dois grupos e ambos avaliaram expansão em CTM confluentes e subconfluentes. A nomenclatura “Grupo I” estava relacionada à expansão na presença do coquetel de citocinas exógena e “Grupo II” à expansão sem adição do coquetel de citocinas (Figura 6).

Figura 6 - Ilustração do desenho do estudo.

Antes do descongelamento das unidades de sangue de cordão umbilical para início da expansão das CTH, foi necessário preparar as garrafas para cultura de CTM. Baseando-se no perfil da curva de crescimento, as CTM do TCU e do TA foram plaqueadas inicialmente em densidades diferentes (Tabela 3). Um dia antes da expansão em cocultura confluyente e subconfluyente as células mesenquimais foram tripsinizadas para realizar a contagem. As garrafas de CTM de TCU e TA subconfluentes apresentavam a mesma quantidade de células mesenquimais, assim como as garrafas confluentes.

Tabela 3 – Densidade de células-tronco mesenquimais de tecido do cordão umbilical e tecido adiposo plaqueadas inicialmente para apresentarem posteriormente mesma quantidade de células mesenquimais para cada sistema de cocultura

Fonte de células-tronco mesenquimais	Densidade celular cultura confluyente	Densidade celular cultura subconfluyente
Tecido do cordão umbilical	6×10^5	1×10^5
Tecido Adiposo	1×10^5	$3,5 \times 10^4$

Antes do início do experimento os meios para expansão das células hematopoiéticas foram preparados. O meio correspondente ao Grupo I foi preparado com StemSpan™ H3000 (StemCell Technologies) suplementado com 10% de SFB e com StemSpan CC100™ (coquetel de citocinas) 1x concentrado (StemCell Technologies), o qual contém ligante Flt-3, Fator de Células-Tronco (SCF), Interleucina-3 (IL-3) e Interleucina-6 (IL-6). Não foi fornecida pelo fabricante a concentração individual de cada citocina, porém a concentração final

de 1x foi utilizada conforme instrução do mesmo. O meio do Grupo II foi preparado com StemSpan™ H3000 (StemCell Technologies) suplementado apenas com 10% de SFB.

O SCU foi descongelado em banho-maria a 37°C, diluído em solução de RPMI suplementado com 2% de SFB e realizado dois ciclos de lavagem com RPMI suplementado com 2% de SFB para retirar o DMSO⁹¹⁻⁹⁵.

Posteriormente, foi realizada ultima lavagem com buffer de lise de hemácias (0,1 mM de EDTA, 0,12 mM de KHCO₃ e 155 mM de NH₄Cl). Após contagem do número de células nucleadas totais, foi utilizado 1x10⁵ células para análise da viabilidade celular por citometria de fluxo (kit live/dead® - Invitrogen) e quantificação da população de células CD133⁺/CD34⁺. A mesma concentração de células (1x10⁵) foi transferida para o meio Methocult™ (Stem Cell Technologies) para quantificação de unidades formadoras de colônias da linhagem hematopoiética. As células remanescentes foram homogeneizadas e o volume final foi dividido igualmente em dois tubos identificados como Grupo I e Grupo II, ambos centrifugados para retirar o sobrenadante e as células contidas em cada um foram ressuspensas no meio correspondente para expansão das CTH do SCU preparados previamente.

Após homogeneização, 5 mL da suspensão celular do tubo contendo meio do Grupo I foi transferido para uma garrafa de 25 cm² denominada “controle I”. O mesmo procedimento foi realizado para o tubo contendo a suspensão de células do Grupo II. Essa garrafa foi nomeada como “controle II”.

Foram retirados os meios das garrafas com CTM, tanto de TCU como de TA, em cultura confluyente e subconfluyente e lavado com PBS. Da suspensão de células em meio do Grupo I, 5mL foi adicionado em cada garrafa contendo CTM confluentes e subconfluentes. O mesmo foi realizado com a suspensão de células em meio do Grupo II.

Portanto, após descongelamento e lavagem de cada bolsa de sangue de cordão umbilical, para retirada do DMSO, as células nucleadas totais foram igualmente divididas em 10 garrafas de 25 cm². Duas para controle, as quais foram destinadas para expansão *ex vivo* apenas em meio líquido (StemSpan H3000 + 10% SFB) com e sem presença do coquetel de citocinas exógena. Nos Grupos I e Grupo II havia em cada, quatro garrafas de 25 cm² correspondentes à expansão *ex vivo* em sistema de cocultura confluyente e subconfluentes, tanto para tecido do cordão como para TA (Figura 6). A média da concentração celular inicial plaqueada antes do processo de expansão foi $1,347 \times 10^7$.

Após sete dias de cultura, sem troca de meio, o sobrenadante de cada garrafa foi recolhido e realizado contagem de células nucleadas totais com azul de tripan em câmara de Neubauer. A concentração de 1×10^5 células foi destinada para quantificação da população CD133⁺/CD34⁺. A mesma concentração de células foi adicionada em meio methocultTM (StemCell Technologies) para posterior identificação e quantificação de unidades formadoras de colônia da linhagem hematopoiética. Também foi realizada análise da população CD133⁺/CD34⁺ aderidas às CTM⁹⁶⁻¹⁰⁴.

4. RESULTADOS

4.1 Análises pré-expansão *ex vivo*

4.1.1 Imunofenotipagem de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais

As CTH do sangue de cordão umbilical (n=10) foram analisadas para determinar a viabilidade celular (Figura 7A), quantificação da população de células CD133⁺/CD34⁺ pós-descongelamento e após expansão *ex vivo*. Seguindo os critérios descritos por Dominici M *et al.*⁶⁹, além da análise morfológica, foi possível quantificar a expressão dos marcadores positivos e negativos das CTM obtidas do TCU e do TA. Ambos apresentaram positividade para os marcadores CD105, CD90, CD73 e baixa expressão de marcadores hematopoiéticos (Figura 8).

Figura 7 – Sangue do cordão umbilical pós-descongelamento. A) Viabilidade celular das amostras de SCU (n=10). **B)** Análise gráfica da viabilidade celular por citometria de fluxo (Kit Live/Dead®) da amostra SCU #9.

A viabilidade celular do SCU obtida pós-descongelamento foi superior a 80% (média 82,82%). A expressão de população $CD133^+/CD34^+$ pós-descongelamento foi heterogênea entre as amostras variando de 0,11% a 0,93%.

Figura 8 – Marcadores de células-tronco mesenquimais. Painel de marcadores positivos (CD 90, CD 105 e CD 73) e negativos (CD 34, CD 11b, CD 19 e HLA-DR) das células-tronco mesenquimais de TA e TCU.

4.1.2 Diferenciação mesodérmica das células-tronco mesenquimais

Na quarta passagem, as CTM provenientes de TCU (n=3) e TA (n=3) foram submetidas ao ensaio de diferenciação em condrócito, osteoblasto e adipócito (Figura 9 A, B e C). As duas fontes de células apresentaram diferenciação mesodérmica evidenciada por coloração.

Figura 9 – Diferenciação mesodérmica das células-tronco mesenquimais. A) Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais do tecido do cordão umbilical e tecido adiposo com coloração por Alcian Blue. **B)** Diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais do TCU e do TA com coloração por Vermelho de Alizarina S. **C)** Diferenciação adipogênica das células-tronco mesenquimais do TCU e do TA com coloração por Oil Red O.

4.2 Análises pós-expansão *ex vivo*

Após sete dias de cultura foi possível evidenciar por microscopia a população de células do Controle I (Figura 10 A), Controle II (Figura 10B), Grupo I da cocultura de TA confluyente e subconfluyente (Figura 10 C e D), Grupo II da cocultura de TA confluyente e subconfluyente (Figura 10 E e F), Grupo I de cocultura de TCU confluyente e subconfluyente (Figura 10 G e H) e Grupo II de cocultura de tecido do cordão confluyente e subconfluyente (Figura 10 I e J). Em sistema de cocultura, as CTH ficam em grande maioria, aderidas à monocamada de CTM.

Cada um dos grupos foi analisado individualmente em relação à proliferação de células nucleadas totais, população CD133⁺/CD34⁺ e unidades formadoras de colônias.

Figura 10 – Células-tronco hematopoiéticas após sete dias de expansão *ex vivo* em meio líquido e em sistema de cocultura com e sem adição de coquetel de citocinas exógenas. A) Controle I – expansão em meio líquido (StemSpan H3000 + 10% de SFB + CC100) com adição de coquetel de citocinas exógenas no meio de cultura. **B)** Controle II – expansão em meio líquido (StemSpan H3000 + 10% de SFB) SEM adição de coquetel de citocinas exógenas no meio de cultura. **C)** Grupo I – cocultura com CTM subconfluentes de TA. **D)** Grupo I – cocultura com CTM confluyente de TA. **E)** Grupo II – cocultura com CTM subconfluyente de TA. **F)** Grupo II – cocultura com CTM confluyente de TA. **G)** Grupo I – cocultura com CTM subconfluyente de TCU. **H)** Grupo I – cocultura com CTM confluyente de TCU. **I)** Grupo II – cocultura com CTM subconfluyente de TCU. **J)** Grupo II – cocultura com CTM confluyentes de TCU.

4.2.1 Índice de proliferação das células nucleadas totais

Após sete dias de expansão *ex vivo* das CTH do SCU, foi realizada contagem de células nucleadas totais para avaliar a taxa de proliferação celular. A média da concentração inicial de células plaqueadas antes do processo de expansão foi $1,347 \times 10^7$.

Os dados estatísticos obtidos foram resultados das análises realizadas individualmente de cada fonte de CTM em relação à confluência e suplemento de citocinas para promoção da expansão das células nucleadas totais do SCU. A expansão em meio líquido (Controle I e II) mostrou que a adição de citocinas promove maior proliferação das células nucleadas totais do SCU (Figura 11A e Figura 12A).

Na análise do Grupo I (Figura 11B) não há diferença no índice de proliferação das células nucleadas totais do SCU ao comparar a cocultura confluyente do tecido adiposo com tecido do cordão umbilical. O mesmo resultado foi encontrado no Grupo II (Figura 12 B). Todavia, a expansão dos Controles I e II, os quais proporcionaram a expansão apenas em meio líquido, sem presença de CTM, foi consideravelmente menor ($p < 0,0001$) em relação à expansão em cocultura.

Figura 11 – Índice de proliferação das células nucleadas totais após sete dias de expansão *ex vivo*. Análise do Grupo I. A) Comparação da expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em meio SEM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – t test. **B)** Comparação do índice de proliferação entre expansão em meio líquido com adição de citocinas ($p < 0,0001$) e expansão *ex vivo* no sistema de cocultura com CTM confluentes provenientes do TA e TCU – Bonferroni post-test. **C)** Análise entre expansão em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas de TCU e TA ($p = 0,0028$) e expansão em meio líquido com adição de citocinas (Controle I) – Bonferroni post-test. **D)** Análise do índice de proliferação em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes de TA ($p < 0,0001$) – t test. **E)** Análise do índice de proliferação entre expansão *ex vivo* e, sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes obtidas do TCU ($p = 0,0037$) – t test.

Figura 12 – Índice de proliferação das células nucleadas totais após sete dias de expansão *ex vivo*. Análise do Grupo II. A) Comparação da expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em meio SEM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – t test. **B)** Análise comparativa entre expansão em cocultura com CTM confluentes obtidas de TA e TCU e expansão em meio líquido SEM adição de citocinas exógenas ($p = 0,0011$) – Bonferroni post-test. **C)** Análise da proliferação entre expansão em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas de TA e TCU e expansão em meio líquido COM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – Bonferroni post-test. **D)** Análise do índice de proliferação em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes do TA ($p = 0,0260$) – t test. **E)** Análise do sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes obtidas do TCU ($p = 0,0869$) – t test.

Em relação à cocultura subconfluente do Grupo I (Figura 11 C) os resultados mostraram que as CTM do tecido adiposo ($p=0,0028$) promovem maior proliferação das células nucleadas totais em relação às do tecido do cordão. Ademais, a expansão em cocultura subconfluente do tecido adiposo ainda proporciona proliferação celular maior do que em expansão em meio líquido, Controle I ($p<0,0001$). Todavia, no Grupo II (Figura 12 C), não foi encontrada essa diferença no índice de proliferação entre tecido adiposo e tecido do cordão.

O Grupo I foi superior, multiplicação celular maior que 30 vezes, ($p=0,0028$) em relação ao Grupo II, multiplicação celular de até 18 vezes, em cocultura confluenta de tecido adiposo (Figura 11D vs Figura 12D). O mesmo foi evidenciado na cocultura confluenta de tecido de cordão umbilical, onde a proliferação do Grupo I foi mais expressiva (multiplicação celular maior que 25 vezes) do que no Grupo II (multiplicação celular até 12 vezes) (Figura 11E vs Figura 12E). No Grupo II a diferença entre as culturas confluentes e subconfluentes do tecido adiposo foi discreta (Figura 12 D), enquanto que no tecido do cordão umbilical não houve diferença.

4.2.2 Índice de proliferação da população CD133⁺/CD34⁺

Após o descongelamento do SCU, foi realizada quantificação das células CD133⁺/CD34⁺, onde foi encontrada a média de $4,11 \times 10^4$. Os resultados obtidos após sete dias de expansão *ex vivo* demonstram maior proliferação da população CD133⁺/CD34⁺ na presença de citocinas. (Figura 13 e Figura 14)

Figura 13 – Índice de proliferação da população CD133⁺/CD34⁺ após sete dias de expansão *ex vivo*. Análise do Grupo I. A) Comparação da proliferação na expansão em meio líquido COM e SEM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – t test. **B)** Comparação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas ($p < 0,0001$) e em sistema de cocultura com CTM confluentes provenientes de TA e TCU com Bonferroni post-test. **C)** Análise comparativa da expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas de TA ($p = 0,0027$) e TCU ($p < 0,05$) com Bonferroni post test. **D)** Análise da proliferação entre expansão *ex vivo* do SCU em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes de TA ($p = 0,0137$) – t test. **E)** Análise da proliferação entre expansão *ex vivo* em sistema de cocultura com células mesenquimais confluentes e subconfluentes obtidas do TCU ($p = 0,0016$) – t test.

Figura 14 – Índice de proliferação da população CD133⁺/CD34⁺ após sete dias de expansão *ex vivo*. Análise do Grupo II. A) Comparação da proliferação na expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em meio SEM citocinas ($p < 0,0001$) – t test. **B)** Comparação do índice de proliferação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas ($p < 0,0001$) e em cocultura com CTM confluentes provenientes do TA e TCU através do Bonferroni post-test. **C)** Análise comparativa da proliferação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas a partir de TA e TCU ($p < 0,0001$) através do Bonferroni post-test. **D)** Análise do índice de proliferação entre expansão em meio líquido com adição de citocinas e em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes de TA ($p = 0,8335$) utilizando o t test. **E)** Análise do índice de proliferação entre expansão *ex vivo* em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes obtidas a partir do TCU ($p = 0,5466$) com o t test.

Na expansão celular em meio líquido (Controle I e II), foi possível evidenciar que a adição de citocinas no meio de cultura proporcionou maior índice de proliferação (Figura 13 A e Figura 14 A).

Nos Grupos I e II, considerando ambas coculturas confluentes e subconfluentes (Figura 13 B e C; Figura 14 B e C) não houve diferença na expansão entre tecido adiposo e tecido do cordão.

Foi possível evidenciar que a adição de citocinas nas coculturas confluentes tanto de tecido adiposo quanto de tecido do cordão apresentou grande influência no aumento do índice de proliferação celular. A expansão do Controle I foi 3 vezes menor ao comparar com a expansão em cocultura (Figura 13 B). Resultado similar foi evidenciado na análise do Grupo II (Figura 14 B).

Em relação ao controle I a proliferação celular foi menos ao comparar com a cocultura subconfluente de tecido adiposo ($p = 0,0027$) e tecido do cordão umbilical ($p < 0,5$) do Grupo I (Figura 13 C). O mesmo resultado foi observado no Grupo II (Figura 14 C).

As células mesenquimais confluentes, tanto de tecido adiposo quanto de tecido do cordão umbilical, proporcionaram maior índice de proliferação das CTH do SCU (Figura 13 D e E). No entanto, no grupo II não houve diferença entre cocultura confluenta e subconfluente de ambas as fontes de CTM, tecido adiposo e tecido do cordão umbilical (Figura 14 D e E).

4.2.3 Índice de proliferação das células formadoras de colônias da linhagem hematopoiética

Nas células do SCU descongeladas, a quantidade de colônias hematopoiéticas geradas variou de acordo com cada amostra, porém a média obtida foi de 65,4 unidades formadoras de colônia totais. Os ensaios clonogênicos realizados nas células hematopoiéticas expandidas por sete dias demonstraram que a adição de citocinas no meio de cultura aumenta a capacidade das células em formarem colônias da linhagem hematopoiética (Figura 15, 16 e 17).

Figura 15 – Capacidade clonogênica das células do sangue do cordão umbilical após sete dias de expansão *ex vivo*. Análise do Grupo I. A) Comparação do índice de proliferação na expansão em meio líquido (StemSpan H3000 + 10% SFB) COM e SEM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – t test. **B)** Comparação do índice de proliferação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas e expansão *ex vivo* em cocultura com CTM confluentes provenientes de TCU e TA – Bonferroni post-test ($p < 0,0001$). **C)** Análise comparativa da proliferação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas e expansão em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas de TA e TCU ($p < 0,0001$) – Bonferroni post-test. **D)** Análise do índice de proliferação entre expansão em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes do TA ($p = 0,0049$) – t test. **E)** Análise do índice de proliferação entre expansão em cocultura com CTM confluentes e subconfluentes obtidas do TCU ($p = 0,0228$) – t test.

Figura 16 – Capacidade clonogênica das células do sangue do cordão umbilical após sete dias de expansão *ex vivo*. Análise do Grupo II. **A)** Comparação do índice de proliferação na expansão em meio líquido COM e SEM adição de citocinas ($p < 0,0001$) – t test **B)** Comparação do índice de proliferação entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas e expansão *ex vivo* em cocultura com CTM confluentes provenientes do TCU e TA ($p < 0,0001$) – Bonferroni post-test. **C)** Análise comparativa da proliferação das unidades formadoras de colônia entre expansão em meio líquido COM adição de citocinas e em sistema de cocultura com CTM subconfluentes obtidas de TA e TCU ($p < 0,0001$) – t test. **D)** Análise do índice de proliferação entre expansão em sistema de cocultura com CTM confluentes e subconfluentes provenientes de TA ($p < 0,0001$) – t test. **E)** Análise do índice de proliferação entre expansão em cocultura com CTM confluentes e subconfluentes obtidas do TCU ($p = 0,3012$) – t test.

Figura 17 – Unidades formadoras de colônias da linhagem hematopoiética de células expandidas. A) Análise do Controle I – presença de BFU-E e CFU-GEMM. **B)** Análise do Controle II – presença de BFU-E. **C)** Análise do Grupo I – TA confluyente: Presença de CFU-GM e CFU-GEMM. **D)** Análise do Grupo I – TA subconfluyente: Presença de CFU-GEMM. **E)** Análise do Grupo II – TA confluyente: Presença de BFU-E, CFU-GM e CFU-GEMM. **F)** Análise do Grupo II – TA subconfluyente: Presença de CFU-GM e CFU-GEMM. **G)** Análise do Grupo II – TCU confluyente: Presença de BFU-E e CFU-GM. **H)** Análise do Grupo I – TCU subconfluyente: Presença de CFU-GM e CFU-GEMM. **I)** Análise do Grupo II – TCU confluyente: Presença de BFU-E e CFU-GEMM. **J)** Análise do Grupo II – TCU subconfluyente: Presença de CFU-GEMM e BFU-E.

Assim como nas demais análises, o controle I apresentou maior capacidade clonogênica do que o controle II, mostrando novamente a influência positiva das citocinas na taxa de proliferação (Figura 15 A e Figura 16 A). Além disso, as citocinas proporcionaram gerar colônias de células mais indiferenciadas, CFU-GEMM, (Figura 17 A e B).

Nos grupos I e II, as CTM confluentes de tecido do cordão umbilical e tecido adiposo não apresentaram diferença entre si em relação ao índice de proliferação de unidades formadoras de colônias (Figura 15 B e Figura 16 B). Analisando também o grupo I e II, o índice de colônias foi aproximadamente duas vezes maior na expansão em cocultura com CTM subconfluentes do tecido adiposo (Figura 15 C e Figura 16 C). Nas mesmas figuras é possível evidenciar que o controle I apresentou proliferação das colônias muito menor em relação ao método de cocultura.

Comparando expansão em cocultura confluyente e subconfluyente de tecido adiposo a Figura 15 D ($p=0,0049$) e Figura 16 D ($p<0,0001$) demonstram maior proliferação de unidades formadoras de colônias em sistema de cocultura subconfluyente, tanto no grupo I como no grupo II. No grupo I, as Figuras 17 C e D demonstram maior número de colônias na cocultura subconfluyente (Figura 17 D), onde há maior incidência de CFU-GEMM em relação à cocultura confluyente (Figura 17 C). Já no grupo II (Figuras 17 E e F), apesar do maior número de colônias ser demonstrada também na cocultura subconfluyente, a colônia com maior incidência é a CFU-GM.

A mesma análise foi realizada nas coculturas confluentes e subconfluentes de tecido do cordão umbilical tanto no grupo I como no grupo II. Apenas no grupo I (Figura 15 E), é possível avaliar diferença da proliferação, onde a cocultura subconfluyente demonstrou proliferação superior ($p=0,0228$). No grupo II, não houve diferença na proliferação entre cocultua confluyente e subconfluyente do

tecido do cordão umbilical. Apesar da discreta diferença entre a Figura 17 G e H. O número de colônias é maior na cocultura subconfluente (Figura 17 H). Ambas apresentam maior presença de CFU-GM.

5. DISCUSSÃO

As CTH do SCU têm sido utilizadas com sucesso para o tratamento de doenças hematológicas malignas e não malignas. No entanto, algumas unidades de sangue de cordão umbilical podem ter uma baixa dose de células, o que tem limitado a sua utilização em transplantes de indivíduos adultos.

Sabe-se que alta concentração de células nucleadas totais contribui para aumento de neutrófilos e plaquetas e também reduz a falha do enxerto⁷⁴.

Algumas alternativas, como administração de duas unidades de sangue de cordão umbilical¹⁶ e expansão *ex vivo* das CTH, têm sido sugeridas para diminuir os problemas associados à baixa concentração celular¹⁰⁰.

No entanto, a administração de duas unidades de sangue de cordão umbilical podem oferecer alguns problemas para o paciente, a exemplo de aumento dos riscos imunológicos, pois podem desenvolver doença do enxerto contra o hospedeiro aguda ou crônica, além das dificuldades para encontrar duas unidades com HLA compatível⁷⁵.

Com base nesta constatação a expansão *ex vivo* das células do SCU tem sido considerada uma alternativa relevante para transplante de um indivíduo adulto. Há relatos de pacientes que tiveram sucesso no transplante após receberem CTH autólogas expandidas como única fonte para estimular a hematopoiese *in vivo*¹⁰⁵. Isto sugere que as propriedades de migração e à função da CTH são preservadas, após a expansão *ex vivo*.

Apesar de ser uma opção bastante atrativa para o tratamento dos pacientes que necessitam de um número maior de células, alguns requisitos devem ser conhecidos para se padronizar esse procedimento na rotina terapêutica: (a) promoção de autorrenovação e expansão das CTH com diferenciação mínima; (b) uma quantidade elevada de células deve ser obtida a partir de uma pequena população inicial; (C) curto período de tempo para o enxerto após o transplante de células expandidas¹⁰⁶ (análise *in vivo*).

Não há uma padronização da técnica de expansão e, portanto, muitos grupos têm reportado os resultados em diferentes metodologias. Dahlberg *et al.*¹⁰⁷ descreveram expansão de 164 vezes de células CD34⁺ isoladas e redução no tempo de recuperação dos neutrófilos em comparação com transplante duplo de SCU. Reguladores da autorrenovação, proliferação e diferenciação das CTH, como a prostaglandina E2 (PEG2)¹⁰⁸, quelante de cobre tetraetilenopentamina (TEPA)¹⁰⁹ e ligante Notch¹¹⁰ têm sido utilizados atualmente em testes clínicos para o tratamento de neoplasias hematológicas.

A maioria das metodologias para expansão das CTH requer isolamento prévio de células CD34⁺ ou CD133⁺, além da adição de fatores de crescimento (G-CSF) e citocinas como SCF e trombopoitina (TPO) no meio de cultura^{111,112,113}. Alguns estudos demonstraram que a adição desses fatores foi determinante para aumento das células nucleadas totais (até 56 vezes) e das células CD34⁺ (até quatro vezes)¹⁴.

Robinson *et al.*¹¹⁵ em 2006, descreveram a expansão *ex vivo* das CTH do SCU com e sem seleção de células CD133⁺ em um sistema de cocultura, utilizando CTM derivadas da medula óssea alogênica como suporte para proliferação celular. A densidade de células nucleadas totais plaqueadas antes da expansão foi 2×10^7 células. Após 14 dias de expansão foi obtido aumento de 40 vezes na metodologia com seleção de CD133⁺. Um resultado parecido foi observado ao realizar a expansão sem prévia seleção de células CD133⁺, demonstrando que não é necessário isolar previamente células positivas para marcadores hematopoiéticos. A partir desse estudo, vários ensaios clínicos foram estabelecidos usando a metodologia de cocultura¹¹⁶⁻¹²².

A hematopoiese depende da cooperação entre progenitores e diversos outros tipos de células com funções e fenótipos diferentes, que juntos formam o estroma da medula óssea. Portanto, esse microambiente possui um papel importante na proliferação, diferenciação e migração das CTH. As células mesenquimais oferecem um arcabouço adequado e uma rede complexa de citocinas, moléculas de adesão e proteínas da matriz extracelular¹²³. Por essa razão, as CTM também têm sido utilizadas *in vitro*, como células de suporte para expansão das CTH⁷⁹.

Todavia, o mecanismo por trás da interação desses dois tipos celulares durante a expansão *ex vivo* das CTH não é totalmente conhecido. Chiu *et al.*¹²⁴ demonstraram transferência citosólica entre célula-tronco mesenquimal e célula-tronco hematopoiética do SCU e a troca de alguns fatores contribuiu para manter a viabilidade do SCU durante a cultura. Portanto, o contato célula-célula tem um

papel importante para manter a viabilidade e proliferação das células durante o período de cultura. Os resultados demonstrados nesse estudo corroboram com os achados da literatura e por isso acredita-se que esta é a razão pela qual as coculturas confluentes apresentaram melhor resultado.

Em 2010, Alvarado *et al.*¹²⁵ demonstraram que as citocinas têm um efeito direto sobre o ciclo celular por afetar os níveis de expressão de reguladores do ciclo. Neste estudo foi evidenciado que na ausência de citocinas, os níveis de p16 e p21 foram aumentados em células CD34⁺ expandidas, e sugeriram que estes reguladores do ciclo estão diretamente envolvidos no controle da proliferação de células progenitoras hematopoiéticas. Também foi demonstrado que células CD34⁺ derivadas do SCU possuem proliferação significativa após 14 dias de expansão em cultura com citocinas e a expansão máxima foi obtida com sete dias de cultura.

Jang *et al.*¹²⁶ em 2006 também mostraram que a capacidade de proliferação das CTH em cocultura com CTM obtidos a partir do SCU foi maior com adição de citocinas.

Corroborando com os dados da literatura, no presente estudo, o maior índice de proliferação das células nucleadas totais, da população CD133⁺/CD34⁺ e CFU ocorreu na metodologia de expansão com presença de citocinas. Comparando com os resultados de Robinson *et al.*¹¹⁵, esse estudo demonstrou resultado similar: aumento de mais de 30 vezes de células nucleadas totais, mais de seis vezes da população CD133⁺/CD34⁺ e CFU, considerando sete dias de

cultura com presença do coquetel de citocinas (Flt3 ligante, SCF, IL-3 e IL-6) e pequena quantidade de célula inicial total (aproximadamente $1,3 \times 10^7$ células) plaqueada.

Diversas combinações de citocinas têm sido utilizadas para avaliar a viabilidade celular, funcionalidade e proliferação das CTH do SCU durante a expansão *ex vivo*. As citocinas comumente utilizadas são SCF (Fator de células-tronco), Flt3, Interleucinas (IL) – 3, IL-6, G-CSF (fator estimulante de granulócitos) e TPO (trombopoitina). A interação dessas citocinas é necessária para regular positivamente a cinética das células-tronco¹²⁷. Todavia, a exata relação entre a combinação de cada citocina (incluindo o tipo de citocina e a dose) para promover a expansão continua absolutamente desconhecida. Todavia, é conhecido o mecanismo de sinalização celular. De um modo geral, as citocinas se ligam a receptores tirosina-cinase específicos que por sua vez promovem uma cascata de sinalização conduzida, principalmente, pela via Jak-Stat, a qual é considerada uma via direta ao núcleo, permitindo a transcrição gênica.

O SCF tem a capacidade de sustentar a proliferação das CTH. Com associação de outras citocinas, previne a apoptose das células CD34⁺^{128,129}. Através da ligação com o receptor c-kit, SCF provoca a dimerização e autofosforilação do receptor, que posteriormente leva à ativação de várias cascatas de sinalização, incluindo RAS/ERK, PI3-quinase, Src quinase e JAK/STAT¹³⁰. O estudo de Du Z *et al.*¹³¹ demonstrou que 50 ng/mL de SCF é a dose ideal para expansão *ex vivo* das CTH do SCU e promove alta obtenção de células CD34⁺.

O Flt3 possui pouca influência na hematopoiese quando avaliado isoladamente. Porém, quando associado com outras citocinas como SCF, IL-3 e G-CSF, promove maior efeito. Há evidências que demonstram que o Flt3 tem ação específica nas células progenitoras mieloide¹³².

A IL-6 também não contribui para a proliferação das CTH quando avaliada isoladamente. Acredita-se que essa interleucina age como cofator na expansão das células CD34⁺ *in vitro*¹³³. Já a IL-3 tem especificidade mais abrangente em relação a qualquer outra citocina e fatores de crescimento hematopoiético. Tem ação em células hematopoiéticas mais primitivas, estimulando a autorrenovação¹³⁴.

O coquetel de citocinas StemSpanTM CC100 (StemCell Technologies) utilizado nesse estudo corrobora com as já demonstradas em literatura. Este coquetel contém citocinas recombinantes (Flt3-ligante, SCF, IL-3 e IL-6) formuladas para dar suporte a proliferação tanto de progenitores hematopoiéticos mais primitivos quanto mais diferenciados. Esta combinação de citocinas também foi utilizada por Vanheusden *et al.*¹³⁵ para conseguir uma rápida resposta na proliferação de células progenitoras hematopoiéticas, incluindo as células CD34⁺, células formadoras de colônias e células hematopoiéticas mais maduras durante os períodos de cultura de um a duas semanas.

Os dados aqui apresentados reforçam alguns conceitos amplamente discutidos na literatura e também demonstram que outras fontes de células-tronco mesenquimais podem ser consideradas para realizar a expansão *ex vivo* do

sangue do cordão umbilical. A técnica utilizada para o isolamento das células obtidas do endotélio vascular do cordão umbilical foi padronizada e se enquadram nos critérios mínimos para caracterizar as CTM⁴⁵. (Figura 5 – C e D, Figura 8 e Figura 9). Além disso, foi possível demonstrar que as CTM obtidas do tecido adiposo e do endotélio vascular do cordão umbilical dão suporte a proliferação das CTH do SCU *in vitro*.

Analisando os resultados, é possível notar que há uma tendência das células obtidas do tecido adiposo promoverem maior proliferação das células hematopoiéticas. Porém, essa percepção pode estar relacionada com a característica de crescimento das CTM. O tecido do cordão umbilical possui uma fase *lag* de crescimento maior, então, devido à expansão *ex vivo* ter sido analisada apenas pelo período de sete dias, essa fonte de CTM pode não ter demonstrado todo o potencial e influência na proliferação das CTH.

Em contrapartida, ao analisar isoladamente a população CD133⁺/CD34⁺ nas coculturas sem adição de citocinas, observou-se que não houve interferência da confluência das CTM em relação ao índice de proliferação celular. Acredita-se que há aumento da liberação de citocinas pelas CTM subconfluentes, pois está com alta capacidade de autoproiferação. Com isso, contribuiu para aumento no índice de proliferação da população CD133⁺/CD34⁺ subconfluente. Contudo, dependendo da fonte de obtenção, as CTM podem apresentar diferença em relação aos tipos e quantidades de citocinas liberadas. Portanto, é importante fazer um estudo que demonstre as citocinas liberadas por essas duas fontes de

CTM e consequentemente avaliar o mecanismo para modulação da proliferação das CTH do sangue do cordão umbilical em sistema de cocultura.

Em relação à capacidade clonogênica das células expandidas, os resultados demonstraram que em sistema de cocultura subconfluente, com adição ou não de citocinas recombinantes, há maior índice de unidades formadoras de colônias totais. Esses experimentos foram realizados com as células do sobrenadante da cocultura. Portanto, as culturas confluentes possuíam maior quantidade de células hematopoiéticas aderidas as mesenquimais e com isso, na análise da capacidade clonogênica as células subconfluentes promoveram maior proliferação. Esse achado corrobora com o estudo de Jang D *et al.*¹²⁶ o qual, propõe que as células hematopoiéticas mais primitivas ficam em estado quiescente na camada inferior das CTM durante a expansão em sistema de cocultura. Também foi possível observar que nas coculturas subconfluentes com presença de citocinas, houve maior incidência de colônias CFU-GEMM, demonstrando alto índice de células primitivas. (Figura 17-D e H). O ensaio clonogênico da cocultura com células-tronco mesenquimais do tecido adiposo com presença de citocinas apresentaram uma diversidade de unidades formadoras de colônias muito maior, ao comparar com a cocultura das do tecido do cordão (Figura 17 C e D vs. G e H). Esse resultado também pode estar associado com a diferença de citocinas liberadas pelas células-tronco mesenquimais de cada uma das fontes. Apesar do ensaio para evidenciar a formação de colônias conter os mesmos suplementos, as células-tronco hematopoiéticas recolhidas após sete dias de expansão, poderiam já estar em estágios de diferenciação diferentes.

Considerando todos os resultados, esse estudo demonstra potencial translacional, ou seja, aplicação *in vivo*. Também contribuiu para identificar alguns critérios técnicos importantes para proporcionar maior taxa de proliferação das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical em expansão *ex vivo*, utilizando a metodologia de cocultura com células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo e endotélio vascular do cordão umbilical. Para tal, deve-se levar em consideração: seleção e padronização do coquetel de citocinas a ser utilizado e confluência das células mesenquimais (superior a 80%).

A expansão *ex vivo* foi realizada com unidades de sangue de cordão umbilical com baixa concentração de células antes do congelamento (máximo de 500 milhões de células). Portanto, acredita-se que mesmo com baixa dosagem de células nucleadas totais e baixo percentual de população CD133⁺/CD34⁺ é possível reconsiderar esses fatores como “desvantagem do sangue do cordão umbilical”. O sangue do cordão umbilical é uma fonte de célula importante e deve ser mais explorada para evolução da ciência e benefício dos futuros pacientes.

6. CONCLUSÃO

- Foi possível padronizar o isolamento das CTM obtidas do endotélio vascular do cordão umbilical. Essas células atenderam os critérios mínimos definidos por Dominicci M *et al.*⁴⁵;
- Tanto as células-tronco mesenquimais obtidas do tecido adiposo como as do endotélio vascular do cordão umbilical são efetivas para promover expansão *ex vivo* das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical. Não houve diferença entre as duas fontes;
- Para promover maior índice de proliferação das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical em expansão por sete dias no sistema de cocultura é necessário que as células mesenquimais estejam com confluência superior a 80% e adicionar ao meio de cultura citocinas recombinantes exógenas.

7. REFERÊNCIAS

1. Zago MA. Célula tronco a nova fronteira da medicina. São Paulo: *Atheneu*; 2006.
2. Jose M. Moraleda, Miguel Blanquer, Patricia Bleda, Paqui Iniesta, Francisco Ruiz, Sonia Bonilla, Carmen Cabanes, Lucía Tabares, Salvador Martinez. *Adult stem cell therapy: Dream or reality? Transplant Immunology*. 2006; 17: 74–77.
3. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;241:58–62.
4. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 1998; 282(6): 1145-7.
5. Becker PS. Introduction to stem cells. *American Society of Clinical Oncology Ed book*. 2003; 673-9.
6. Gepstein L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res*. 2002; 91: 866-76.
7. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
8. Boyd AS. Editorial: unlocking the potential of stem cells in cell therapy, drug delivery and drug discovery. *Curr Drug Deliv*. 2014;11(5):551.
9. Romanyuk N, Amemori T, Turnovcova K, Prochazka P, Onteniente B, Sykova E, Jendelova P. Beneficial effect of

- human induced pluripotent stem cell-derived neural precursors in spinal cord injury repair. *Cell Transplant*. 2014
10. Morales EE, Wingert RA. Renal stem cell reprogramming: Prospects in regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2014 Sep 26;6(4):458-66
11. Prentice, DA. Adult Stem Cells. *Issues Law Med*. 2004; 19 (3): 265-94
12. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a Subpopulation of Rapidly Self-Renewing and Multipotential Adult Stem Cells in Colonies of Human Marrow Stromal Cells. *PNAS*. 2001;98(14):7841–45.
13. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987;20(3):263-72.
14. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641-50.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
16. Manuguerra-Gagne R, Boulos PR, Ammar A *et al*. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes tissue regeneration in a glaucoma model through laser-induced paracrine factor secretion and progenitor cell recruitment. *Stem Cells*. 2013;31:1136–1148.
17. Eirin A, Zhu XY, Krier JD *et al*. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis. *Stem Cells* 2012;30:1030–1041.

-
18. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88:792–806.
 19. Alhadlaq A, Mao JJ. *Mesenchymal stem cells*: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev*. 2004;13:436-48.
 20. Le Blanc K, Pittenger M. *Mesenchymal stem cells*: progress toward promise. *Cytotherapy* 2005;7:36-45.
 21. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. *Mesenchymal stem cells*: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;174:249-82.
 22. Jyoti A, Kode SM, Mugdha VJ, Anandwardhan AH. *Mesenchymal stem cells*: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*. 2009;11:377-91.
 23. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174:101-9.
 24. Locke M, Windsor J, Dunbar PR: Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*. 2009;79:235-44.
 25. Rigotti G, Marchi A, Andrea Sbarbati A. *Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*: Past, Present, and Future. *Aesthet Plast Surg*. 2009;33:271-3.

-
26. Lee RH, Kim BC, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh KT. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14:311-24.
 27. Inoue TN, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells*. 2014;6(2):195-202
 28. Lv F, Lu M, Cheung KM *et al*. Intrinsic properties of mesenchymal stem cells from human bone marrow, umbilical cord and umbilical cord blood comparing the different sources of MSC. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7:389–399.
 29. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25:1384–1392.
 30. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davis JE. *Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors*. *Stem Cells*. 2005;23:220-29.
 31. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy K, Weiss RJ, Vanderwerff I. Immune properties of human umbilical cord wharton's jelly-derived. *Stem Cell*. 2008;26:2865-74.
 32. Yildirim S, Boehmler AM, Kanz L, *et al*. Expansion of cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in coculture with autologous umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is superior to cytokine-supplemented liquid culture. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36:71-9.

-
33. Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003;36:1179-83.
 34. Romanov Y, Svintsiskaya VA, Smirnov VN. *Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord*. *Stem Cells*. 2003; 21:105-10.
 35. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. *Adipose derived stem cell: a better stem cell than BMSC*. *Cell Biochem Funct*. 2008;26:664-75.
 36. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28.
 37. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells*. 2010;28:788–98.
 38. Hamamoto H, Gorman JH, Ryan LP, Hinmon R, Martens TP, Schuster MD, Plappert T, Kiupel M, St John-Sutton MG, Itescu S, Gorman RC. *Allogeneic mesenchymal precursor cell therapy to limit remodeling after myocardial infarction: the effect of cell dosage*. *Ann Thorac Surg*. 2009;87:794-801.
 39. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyretiz RE, Brenner MK. *Plantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. *Nat Med*. 1999;5:309-13.

-
40. Jacobsohn DA. Novel therapeutics for the treatment of graftversus-host disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002;11:1271-80.
41. Dala J, Gandy K, Domen J. Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease. *Pediatr Res*. 2012;71:445-51.
42. Liu J, Han D, Wang Z, Xue M, Zhu L, Yan H, Zheng X, Guo Z, Wang H. Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2013;15:185-91.
43. Mabed M, Shahin M. Mesenchymal stem cell-based therapy for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012; 7:179-90.
44. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012;5:19.
45. Dominicci M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4): 315-17.
46. Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol*. 2008;20(4):207–12.
47. Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat. Immunol*. 2006;7:333-37.
48. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden

- DT. Osteoblastic cells regulate the hematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425:841-46.
49. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhost C, Morrison SJ. Slam Family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121:1109-21.
50. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain hematopoietic stem cells. *Nature*. 2012;481:457-62.
51. Ferrer SM, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma' Ayan Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and hematopoietic stem cells from a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466:829-34.
52. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-47.
53. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 2011;147:1146-58.
54. Matsumoto A, Nakayama KI. Review: Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(2):2335-44.

-
55. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1994;1(8):661–73.
56. Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Mansson R, Sigvardsson M, *et al.* Identification of Lin()Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*. 2005; 105(7):2717– 23.
57. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 1997;124(10):1929–39.
58. Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(25):14541–6.
59. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109–21.
60. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000; 404(6774):193–7.
61. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem cells and

- progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:759–806.
62. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988;241:58–62.
63. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89:2804–08
64. Gluckman E, Devergié A, Bourdeau-Esperou H, Thierry D, Traineau R, Auerbach A, Broxmeyer HA. Transplantation of umbilical cord blood in fanconi's anemia. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1990;32:423-25.
65. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR. Outcomes among 562 recipients of placenta-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med.* 1998;339:1565-77.
66. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med.* 2001;344:815-22.
67. Brunstein CG, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation and banking. *Annu. Rev. Med.* 2006; 57:403-17.
68. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GJ, Devergié A. Hematopoietic reconstitution in a patient with fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989;321:1174-78.

-
69. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moore EG, Walton PD, Alford CA. *Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. N Engl J Med.* 1982;306:.945-49.
70. Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F, Alford CA. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA.* 1986;256:1904-08.
71. Tse W, Bunting KD, Laughlin M J. New insights into cord blood stem cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* 2008;15:279-84.
72. Delaney C, Ratajczak MZ, Laughlin MJ. Strategies to enhance umbilical cord blood stem cell engraftment in adult patients. *Expert Rev Hematol.* 2010;3:273-83.
73. Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovation. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;48:35–43.
74. Paulin T. Importance of bone marrow cell dose in bone marrow transplantation. *Clin Transplant.* 1992;6:48-54.
75. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, Mcglave PB, Miller JS, Verfaillie CM, Wagner JE. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood.* 2005;105:1343–47
76. Hoffmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ. *Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. Bone Marrow Transplantation.* 2007;39:11–23.

-
77. Zhai QL, Qiu LG, Li Q, Meng HX, Han JL, Herzig RH. Short-term ex vivo expansion sustains the homing-related properties of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica*. 2004;89:265–73.
78. Tian H, Huang S, Gong F, Tian L, Chen Z. Karyotyping, immunophenotyping, and apoptosis analyses on human hematopoietic precursor cells derived from umbilical cord blood following long-term ex vivo expansion. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;157:33–36.
79. De Lima M, Robinson SN, Munsell M, Eapen M, Horowitz M, Alousi A, Saliba R, Mcmannis JD, Kaur I, Kebriaei P, Parmar S, Popat U, Hosing C, Champlin R, Bollard C, Molldrem JJ, Jones RB, Nieto Y, Andersson BS, Shah N, Oran B, Cooper LJ, Worth L, Qazilbash MH, Korblyng M, Rondon G, Ciurea S, Bosque D, Maewal I, Simmons PJ, Shpall EJ. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med*. 2012;367:2305–15.
80. Harris DT. Collection, processing and banking of umbilical cord blood stem cells for clinical use in transplantation and regenerative medicine. *Methods Mol Biol*. 2008;39:279–90.
81. Woods EJ, Pollok KE, Byers MA, Peery BC, Purttman J, Heimfeld S, Gao D. Cord blood stem cell cryopreservation. *Transfus med Hemother*. 2007;34:276–85.
82. Koliakos G, Alamdari D, Tsagias N, Kouzi-Koliakos K, Michaloudi E, Karagiannis V. A novel high-yield volume-reduction method for the cryopreservation of UC blood units. *Cytotherapy*. 2007;9(7):654–9.

-
83. Shu Z, Kang X, Chen H, Zhou X, Purttman J, Yadock D, Heimfeld S, Gao D. Development of a reliable low-cost controlled cooling rate instrument for the cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Cytotherapy*. 2010;12:161-69.
84. Woods EJ, Pollok KE, Byers MA, Peery BC, Purttman J, Heimfeld S, Gao D. Cord blood stem cell cryopreservation. *Transfus med Hemother*. 2007;34:276-85.
85. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberr PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol*. 2007;82:463-72.
86. Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2003;36:1179-83.
87. England SJ, McGrath KE, Frame JM, Palis J. Immature erythroblasts with extensive ex vivo self-renewal capacity emerge from the early mammalian fetus. *Blood*. 2011;117(9):2708-17.
88. Sabapathy V, Ravi S, Srivastava V, Srivastava A, Kumar S. Long-Term Cultured Human Term Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells of Maternal Origin Displays Plasticity. *Stem Cells Int*. 2012: 1–11.
89. Hass R, kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human Mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011; 14:9-12.

-
90. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti, DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284,(5411):143-47.
91. Michael AC, Kastrup J, Hrubisko M. Historical perspectives and the future of adverse reactions associated with haemopoietic stem cells cryopreserved with dimethyl sulfoxide. *Cell and Tissue Banking*. 2012;13(2): 203-15.
92. Berz D, McCormack ME, Winer SE, Colvin AG, Quesenberry JP. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells. *Am J Hematol*. 2007;82(6): 463–72.
93. Foïs E, Desmartin M, Benhamida S, Xavier F, Vanneaux V, Rea D, et al. Recovery, viability and clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous peripheral blood stem cell transplantations. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40:831–35.
94. Syme R, Bewick M, Stewart D, Porter K, Chadderton T, Glück S. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004;10:135–41.
95. Calmels B, Houzé P, Hengesse JC, Ducrot T, Malenfant C, Chabannon C. Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device: Cytomate™, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing. *Bone Marrow Transplant*. 2003;31:823–28.

-
96. McNiece I, Harrington J, Turney J, Kellner J, Shpall EJ. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2004; 6(4): 311-17.
97. Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplantation*. 2007; 39: 11–23.
98. Andrade-Zaldívar H, Santos L, De León Rodríguez A. Expansion of human hematopoietic stem cells for transplantation: trends and perspectives. *Cytotechnology*. 2008; 56:151–60.
99. Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, Ehninger G, Corbeil D, Ordemann R. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells - modeling the niche compartments *in vitro*. *Haematologica*. 2010;95(4):542-50.
100. Robinson SN, Simmons PJ, Harold C, Lorine G, Yang H, De Lima M, Shpall EJ. Mesenchymal stem cells in ex vivo cord blood expansion. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(1):83-92.
101. Tung SS, Parmar S, Robinson SN, De Lima M, Shpall EJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood for transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(2):245-57.
102. Rodríguez-Pardo VM, Vernot JP. Mesenchymal stem cells promote a primitive phenotype cd34+c-kit+ in human cord blood-derived hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. *Cell Mol Biol Lett*. 2013;18(1):11-33.

-
103. Ann D, Colleen D, Irwin DB. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cell. *Blood*. 2013;117:6083-90.
 104. Mehrasa R, Vaziri H, Oodi A, Khorshidfar M, Nikogoftar M, Golpour M, Amirizadeh N. Mesenchymal Stem Cells as a Feeder Layer Can Prevent Apoptosis of Expanded Hematopoietic Stem Cells Derived from Cord Blood. *Int J Mol Cell Med*. 2014;3(1):1-10.
 105. Chute JP, Saini AA, Chute DJ, Wells MR, Clark WB, Harlan DM, et al. Ex vivo culture with human brain endothelial cells increases the SCID-repopulating capacity of adult human bone marrow. *Blood*. 2002;100:4433-39.
 106. Mcniece I. *Delivering cellular therapies: Lessons learned from ex vivo culture and clinical applications of hematopoietic cells*. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18:839-45.
 107. Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2011;117:6083-90.
 108. North TE, Goessling W, Walkley CR, Lengerke C, Kopani KR, Lord AM, Weber GJ, Bowman TV, Jang IH, Grosser T, Fitzgerald GA, Daley GQ, Orkin SH, Zon LI. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature*. 2007;447:1007-11.
 109. Zaker F, Nasiri N, Oodi A, Amirizadeh N. Evaluation of umbilical cord blood CD34+ hematopoietic stem cell expansion in co-culture with bone marrow mesenchymal stem cells in the presence of TEPA. *Hematology*. 2013 Jan;18:39-45.

-
110. Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, Bernstein ID. Notch- mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med.* 2010;16(2):232-6.
 111. Purdy MH, Hogan CJ, Hami L, McNiece I, Franklin W, Jones RB, et al. Large volume *ex vivo* expansion of CD34-positive hematopoietic progenitor cells for transplantation. *J Hematother* 1995;4:515–525.
 112. Briddell RA, Kern BP, Zilm KL, Stoney GB, McNiece IK. Purification of CD34+ cells is essential for optimal *ex vivo* expansion of umbilical cord blood cells. *J Hematother* 1997;6:145–150.
 113. McNiece IK, Stoney GB, Kern BP, Briddell RA. CD34+ cell selection from frozen cord blood products using the Isolex 300i and CliniMACS CD34 selection devices. *J Hematother* 1998;7:457–461.
 114. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, et al. Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:368–376.
 115. Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, Mcmannis JD, Karandish S, Kaur I, Fu P, Del Angel M, Messinger R, Flagge F, De Lima M, Decker W, Xing D, Champlin R, Shpall EJ. Superior *ex vivo* cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:359-66.

-
116. Mcniece I. *Delivering cellular therapies*: Lessons learned from ex vivo culture and clinical applications of hematopoietic cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18:839-45.
117. Li N, Feugier P, Serrurier B, Latger-Cannard V, Lesesve JF, Stoltz JF, Eljaafari A. Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. *Exp Hematol.* 2007; 35:507-15.
118. Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. *Umbilical cord mesenchymal stem cells*: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:1477-86.
119. Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2011;117:6083-90.
120. Robinson SN, Simmons PJ, Yang H, Alousi AM, Marcos De Lima J, Shpall EJ. Mesenchymal stem cells in ex vivo cord blood expansion. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24:83-92.
121. Zaker F, Nasiri N, Oodi A, Amirizadeh N. Evaluation of umbilical cord blood CD34+ hematopoietic stem cell expansion in co-culture with bone marrow mesenchymal stem cells in the presence of TEPA. *Hematology.* 2013 Jan;18:39-45.
122. Naser A, Arezoo O, Mahin N, Mohamad SS. Expression and promoter methylation changes of the P15^{INK4b} during ex vivo cord blood CD34+ cell expansion following co-culture with mesenchymal stromal cells. *Hematology.* 2013;18(5): 260-8.

-
123. Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* 2014;35(1):32-7.
124. Chu PPY, Bari S, Xiubo F, Gay FPH, Ang JML, Chiu GNC, Lim SK, Kwang WYK. Intercellular cytosolic transfer correlates with mesenchymal stromal cell rescue of umbilical cord blood cell viability during ex vivo expansion. *Cytotherap.* 2012;14:1064-79.
125. Alvarado MA, Chávez GA, Cébulo A, Arriaga L, Mayani H. In vitro cell cycle dynamics of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Hematology.* 2010;15:11–20.
126. Jang YK, Jung DH, Jung MH, *et al.* Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol.* 2006;85:212-25.
127. Heike T, Nakahata T. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1592(3):313-21.
128. Kiyoshi A, Takashi Y, Tadayuki S, Hiroko M, Hideyuki M, Masayuki O, Hiroyuki M, Takashi T, Shunichi K, Hotta T. Direct evidence for ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood.* 2006;107:3371–77.
129. Kent D, Copley M, Benz C, Dykstra B, Bowie M, Eaves C. Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/kit signaling pathway. *Clin Cancer Res.* 2008;14:1926–30.

-
130. Rönstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2535–48.
131. Du Z, Cai H, Ye Z, Tan WS. Optimization of SCF feeding regimen for ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem cells. *J Biotechnol.* 2012;164(2):211-9.
132. Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Ruggieri L, Li ZH, Lyman SD. Flt3 ligand stimulates/costimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp Hematol.* 1995;23(10):1121-9.
133. Bernad A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Gutierrez-Ramos JC. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity.* 1994;1(9):725-31.
134. Yonemura Y, Ku H, Hirayama F, Souza LM, Ogawa M. Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(9):4040-4.
135. Vanheusden K, Van Coppennolle S, De Smedt M, Plum J, Vandekerckhove B. In vitro expanded cells contributing to rapid severe combined immunodeficient repopulation activity are CD34+38-33+90+45RA-. *Stem Cells.* 2007;25(1):107-14.