UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização de células mesenquimais-*like* diferenciadas a partir de células-tronco
humanas de pluripotência induzida**

Péricles Natan Mendes da Costa

RIBEIRÃO PRETO

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização de células mesenquimais-*like* diferenciadas a partir de células-tronco
humanas de pluripotência induzida**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientado: Péricles Natan Mendes da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima
Haddad

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicada a Farmácia no dia 09/03/2017. A versão original encontra-se disponível
na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Péricles Natan Mendes da

Caracterização de células mesenquimais-*like* diferenciadas a partir de células-tronco humanas de pluripotência induzida. Ribeirão Preto, 2017.

85 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Haddad, Simone Kashima

1.iPSC. 2.MSC-*like*. 3. UC-MSC. 4.Caracterização. 5. Proliferação. 6.Imunomodulação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Péricles Natan Mendes da Costa

Título do trabalho: Caracterização de células mesenquimais-*like* diferenciadas a partir de células-tronco humanas de pluripotência induzida

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientado: Péricles Natan Mendes da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima
Haddad

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho:

A toda minha família, amigos e colegas. Carrego comigo uma profunda gratidão pelo apoio e aconchego neste período.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu Deus por ter vindo diversas vezes ao meu encontro, não importando qual fosse a minha necessidade. Senhor, sou a grato a Ti também pelo grande aprendizado, conquistas e pelas maravilhosas pessoas adicionadas a minha vida durante esta jornada.

Em segundo, sou grato a minha família. Meus pais, Daniel e Ester, e nosso querido cãozinho, Doug, obrigado pelo amor incondicional. É neste sentimento que me apoio a cada desafio e assim será até o fim dos meus dias. Meu amor, Leandro, agradeço pelo companheirismo, por ser o ouvinte dos meus desabafos e por ter muita paciência com meu choro e principalmente com meu mau humor.

Aos meus avós paternos e maternos, meus tios e tias, meus primos e primas, meu sogro, minha sogra, meu cunhado e cunhada, meu sobrinho e meus caros amigos, meu muito obrigado. Mesmo que não participando diretamente de todo este processo eu os agradeço simplesmente por permitirem que eu disfrutasse de parte dos seus momentos e vocês dos meus.

Como agradecimento a minha orientadora Dra Simone Kashima Haddad, cito aqui a estrofe de sua música favorita Trem Bala – Ana Vilela: "Não é sobre chegar no topo do mundo/ E saber que venceu/ É sobre escalar e sentir/ Que o caminho te fortaleceu/ É sobre ser abrigo/ E também ter morada em outros corações/ E assim ter amigos contigo/ Em todas as situações".

Simone, obrigado por dividir comigo seus valores e sua amizade. E claro, por ensinar a “mexer o doce” como ninguém.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biologia Molecular: Evandra, Aline Romagnoli, Fernanda, Alexander, Juliana, Rafaela, Lucas Catelli, Isabela, Tathiane, Mariana, Aline Ferreira, Suellen, Kátia, Maurício, Daiane, Slav, Marta e Yann, obrigado por compartilharem comigo parte do seu dia. Obrigado pelo aprendizado, companheirismo e conquistas, sejam de caráter profissional ou pessoal. Obrigado pelas risadas que tornam os dias mais leves e por todas as nossas “Confras da biomol”! Viver com vocês é, e sempre será, uma oportunidade única.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os meus colaboradores, a instituição “ Hemocentro de Ribeirão Preto” e todo o seu corpo profissional, a secretaria do programa de pós-graduação

em “Biociências Aplicadas à Farmácia” e as agências de fomento. Foi com o auxílio de vocês,
direto ou indireto, que este trabalho se construiu.

EPÍGRAFE

“Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu”

Eclesiastes 3, 1:8

RESUMO

Costa, P.N.M. **Caracterização de células mesenquimais-like diferenciadas a partir de células tronco humanas de pluripotência induzida**. 2017. 81f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) representam uma fonte de maior disponibilidade para obtenção de células estromais mesenquimais (MSC). Além disso, as células mesenquimais derivadas de iPSC, as MSC-like, demonstram *in vitro* uma atividade parácrina e uma taxa de proliferação que as apontam como uma candidata em potencial à terapia celular. Em paralelo, a terapia celular dispõe das propriedades terapêuticas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC), uma população celular de fácil isolamento, rendimento notável, alta capacidade de proliferação e ausência de tumorigenicidade. Assim, perante a relevância das iPSC como fonte alternativa para obtenção de MSC e do desempenho *in vitro* demonstrado pelas MSC-like, tornou-se necessário a comparação destas com as UC-MSC. Para tanto, iPSC reprogramadas a partir de células mononucleares do sangue periférico (iPS-PBMC) foram diferenciadas em MSC-like e estas por sua vez foram caracterizadas, segundo à aderência ao plástico, expressão de genes e proteínas de pluripotência, expressão de antígenos de superfície CD73, CD90, CD105, CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR; capacidade de diferenciação *in vitro* em adipócitos e osteócitos e posteriormente comparadas as UC-MSC frente a capacidade de proliferação e imunomodulação. As MSC-like obtidas mostraram-se aderentes ao plástico, não pluripotentes e com morfologia fibroblastoide. Demonstraram um perfil imunofenotípico negativo (menos de 2% de células positivas) para marcadores hematopoéticos e HLA-DR, mais de 90% para CD73 e CD90 e menos de 80% para CD105. Ademais, exibiram capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica. Quando comparadas às UC-MSC, em relação à capacidade de proliferação, as MSC-like apresentaram uma taxa de proliferação duas vezes menor. A comparação da capacidade imunomodulatória entre as duas linhagens demonstrou que as UC-MSC foram capazes de conter a proliferação de linfócitos T CD8⁺ mas não de linfócitos T CD4⁺. As MSC-like não foram capazes de conter a proliferação de ambas as populações de linfócitos. Os resultados indicam que o protocolo de indução utilizado foi capaz de gerar MSC-like com antígenos de superfície clássico em mesenquimais, baixa expressão de marcadores de pluripotência, hematopoéticos e HLA-DR e com habilidade de se diferenciar em linhagens mesodérmicas, porém, com menor capacidade de proliferação e ausência de propriedades imunomodulatórias. A funcionalidade das MSC-like geradas neste trabalho pode ser proveniente de fatores genéticos e epigenéticos do doador e pelas metodologias de reprogramação da célula somática à iPSC, bem como pela indução da iPSC à MSC. A investigação futura destes fatores pode contribuir para a obtenção de MSC-like funcionalmente semelhante às UC-MSC.

Palavras Chave: iPSC, MSC-like, UC-MSC, caracterização, proliferação, imunomodulação.

ABSTRACT

Costa, P.N.M. **Characterization of differentiated mesenchymal-like cells from induced pluripotent stem cell.** 2017. 81f. Master thesis. School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Induced pluripotent stem cells (iPSC) are an easily available mesenchymal stromal cell (MSC) source. Moreover, iPSC-derived mesenchymal cells (MSC-like) demonstrated an *in vitro* proliferation rate and paracrine activity that make them a potential candidate for cell therapy. Currently the cell therapy uses the therapeutic properties of umbilical cord-derived mesenchymal cells (UC-MSC), an effortlessly isolated cell population with remarkable yield, high proliferation capacity, and absence of tumorigenicity. Thus, considering the iPSC relevance as an alternative MSC source and their *in vitro* performance, it has become necessary to compare them with UC-MSC. The iPSC reprogrammed from peripheral blood mononuclear cells (iPS-PBMC) were differentiated in MSC-like and these cells were characterized according their adherence to plastic; pluripotency genes and proteins expression; surface antigens expression such CD73, CD90, CD105, CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR; *in vitro* differentiation capacity into adipocytes and osteocytes; and were compared with the UC-MSC proliferation and immunomodulation capacity. The obtained MSC-like were adherent to plastic, not pluripotent, and with fibroblastoid morphology. They demonstrated an immunophenotypic profile with less than 2% hematopoietic and HLA-DR positive cell markers, over 90% of CD73 and CD90, and less than 80% were CD105 positives. They also exhibited osteogenic and adipogenic differentiation capacity. When proliferation rate was compared between the two cell lineages, MSC-like showed a proliferation rate twice smaller than UC-MSC. The UC-MSC immunomodulatory activity contained the proliferation of T CD8⁺ lymphocytes but did not of T CD4⁺. MSC-like did not show immunomodulatory activity in the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺. These results allow the assumption that the applied induction protocol was able to generate MSC-like with the classic mesenchymal surface markers, low pluripotency, hematopoietic, and HLA-DR surface markers expression and with mesodermal lineage differentiation potential, however, with lower proliferation rate and absence of immunomodulatory properties. The MSC-like functionality could be influenced by donor genetic and epigenetic factors as well as by as well as the methodologies of reprogramming of somatic cells to the iPSC and the induction of iPSC to the mesenchymal phenotype. These influential factors should be investigated in deep detail in order to make the generated MSC-like functionally similar to UC-MSC.

Keywords: iPSC, MSC-like, UC-MSC, characterization, proliferation rate, immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia experimental	27
Figura 2. Indução ao fenótipo mesenquimal	36
Figura 3. Morfologia das linhagens iPS-PBMC, MSC-like e UC-MSC.....	38
Figura 4. Expressão do mRNA dos genes de pluripotência NANOG e OCT-3/4.....	39
Figura 5. Imunofenotipagem para Marcadores de pluripotência NANOG e OCT-3/4.....	40
Figura 6. Análise morfológica de MSC-like diferenciadas em adipócitos	42
Figura 7. Análise morfológica de UC-MSC diferenciadas em adipócitos.....	43
Figura 8. Análise morfológica de MSC-like diferenciadas em osteócitos.....	45
Figura 9. Análise morfológica de UC-MSC diferenciadas em osteócitos.	46
Figura 10. Ensaio de Tempo de Duplicação.....	48
Figura 11. Ensaio de Imunomodulação – Análise da proliferação de linfócitos T CD4 ⁺	50
Figura 12. Ensaio de Imunomodulação – Análise de proliferação de linfócitos T CD8 ⁺	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Moléculas secretadas pelas MSC na atividade parácrina	13
Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas	26
Tabela 3. Descrição dos genes analisados por RP-PCR em Tempo Real.	31
Tabela 4. Imunofenotipagem das linhagens MSC-like.....	41
Tabela 5. Tempo de duplicação das linhagens MSC-like e UC-MSC entre as passagens 5 e 8	47
Tabela 6. Porcentagem de linfócitos T CD4 ⁺ livres e co-cultivados com MSC.....	49
Tabela 7. Porcentagem de linfócitos T CD8 ⁺ livres e co-cultivados com MSC.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB: do inglês, actin beta

AT-MSC: do inglês, *adipose tissue mesenchymal stromal cell*

bFGF: do inglês *basic fibroblast growth factor*

BM-MSC: do inglês, *bone marrow mesenchymal stromal cell*

CFSE: do inglês, *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*

C_q: do inglês, *cycle of quantification*

DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro

ESC: do inglês, *embryonic stem cell*

ESC-MSC-like: células mesenquimal-like diferenciada de uma célula-tronco embrionária

GAPDH: do inglês, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GM-CSF: do inglês *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

GMP: do inglês, *good manufacturing practices*

H1-ESC: células-tronco embrionárias H1

H1-MSC-like: células mesenquimal-like diferenciada da célula-tronco embrionária H1

H9-ESC: células-tronco embrionárias H9

H9-MSC-like: células mesenquimal-like diferenciada da célula-tronco embrionária H9

HCFMRP-USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HGF: do inglês, *hepatocyte growth factor*

HLA-G: do inglês *human leukocyte antigen-G5*

HUGO: do inglês, *Human Genome Organization*

IDO: indoleamina 2,3-dioxigenase

IGF-I: do inglês *insulin-like growth fator I*

IL-6: Interleucina 6

INCTC: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular

iPSC: do inglês, *induced pluripotent stem cell*

iPS-PBMC: iPSC derivadas de células mononucleares do sangue periférico humano

ISCT: *International Society for Cellular Therapy*

LIF: do inglês *leukemia inhibitory factor*

MCP: do inglês *monocyte chemoattractant protein*

M-CSF: do inglês *macrophage colony-stimulating factor*

MHC: do inglês, *major histocompatibility complex*

MIP: do inglês *macrophage inflammatory protein*

MSC: do inglês, *multipotent mesenchymal stromal cell*

MSC-like: células mesenquimais-like

Nf: número final

Ni: número inicial

NIH: *National Institutes of Health*

NK: linfócito *natural killer*

P0: passagem 0

P1: passagem 1

P2: passagem 2

P3: passagem 3

P5: passagem 5

P8: passagem 8

PBMC: do inglês, *peripheral blood mononuclear cell*

PBS: solução tampão salina tamponada com fosfato

PGE-2: prostaglandina E2

PHA: pitoematoglutinina

SCF: do inglês *stem cell factor*

SDF-1: do inglês *stromal cell-derived factor 1*

SFB: soro fetal bovino

TGF- β : do inglês *transforming growth factor beta*

UC-MSC: do inglês, *umbilical cord mesenchymal stromal cell*

URE: unidade relativa de expressão

VEGF: do inglês, *vascular endothelial growth factor*

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Células-tronco: aspectos gerais.....	11
1.2 Células Estromais Mesenquimais Multipotentes (MSC): contexto histórico e propriedades terapêuticas.....	12
1.3 Fontes Anatômicas para isolamento de MSC	15
1.4 Células Mesenquimais-like diferenciadas a partir de células-tronco de pluripotência induzida.....	18
1.5 Justificativa	20
1.6 Hipótese	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Linhagens celulares	26
3.2 Aspectos Éticos.....	26
3.3 Estratégia Experimental.....	27
3.4 Cultura de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) e células-tronco embrionárias (ESC)	28
3.5 Cultura de MSC-like e UC-MSC.....	28
3.6 Indução ao fenótipo mesenquimal	28
3.7 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	29
3.7.1 Marcação Extracelular	29
3.7.2 Marcação Intracelular	29
3.8 Diferenciação em linhagens mesodérmicas in vitro: adipócitos e osteócitos.....	30
3.9 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real	30
3.10 Ensaio de estimativa do tempo de duplicação da população	31
3.11 Ensaio de Imunomodulação Linfoproliferativa	32
3.12 Análise Estatística.....	33
4. RESULTADOS	35
4.1 A indução de iPSC ao fenótipo mesenquimal gera uma população celular não pluripotente, aderente ao plástico e fibroblastóide.	35
4.2 As MSC-like são positivas para CD73, CD90, CD105 e negativas para marcadores hematopoéticos e HLA-DR	40
4.3 As MSC-like são capazes de se diferenciarem em adipócitos e osteócitos	41
4.4 As MSC-like demonstram capacidade de proliferação menor que as UC-MSC.....	46

4.5	As MSC-like não apresentam propriedades imunomoduladoras.....	48
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÃO	63
7	REFERÊNCIAS.....	65
8	APÊNDICES	72
	Apêndice 1. Imunofenotipagem – marcadores hematopoéticos.....	72
	Apêndice 2. Imunofenotipagem – marcadores CD73, CD90, CD105 e HLA-DR.	72
9	ANEXOS.....	75
9.1	Comitê de Ética.....	75

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco: aspectos gerais

Células-tronco são um segmento de população celular de aspecto não especializado que ao se dividirem podem originar células filhas idênticas a célula mãe (renovando sua população) e células diferenciadas, isto é, comprometidas a um novo tipo celular (SMITH, 2006).

Em relação à capacidade de diferenciação, as células-tronco podem ser classificadas em: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. As células-tronco totipotentes são capazes de originar um organismo por inteiro enquanto que as células-tronco pluripotentes podem se diferenciar em qualquer um dos diferentes tipos de linhagens que compõe um organismo, exceto os anexos embrionários. Por sua vez, as células-tronco multipotentes originam alguns tipos teciduais específicos e as células-tronco unipotentes estão restritas somente a um único tipo celular (GAGE, 2008; SMITH, 2006).

As células-tronco embrionárias (ESC, do inglês, *embryonic stem cell*) e as células-tronco de pluripotência induzida (iPSC, do inglês, *induced pluripotent stem cell*) são células pertencentes ao grupo de células-tronco pluripotentes. As ESC são isoladas de um embrião, mais especificamente da massa celular interna na fase de blastocisto, após o quarto ou quinto dia da fertilização. As iPSC são consideradas células-tronco pluripotentes artificiais obtidas por meio da reprogramação *in vitro* de células adultas somáticas em células indiferenciadas por meio da introdução de fatores de transcrição específicos (BONGSO *et al.*, 1994; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; PIKANÇO-CASTRO *et al.*, 2014).

Dentre as células-tronco multipotentes, tem-se como exemplo a célula estromal mesenquimal multipotente (MSC, do inglês, *multipotent mesenchymal stromal cell*). São células ubíquas, ou seja, estão presentes em diversos sítios anatômicos do corpo humano, abrangendo desde tecidos adultos até fetais (item 1.3). De acordo com a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) há três critérios básicos para a caracterização de uma MSC em condições de cultivo (DOMINICI *et al.*, 2006):

- I. Aderência ao plástico;
- II. Expressão de antígenos de superfície: mais de 95% da população devem expressar antígenos de membrana CD73, CD90 e CD105 e, adicionalmente, menos de 2% das células podem apresentar CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79 α , CD34, CD45 e antígeno leucocitário humano HLA-DR;

III. Capacidade de se diferenciar *in vitro* em adipócitos, condrócitos e osteócitos.

1.2 Células Estromais Mesenquimais Multipotentes (MSC): contexto histórico e propriedades terapêuticas

As MSC foram isoladas inicialmente da medula óssea como progenitores estromais de aspecto fibroblastoide, com capacidade de diferenciação osteogênica e de formação de colônias em culturas de monocamada quando plaqueadas em baixa densidade (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970). Segundo Friedenstein e cols. (1974), estes progenitores estromais eram também responsáveis pela manutenção do microambiente presente nos tecidos necessário para o desenvolvimento e a maturação de células hematopoéticas (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974). Em 1991, Arnold Caplan denominou estes progenitores estromais como células-tronco mesenquimais em razão da habilidade de originar outras linhagens teciduais (SABAPATHY; KUMAR, 2016). Contudo, ao levar em consideração que o processo de isolamento e expansão em cultura alteram as características de uma população celular, o termo “célula-tronco” não seria adequado pois nem todas as células expandidas *in vitro* apresentariam capacidade de autorrenovação e potencial de diferenciação. Desta forma, em 2006, a ISCT definiu que o termo “célula-tronco mesenquimal” faria menção a células *in vivo* (com capacidade de autorrenovação e multipotencialidade) e o termo “célula estromal mesenquimal multipotente” (MSC) seria referência à célula-tronco mesenquimal isolada e expandida *in vitro* (DOMINICI *et al.*, 2006; HOFFMANN *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, as MSC se mostraram eficientes em aplicações pré-clínicas e clínicas, devido a sua atividade parácrina e à capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas, podendo atuar como uma ferramenta na terapia celular (EL OMAR *et al.*, 2014; KOBOLAK *et al.*, 2016; MEIRELLES *et al.*, 2009; MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013; SABAPATHY; KUMAR, 2016). Define-se atividade parácrina como a influência sobre o comportamento de células adjacentes via secreção de fatores e nas MSC, a mesma pode ser observada por meio de efeitos anti-apoptóticos, angiogênicos e anti-fibróticos, estímulos à proliferação, quimioatração e imunomodulação (MEIRELLES *et al.*, 2009). Baseado em Meirelles e cols. (2009) a Tabela 1 elenca os efeitos parácrinos e as moléculas envolvidas.

Tabela 1. Efeitos parácrinos das MSC e as moléculas secretadas.

Efeito Parácrino	Moléculas
Anti-apoptótico	VEGF, HGF, IGF-I, estaniocalcina-I, TGF- β e GM-CSF
Angiogênico	bFGF, VEGF, PIGF, MCP-1, IL-6
Anti-fibrótico	bFGF, HGF e adrenomedulina
Estímulo à proliferação	SCF, LIF, IL-6, M-CSF, SDF-1, angiopoetina-1
Quimioatração	MCP1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP4 α , fractalcina e SDF-1
Imunomodulação	PGE-2, TGF- β , HGF,IDO, HLA-G5 e LIF

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; HGF: *Hepatocyte Growth Factor*; IGF-I: *Insulin-like growth factor I*; TGF- β : *Transforming Growth Factor Beta*; GM-CSF: *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*; bFGF: *basic Fibroblast Growth Factor*; SCF: *Stem Cell Factor*; LIF: *Leukemia Inhibitory Factor*; IL-6: *Interleucina 6*; M-CSF: *Macrophage Colony-Stimulating Factor*; SDF-1: *Stromal Cell-Derived Factor 1*; MCP: *Monocyte Chemoattractant Protein*; MIP: *Macrophage Inflammatory Protein*; PGE-2: *Prostaglandin E2*; IDO: *Indoleamina 2,3-Dioxigenase*; HLA-G5: *Human Leukocyte Antigen-G5*.

A capacidade de imunomodulação observada nas MSC é decorrente de sua interação com as células do sistema imunológico inato e adaptativo resultando em um papel regulatório sobre a proliferação e toxicidade destas células. Esta interação possibilita que a MSC adote um fenótipo anti- ou pró-inflamatório, e o evento principal desta interação é a liberação de fatores solúveis como indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), TGF- β (do inglês, *transforming growth factor beta*), HGF (do inglês, *hepatocyte growth factor*), antígeno humano leucocitário G (do inglês, *human leucocyte antigen*, HLA-G), fator inibitório de leucemia (LIF) e interleucina-10 (IL-10). Contudo, a forma como esse evento ocorre ainda não está clara do ponto de vista molecular e nem mesmo é conhecido se é necessário o contato célula-célula (BERNARDO; FIBBE, 2013; DORRONSORO *et al.*, 2013; KOBOLAK *et al.*, 2015; MEIRELLES *et al.*, 2009). Além da capacidade de modular a resposta imunológica, as MSC são consideradas “imunoprivilegiadas”. A ausência de expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *major histocompatibility complex*) de classe II permite que a MSC escape do reconhecimento por linfócitos T CD4⁺ e a expressão de MHC de classe I permite evasão das MSC da ação de linfócitos *natural killer* (NK). Adicionalmente, as MSC não expressam moléculas co-estimulatórias necessárias para indução de linfócitos T CD8⁺ ao perfil citotóxico (EL OMAR *et al.*, 2014; HASS *et al.*, 2011; RYAN *et al.*, 2005). Estas duas características criam perspectivas para a utilização destas células na terapia de diversas patologias, como doença do

enxerto contra o hospedeiro (DECH), esclerose múltipla, artrite reumatoide, lúpus, diabetes do tipo I, insuficiência renal aguda e colite ulcerativa (DORRONSORO *et al.*, 2013; KOBOLAK *et al.*, 2015).

Como exemplo de células-tronco multipotentes, as MSC podem diferenciar-se em vários tecidos mesodermais como osso, cartilagem e tendões. O potencial de diferenciação *in vitro* e *in vivo* das MSC proporciona novas abordagens para a engenharia de tecidos e terapia celular (SQUILLARO; PELUSO; GALDERISI, 2016). As MSC se mostram aptas ao tratamento de doenças de caráter músculo-esquelético, em especial osteoartrites e dor lombar causadas pela degeneração de discos intervertebrais. A capacidade de reparo e regeneração do tecido associada às MSC está interligada ao efeito parácrino e à habilidade de diferenciação destas células em diversos tipos celulares (COLLINS *et al.*, 2014). A hipótese seria que as MSC podem migrar para os locais de lesão devido à expressão de receptores para fatores de crescimento, matriz extracelular e quimiocinas em sua membrana. Uma vez que as MSC estão presentes no local da lesão, estas são capazes de se diferenciar na linhagem mesodérmica (osteócitos/condrócitos/tenócitos/miofibroblastos) necessária para reparar o dano tecidual ou liberar fatores que estimulam a regeneração do tecido (MEIRELLES *et al.*, 2009). A regeneração tecidual pode ser realizada de três maneiras: infusão de MSC diretamente no tecido lesionado, infusão de MSC diferenciadas em cartilagem sobre suporte e infusão de MSC diferenciadas sobre suporte seguida de tratamento com fatores de crescimento. O uso de suportes na engenharia de tecidos visa mimetizar o microambiente natural das MSC e, a escolha do biomaterial utilizado em sua composição influencia diretamente o comportamento celular (KOBOLAK *et al.*, 2015; RICHARDSON *et al.*, 2015).

De acordo com o *National Institutes of Health* (NIH) até 25 de janeiro de 2017, 687 ensaios clínicos nos quais MSC são utilizadas foram reportados. Estes ensaios são distribuídos em doenças hematológicas, DECH, diabetes, doenças inflamatórias, hepatopatias, doenças renais, pulmonares, cardiovasculares, ósseas, cartilaginosas, neurológicas e autoimunes. Contudo, a terapia celular na qual as MSC são utilizadas possui alguns pontos que podem ser melhor caracterizados e discutidos como a heterogeneidade entre os doadores; o isolamento, a expansão *ex vivo* e a criopreservação das MSC; aspectos que apresentam influências ainda desconhecidas sobre as propriedades terapêuticas destas células e, além disso, não se sabe se toda injúria tecidual ou doença imunológica pode ser tratada com terapia celular baseada em MSC. Segundo o site *ClinicalTrials.gov*, grande parte dos ensaios clínicos encontram-se em fases de estudo iniciais (I, I/II e II) indicando que ainda há necessidades de

estudos para consolidação das MSC como produto celular (SQUILLARO; PELUSO; GALDERISI, 2016).

1.3 Fontes Anatômicas para isolamento de MSC

As MSC podem ser isoladas de diversas fontes anatômicas do corpo humano como estroma da medula óssea (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974), frações do tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), polpa dentária (GRONTHOS *et al.*, 2000), fígado (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001), pulmão (IN 'T ANKER *et al.*, 2003a), pâncreas (HU *et al.*, 2003), músculos (ASAKURA; KOMAKI; RUDNICKI, 2001), veia safena (COVAS *et al.*, 2005) e vários tecidos fetais como sangue e estroma do cordão umbilical (COVAS *et al.*, 2003; ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000; WANG *et al.*, 2004), líquido amniótico e placenta (IN 'T ANKER *et al.*, 2003b, 2004). O isolamento a partir de tecidos sólidos é geralmente realizado por digestão enzimática enquanto que para tecidos fluidos é utilizada a técnica de centrifugação aliada à um gradiente de densidade (HOFFMANN *et al.*, 2016).

Como descrito no item 1.2, as MSC foram isoladas inicialmente da medula óssea, região situada na cavidade medular de ossos chatos, como pélvis, vértebras, esterno, escápulas, costelas, e nas extremidades epifisárias de ossos esponjosos, como úmero e fêmur (KOBOLAK *et al.*, 2016). Com relação à coleta, a medula óssea pode ser obtida por meio de aspiração, uma vez que se trata de um tecido fluido. As MSC derivadas da medula óssea (BM-MSC, do inglês, *bone marrow mesenchymal stromal cell*) é considerada a primeira população de MSC e a mais estudada em relação às características morfológicas, fenotípicas, propriedades funcionais e aplicações clínicas (HOFFMANN *et al.*, 2016; MATTAR; BIEBACK, 2015).

No entanto, a punção de medula é um procedimento invasivo e pode ocasionar hematomas e dores ao doador, além disso, o isolamento de MSC a partir da medula óssea apresenta baixa eficiência (EL OMAR *et al.*, 2014; VANGSNESS; STERNBERG; HARRIS, 2015). Diante destas adversidades, fontes anatômicas alternativas foram exploradas levando em consideração a minimização de entraves éticos, a obtenção de células que atendessem aos critérios de caracterização definidos pela ISCT e, por fim, a eficiência do processo de isolamento.

Dentre as fontes alternativas estudadas, os tecidos fetais, em especial o estroma do cordão umbilical (geleia de Wharton), mostrou-se uma fonte acessível de MSC com poucas

restrições éticas e de rentabilidade alta ($4,7 \times 10^6$ MSC/cm de cordão umbilical) (BONGSO; FONG, 2013; VANGSNESS; STERNBERG; HARRIS, 2015). Além disso, a MSC isolada do estroma do cordão umbilical (UC-MSC, do inglês, *umbilical cord mesenchymal stromal cell*) possui uma combinação única, apresentando propriedades de células-tronco embrionárias, como potencial de proliferação elevado e grande capacidade de expansão, e ainda são livres de tumorigenicidade, assim como as MSC isoladas de tecidos adultos (BONGSO; FONG, 2013; CHEN *et al.*, 2009; EL OMAR *et al.*, 2014; TROYER; WEISS, 2008).

O cordão umbilical é originado do zigoto e conecta o embrião em desenvolvimento à placenta. É composto de duas artérias e uma veia compactadas em um tecido conectivo estromal rico em proteoglicanos e mucopolissacarídeos denominado geleia de Wharton. Os vasos, as artérias e a matriz deste tecido fetal são conhecidos como reservatórios de células derivadas do mesênquima, como fibroblastos, miofibroblastos, células musculares lisas e MSC (ARUTYUNYAN *et al.*, 2016; KARAHUSEYINOGLU *et al.*, 2007; SYPECKA; SARNOWSKA, 2015; TERESA CONCONI, 2011; VILLA-DIAZ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2004). O isolamento de MSC do estroma do cordão umbilical se dá geralmente por digestão enzimática ou explantes do tecido (EL OMAR *et al.*, 2014), enquanto que as MSC oriundas do sangue de cordão umbilical são isoladas por meio de gradiente de densidade (ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000; RYU *et al.*, 2012). Inicialmente considerado como lixo hospitalar, o cordão umbilical mostrou-se como uma fonte de MSC em 1991, quando McElreavey e cols. isolaram células de aspecto fibroblastoide da geleia de Wharton (MCELREAVEY *et al.*, 1991). No entanto, somente em 2004, Wang e cols. provaram que estas células, na verdade, se tratavam de UC-MSC (ARUTYUNYAN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2004).

As UC-MSC são dotadas de alto potencial proliferativo quando comparada com MSC isoladas de tecidos adultos, como medula óssea e tecido adiposo (AT-MSC do inglês, *adipose tissue mesenchymal stromal cell*), e até mesmo em relação àquelas obtidas de outros tecidos fetais como placenta e membrana amniótica. O tempo de duplicação das UC-MSC relatado na literatura é de aproximadamente de 21 a 45 horas, sendo que esta variação é decorrente do perfil genético e epigenético dos doadores e do protocolo de isolamento (ARUTYUNYAN *et al.*, 2016; BADOWSKI; MUISE; HARRIS, 2014; HAN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2006; PALADINO *et al.*, 2016; SHAER *et al.*, 2014).

O potencial de proliferação elevado das UC-MSC se deve à alta atividade da enzima telomerase. Esta enzima tem como função o alongamento dos telômeros, sequências de DNA presentes na extremidade dos cromossomos, responsáveis pela manutenção da estabilidade

genômica das células. A cada divisão celular, em células adultas saudáveis, há o encurtamento natural dos telômeros que pode disparar mecanismos de senescência e apoptose. A alta atividade da telomerase por parte das UC-MSC resulta em comprimentos telomérico maiores ao longo de cada passagem permitindo maior capacidade de expansão e assim indo além do momento de senescência. Atribui-se a diferença na expressão de telomerase e por consequência o comprimento telomérico à maturidade do tecido do qual as MSC são isoladas, sendo então as UC-MSC superiores em relação às MSC isoladas de tecidos adultos (ARUTYUNYAN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2004; MARIÓN; BLASCO, 2010; MATHON; LLOYD, 2001; SERAKINCI; GRAAKJAER; KOLVRRA, 2008; TRIVANOVIĆ *et al.*, 2015).

A ausência de tumorigenicidade das UC-MSC foi relatada no trabalho realizado por Gauthaman e cols. (2012), no qual camundongos imunodeficientes inoculados com ESC desenvolveram teratomas (tumores benignos compostos por células dos três folhetos embrionários causados pela rápida proliferação e pela diferenciação espontânea de células-tronco pluripotentes) em seis semanas, enquanto que aqueles que receberam UC-MSC não os desenvolveram mesmo dentro de um período de 20 semanas. Segundo Fong e cols. (2011), apesar da UC-MSC apresentar expressão de marcadores de pluripotência (OCT3/4, SOX2, NANOG), dados de PCR quantitativo em tempo real e *microarray* indicam que esta expressão é menor na UC-MSC em relação às ESC e, de acordo com o autores, esta seria a explicação para a ausência de desenvolvimento dos teratomas (ARUTYUNYAN *et al.*, 2016; FONG *et al.*, 2011; GAUTHAMAN *et al.*, 2012).

No Hemocentro de Ribeirão Preto, as MSC foram isoladas do cordão umbilical pela primeira vez em 2003 por Covas e cols. (COVAS *et al.*, 2003). A presença de MSC no sangue de cordão umbilical era um tópico controverso até aquele momento e o objetivo do estudo foi averiguar a presença de MSC no endotélio vascular do cordão umbilical. A população obtida apresentava uma morfologia fibroblastoide com mais de 40% de positivos para CD29, CD13, CD44, CD49e, CD54 e CD90 e menos de 8% positivos para marcadores hematopoéticos CD14, CD45, CD49d, CD51, CD61 e CD106, sendo este perfil comum em populações de MSC em passagens iniciais e com “contaminações” de células hematopoéticas. Esta população demonstrou também a capacidade de se diferenciar em adipócitos e osteócitos. No entanto, o uso das UC-MSC na Terapia Celular no Hemocentro de Ribeirão Preto foi instituído a partir de 2014, quando iniciaram-se as atividades do laboratório de cultura com certificação de boas práticas de fabricação (GMP, do inglês, *Good Manufacturing Practices*) que permitiu o cultivo e a infusão de células-tronco em pacientes e após o estabelecimento da

cultura primária e da criopreservação destas células em condições *xenofree*, caracterizada pelo cultivo das UC-MSC em meio de cultura suplementado com plasma humano convertido em soro ao invés de soro fetal bovino (DE LIMA PRATA *et al.*, 2012).

A minimização dos conflitos éticos para o uso do cordão umbilical, a alta rentabilidade no processo de isolamento e a combinação das propriedades de tecidos pré-natal e pós-natal somados, elegem a UC-MSC como substituta da BM-MSC e de outras MSC derivadas de tecido adulto na terapia celular.

1.4 Células Mesenquimais-*like* diferenciadas a partir de células-tronco de pluripotência induzida

Em contrapartida ao isolamento de MSC de tecidos adultos e fetais, a células-tronco pluripotentes também emergiram como fontes alternativas para a obtenção de MSC. Barberi e cols. (2005) foram os pioneiros em propor a obtenção de MSC a partir da diferenciação de ESC. Estas células exerciam grande fascínio devido ao seu potencial de diferenciação, contudo, este processo de obtenção de precursores tecido-específicos mostrava-se desafiador. A diferenciação mesenquimal proposta pelos autores consistia no co-cultivo de ESC sobre uma camada alimentadora de células OP9 em meio α -MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), seguida da seleção de população celular $CD73^+$ por *sorting*. Os autores foram capazes de obter progenitores mesodérmicos $CD73^+CD105^+$ com capacidade de diferenciação em adipócitos, osteócitos, condrócitos e miofibroblastos (BARBERI *et al.*, 2005).

Apesar do grande potencial de diferenciação das ESC, os aspectos éticos envolvidos em sua obtenção, além de sua natureza alogênica, restringiam o uso da mesma na obtenção de células e tecidos para uso terapêutico. Uma alternativa a estes entraves surgiu quando Yamanaka e cols. (2007) demonstraram que células somáticas humanas poderiam ser reprogramadas e dar origem às células pluripotentes semelhantes às ESC, denominadas de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) (YAMANAKA *et al.*, 2007; JUNG; BAUER; NOLTA, 2012).

As iPSC geradas por Yamanaka e cols. (2007) foram provenientes de fibroblastos transduzidos com quatro fatores de transcrição (OCT3/4, SOX2, KLF4 e c-MYC) clonados em um vetor retroviral. Porém, outras combinações de fatores de transcrição já se mostraram capazes de reprogramar células somáticas, como OCT4, SOX2, NANOG e LIN28, usada por

Thomson e cols. (2007) e TCL-1A, SOX2 e c-MYC proposta pelo grupo de pesquisa do Hemocentro de Ribeirão Preto (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011). Além disso, outros trabalhos científicos relatam a utilização de diferentes tipos de vetores na geração de iPSC, como os lentivirais poliestrômicos, adenovírus, *PiggyBAC* transposons, sendai vírus, vetores epistômicos, bem como outras estratégias, como transfecção de mRNA de genes de pluripotência, de DNA plasmidial e de fatores de pluripotência recombinantes (YAMANAKA *et al.*, 2007; OKITA *et al.*, 2008; STADTFELD *et al.*, 2008; CAREY *et al.*, 2009; FUSAKI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009; SOMMER *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2007, 2009; YUSA *et al.*, 2009; ZHOU; FREED, 2009; WARREN *et al.*, 2010; WOLTJEN *et al.*, 2013 apud PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2014). Atualmente, parte das iPSC geradas no Hemocentro de Ribeirão Preto são provenientes da reprogramação de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC, do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) com vetores epistômicos, contendo os fatores transcricionais OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC e LIN28 (CATELLI, 2016).

A obtenção de células mesenquimais derivadas de iPSC pode se dar por duas estratégias experimentais. A primeira consiste na dissociação de colônias de iPSC seguida do plaqueamento das células individualizadas em placas de cultivo tratadas previamente com gelatina com ou sem adição de fatores de crescimento ao meio de cultura. Esta abordagem resulta em populações que podem ser selecionadas por passagens consecutivas ou por citometria de fluxo (GUZZO *et al.*, 2013; HYNES *et al.*, 2014; LIAN *et al.*, 2010). A outra alternativa envolve a formação de corpos embrioides – iPSC cultivadas em suspensão para formação de uma estrutura constituída pelos três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme). Os corpos embrioides são cultivados em placas de cultivo previamente tratadas com gelatina e após a aderência dos mesmos à matriz, ocorre a proliferação de uma população de células aderentes (KIM *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2013b; VILLA-DIAZ *et al.*, 2012). Ainda não há um consenso em como denominar as células mesenquimais derivadas de iPSC e o termo utilizado aqui será o mesmo adotado por Hynes e cols. (2004), células mesenquimais-like (MSC-like).

Assim com as demais fontes alternativas, o uso de iPSC para obtenção de MSC também surgiu da necessidade de uma fonte de maior acessibilidade e de maior rentabilidade. Contudo, outras particularidades das iPSC tornam-na mais atrativa. Primeiramente, as iPSC tem um grande potencial para uma terapia celular personalizada porque pode ser gerada artificialmente via manipulação genética de qualquer tipo celular derivado do próprio paciente (EGUSA *et al.*, 2014). As iPSC apresentam a propriedade de autorrenovação e podem ser

mantidas indefinidamente estando sempre disponível para uma diferenciação direta em MSC (JUNG; BAUER; NOLTA, 2012b; SABAPATHY; KUMAR, 2016). Adicionalmente, diferente das MSC isoladas de tecido adulto que apresentam capacidade de expansão limitada, as MSC-like podem ser expandidas por até 40 passagens sem a perda da capacidade de autorrenovação e mantendo-se cariotipicamente estável (LIAN et al., 2010).

Os estudos de MSC-like ainda demonstram a possibilidade de modelos de doenças, medicina regenerativa e terapia celular (SABAPATHY; KUMAR, 2016). As MSC-like já demonstraram eficácia em modelos animais para cardiopatias (HU et al., 2015), diabetes (HIMENO et al., 2013), isquemia (LIAN et al., 2010; ZHANG et al., 2015) e anemia de Fanconi (LIU et al., 2014). Além de potencial para regeneração óssea (EGUSA et al., 2014; JEON et al., 2016; LIU et al., 2013b; VILLA-DIAZ et al., 2012) e propriedades imunomoduladoras (GIULIANI et al., 2011a; NG et al., 2016). No entanto, ainda não há ensaios pré-clínicos com as MSC-like.

Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*) para que um produto celular final seja administrado em paciente, ele deve ser estéril, viável, livre de endotoxinas e seguir oito critérios (HALME; KESSLER, 2006):

- I. Caracterização do produto, incluindo potencial *in vitro* e *in vivo*;
- II. Não deve ser capaz de se diferenciar em tipos celulares indesejados;
- III. Não deve migrar para sítios anatômicos que não seus alvos terapêuticos;
- IV. Não deve apresentar tumorigenicidade;
- V. Não deve ser imunogênico;
- VI. Não deve desencadear a doença do enxerto contra hospedeiro;
- VII. Não deve interagir com outros dispositivos, tecidos ou drogas *in vivo*;
- VIII. Para células modificadas geneticamente, não devem apresentar descontrole em suas atividades biológicas, alteração da expressão do genótipo e desencadear mutações;

Até o momento, o escopo de MSC-like é limitado e não é capaz de atender a todos estes critérios, indicando assim que há necessidade de estudos mais abrangentes.

1.5 Justificativa

O Hemocentro de Ribeirão Preto abriga o Centro de Terapia Celular (CTC-FAPESP) e o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC-CNPq/FAPESP) que têm como objetivo principal desenvolver pesquisas básicas e clínicas para entender, isolar, cultivar e utilizar as células-tronco somáticas e pluripotentes como

ferramenta terapêutica. Dentro deste contexto, diferentes estudos já foram desenvolvidos, nos quais, o isolamento de células estromais mesenquimais multipotentes do cordão umbilical (COVAS *et al.*, 2003), a criopreservação e o cultivo destas células em condições *xenofree* foram avaliados (DE LIMA PRATA *et al.*, 2012). A partir de 2014, iniciaram-se as atividades do laboratório de cultura com certificação de Boas Práticas de Fabricação (GMP, do inglês, *Good Manufacturing Practices*) que permitiu o cultivo e a infusão de células-tronco em pacientes. Todos estes acontecimentos, foram marcos importantes para a consolidação da pesquisa clínica aplicada envolvendo o cultivo de UC-MSc para infusão em pacientes visando tratar os sintomas da doença do enxerto-contrá-o-hospedeiro (DECH).

Em paralelo, as iPSC são relativamente citadas na literatura como uma fonte alternativa para obtenção de células mesenquimais. Devido ao seu potencial de autorrenovação, as iPSC podem ser mantidas indefinidamente em cultura, ou seja, são como uma fonte de fácil obtenção de células estromais mesenquimais. Além do mais, as iPSC são geradas a partir da reprogramação de células somáticas de um doador específico e por isso a sua utilização seria como fomento para uma futura terapia celular autóloga personalizada. Complementarmente, as células mesenquimais-like derivadas de iPSC demonstram uma atividade parácrina e uma taxa de proliferação superior a de células estromais mesenquimais multipotentes isoladas da medula óssea (HAN *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2015; KANG *et al.*, 2015; LIAN *et al.*, 2007).

A reprogramação de células somáticas ao fenótipo funcional de uma iPSC e a manutenção desta linhagem celular obtida é onerosa principalmente em contraste ao isolamento de MSC do cordão umbilical e o cultivo das UC-MSc. Entretanto, perante a relevância das iPSC como fonte alternativa para obtenção de MSC e do desempenho biológico *in vitro* demonstrado pelas MSC-like, tornou-se necessária a comparação destas com as UC-MSc. Ao confrontar estas duas linhagens, buscou-se neste trabalho, verificar quais seriam os pontos de equivalência e as diferenças em relação à capacidade de proliferação e propriedade de imunomodulação, uma vez que estes são pontos relevantes na terapia celular. Por fim, a execução deste trabalho acrescenta dados e informações quanto à funcionalidade das MSC-like em comparação às UC-MSc.

1.6 Hipótese

A hipótese deste trabalho foi:

- I. As MSC-*like* derivadas de iPSC são caracterizadas como células estromais mesenquimais com base nos critérios estabelecidos pela ISCT e apresentam uma capacidade proliferativa e imunomoduladora semelhante às MSC derivadas do cordão umbilical.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar as MSC-*like* derivadas de iPSC e compará-las com as UC-MSC frente às capacidades de proliferação e imunomodulação.

2.2 Objetivos específicos

1. Induzir as iPSC ao processo de diferenciação mesenquimal;
2. Avaliar as células mesenquimais-*like* segundo: aderência ao plástico, expressão de antígenos de membrana CD73, CD90, CD105, CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79 α , CD34, CD45, antígeno leucocitário humano (HLA-DR); e capacidade de diferenciação *in vitro* em adipócitos e osteoblastos;
3. Avaliar o potencial proliferativo por estimativa do tempo de duplicação da população;
4. Avaliar o potencial de imunomodulação *in vitro* pelo ensaio de inibição linfoproliferativa.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho estão representadas na Tabela 2. Todas as linhagens foram cultivadas no laboratório de Terapia Celular no Hemocentro de Ribeirão Preto.

Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas no presente estudo.

Linhagem Celular	Número de Amostras (n)	Referência
iPS-PBMC	3	Catelli, 2016
MSC-like	3	-----
UC-MSC	3	Prata, 2011
H1-ESC	1	WiCell Research Institute, WAe001-A
H9-ESC	1	WiCell Research Institute, WAe009-A

iPS-PBMC: iPSC derivadas de células mononucleares do sangue periférico humano; MSC-like: Células mesenquimais-like diferenciadas a partir de iPS-PBMC; UC-MSC: Células estromais mesenquimais isoladas do cordão umbilical; H1-ESC: Célula-tronco embrionárias H1; H9-ESC: Célula-tronco embrionária H9

3.2 Aspectos Éticos

O presente estudo não objetivou a geração de novas linhagens de iPS-PBMC ou mesmo o isolamento de novas UC-MSC. Todas as amostras utilizadas foram linhagens previamente estabelecidas em projetos em execução ou anteriores, aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), identificados pelos números de processo 11429/2009 e pelo CAEE 41458915.3.0000.5440 (Anexo 1 e 2). As células foram destinadas somente à pesquisa básica e não houve necessidade de identificação do participante da pesquisa e também nenhum prejuízo ao estado físico, psíquico, moral, intelectual ou social do mesmo. Os resultados aqui obtidos não implicaram em benefícios diretos ao participante da pesquisa, mas sim contribuíram para melhor caracterização e entendimento da biologia das MSC que contriubuirão para a elucidação de futuras aplicações destas células na terapia celular.

3.3 Estratégia Experimental

A estratégia experimental consistiu primeiramente em induzir as iPS-PBMC ao fenótipo mesenquimal. Em seguida, caracterizar as *MSC-like* obtidas segundo os critérios estabelecidos pela ISCT: aderência ao plástico, positividade em análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo em mais de 95% da população para CD73, CD90 e CD105 e menos de 2% para marcadores hematopoéticos e capacidade de diferenciação *in vitro* em adipócitos e osteócitos.

Posteriormente, as *MSC-like* e UC-*MSC* foram comparadas em relação a capacidade de proliferação e imunomodulação. A Figura 1 ilustra a estratégia experimental adotada.

Figura 1. Estratégia experimental. Primeiramente, as iPSC derivadas de células mononucleares do sangue periférico (iPS-PBMC) foram induzidas ao fenótipo mesenquimal. Em seguida, as células mesenquimais-like (*MSC-like*) obtidas foram caracterizadas segundo os critérios estabelecidos pela *International Society for Cellular Therapy* (ISCT). Após a caracterização, as *MSC-like* foram comparadas com as células estromais mesenquimais do cordão umbilical (UC-*MSC*) frente ao potencial de proliferação e imunomodulação.

3.4 Cultura de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) e células-tronco embrionárias (ESC)

As colônias de iPSC e ESC foram cultivadas em placas de 6 poços (*Greiner*) previamente tratadas com matriz de adesão Geltrex (*Stem Cell Technologies*). O meio de cultura utilizado foi o mTeSRTM1 (*Stem Cell Technologies*), meio este exclusivo para células-tronco pluripotentes, cujo volume (2 mL) foi trocado diariamente. Ao atingirem 80-90% de confluência, as colônias foram repicadas. Para este procedimento, todo o meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados com solução tampão salina tamponada com fosfato (PBS) 1X (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM; pH de 7,4) e em seguida tratados com solução de EDTA (*Merck*) 0,5 mM por 2-5 minutos para perda parcial de adesão à matriz. A seguir, a solução de EDTA foi retirada e um jato de 2 mL de meio mTeSRTM1 foi aplicado sobre as colônias para fragmentação das mesmas. Os fragmentos foram transferidos para outros poços previamente tratados com Geltrex. As placas de cultivo de iPSC foram mantidas em estufa com temperatura de 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade.

3.5 Cultura de MSC-like e UC-MSC

As MSC-like e as UC-MSC foram cultivadas em frascos T de 75 cm² (*Greiner*) com meio de cultura α -MEM (*Gibco-BRL*) suplementado com 15% soro fetal bovino (SFB) (*HyCloneTM*), 200 mM/mL de L-glutamina (*Gibco-BRL*), 100 U/mL penicilina (*Gibco-BRL*), 100 μ g/mL estreptomicina (*Gibco-BRL*), 2,4 g/L de HEPES (*Sigma-Aldrich*) e 2 g/L de bicarbonato de sódio (*Merck*). Foram realizadas três trocas de meio por semana. Ao atingirem 90% de confluência, as células foram colhidas enzimaticamente com tripsina (*Gibco*) 1:10, contadas e plaqueadas a uma densidade celular igual ou superior a 2700 células/cm². As placas de cultivo de MSC foram mantidas em estufa com temperatura de 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade.

3.6 Indução ao fenótipo mesenquimal

Para o ensaio de indução ao fenótipo mesenquimal, três iPS-PBMC (iPS-PBMC 01, iPS-PBMC 02 e iPS-PBMC 03) foram utilizadas. Como controle para o fenótipo pluripotente foram utilizadas duas linhagens de células embrionárias: H1-ESC e H9-ESC.

Ao atingir a confluência de aproximadamente 80-90%, as colônias de iPS-PBMC 01 a 03, H1-ESC e H9-ESC cultivadas em mTeSRTM1 tiveram a troca de meio diária substituída por troca a cada três dias. No sexto dia (após a suspensão de troca diária), o meio mTeSRTM1 foi retirado do poço e substituído por meio α -MEM 15% SFB. Após a confluência de 100% das células, estas foram tripsinizadas e plaqueadas em frascos T de 25 cm² (*Greiner*).

O momento da passagem das células do poço da placa de 6 poços para a garrafa de 25 cm², foi definido como passagem 0 (P0). Estas células foram expandidas e após atingir 90% de confluência, foram tripsinizadas novamente e toda a suspensão celular obtida foi plaqueada em uma garrafa de 75 cm² (*Greiner*) iniciando-se a passagem 1 (P1). A partir da passagem 2 (P2), as células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e plaqueadas em uma densidade celular igual ou superior a 2700 células/cm², sendo denominadas como MSC-like.

3.7 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

3.7.1 Marcação Extracelular

Para este ensaio, 1×10^5 células foram incubadas em temperatura ambiente com 5 μ L de anticorpos (*Becton Dickinson*) marcados com fluorocromos FITC, PE, PerCP e APC: anti-CD14, anti-CD19, anti-CD34, anti-CD38, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105 e anti-HLA-DR. Logo depois, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos no escuro. Após este período, adicionou-se 2 mL de solução tampão salina tamponada com fosfato (PBS) 1X e foi feita uma centrifugação a 362 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi ressuspensionado em 200 μ L de PBS 1X. A aquisição e a análise foram realizadas no citômetro *FACS Calibur* (*Becton Dickinson*) e Software *MultiSet* (*Becton Dickinson*).

3.7.2 Marcação Intracelular

De forma semelhante ao procedimento descrito no item anterior, a suspensão celular obtida foi fracionada em tubos de citometria previamente identificados. Em seguida, foi adicionado a cada tubo 1 mL de solução de lise *FACS Lysing Solution (1X)* (*Becton Dickinson*). Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 2 mL de PBS 1X e realizada a centrifugação a 362 x g por 3 minutos.

O sobrenadante foi descartado e sobre o precipitado celular foram adicionados 300 μ L da solução de permeabilização *FACS Permeabilizing Solution 2* (*Becton Dickinson*). As

células foram novamente incubadas em temperatura ambiente, em local escuro por 10 minutos. Após este período, fez-se uma lavagem com 2 mL de PBS 1X e posteriormente foram adicionados 5 μ L anticorpos: anti-Nanog (FiTC), anti-Oct3-4 (PE) e anti-SOX2 (PE). As próximas etapas foram realizadas como descrito no item 3.7.1.

3.8 Diferenciação em linhagens mesodérmicas *in vitro*: adipócitos e osteócitos.

Para a diferenciação em adipócitos e osteócitos, as células foram semeadas em placas de 24 poços (*Greiner*) em densidades de 2×10^4 células/poço e 5×10^3 células/poço, respectivamente. A densidade celular do grupo controle em ambos os experimentos foi de 5×10^3 células/poço. As células foram plaqueadas no dia anterior ao do ensaio e foram cultivadas com 1 mL de meio α -MEM 15 % SFB até o início do experimento.

No dia seguinte, os poços destinados à diferenciação adipogênica receberam 1 mL de meio indutor: α -MEM 15 % SFB suplementado na hora do uso com $3,44 \times 10^{-3}$ mM de insulina (*Sigma-Aldrich*), 0,2 mM indometacina (*Sigma-Aldrich*) e 0,2 mM dexametasona (*Sigma-Aldrich*). Os poços controle foram cultivados em α -MEM 15 % SFB. A troca de meio indutor foi feita duas vezes por semana e seguiu-se com este cultivo até o aparecimento de vesículas de lipídios visíveis no microscópio de contraste de fase, coradas posteriormente por meio da coloração com o corante *Oil Red O* (*Sigma-Aldrich*).

Os poços destinados à diferenciação osteogênica tiveram 0,5 mL do volume de α -MEM 15 % SFB retirado e receberam 0,5 mL de meio indutor: α -MEM 7,5 % SFB 0,4 mM ácido ascórbico (*Sigma-Aldrich*) e 20 mM β -glicerofosfato (*Sigma-Aldrich*), suplementado na hora do uso com 0,02 mM dexametasona na proporção de 0,2 μ L de dexametasona para cada 1 mL de meio indutor. Os poços controle foram cultivados em α -MEM 7,5 % SFB. Foram feitas duas troca de meio indutor por semana. A cada troca foram retirados 0,5 mL de meio indutor metabolizado pelas células e, em seguida, adicionou-se 0,5 mL de meio indutor recém suplementado com dexametasona totalizando um volume final de 1 mL. O cultivo seguiu-se até a visualização de deposição mineral de oxalato de cálcio em microscópio de contraste de fase, corado posteriormente com o corante *Alizarin Red S* (Fluka Analytical).

3.9 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

A extração de RNA total foi feita por meio do *kit RNAeasy mini kit* (Quiagen) conforme as instruções do fabricante. A reação de transcrição reversa utilizou 0,5 µg de RNA total e foi realizada com o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) utilizando. Os cDNAs obtidos foram utilizados em reações de PCR em tempo real, cujo protocolo utilizou: 5 µL de *Taqman™ Universal Master Mix II* (Applied Biosystems), 0,5 µL de sondas de hidrólise (sondas inventoriadas *Taqman™* (Life Technologies) - Tabela 3) 2,5 µL H₂O *Nuclease-free* (MerckMillipore) e 2 µL de cDNA (diluídos em uma proporção de 1:5) totalizando 10 µL. A reação foi amplificada no equipamento 7500 *Real Time PCR* (Applied Biosystems) de acordo com as seguintes condições de ciclagem: 50°C durante de 2 minutos; 95°C durante 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A expressão dos genes-alvo foi normalizada pela expressão dos genes endógenos (Tabela 3). Neste ensaio, a expressão de genes relacionados à pluripotência foi analisada e as sondas utilizadas estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Descrição dos genes analisados por PCR em Tempo Real.

Símbolo††	Nome††	Código de acesso†	Características
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	4326317E	Endógeno
ACTB	Beta actina	4326315E	Endógeno
B2M	Beta-2-microglobulina	4333766	Endógeno
NANOG	Nanog homeobox	HS04260366_g1	Pluripotência
POU5F1/OCT4	POU class 5 homeobox 1	HS01895061_u1	Pluripotência

†<http://www.lifetechnologies.com>

††Os nomes dos genes seguem a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*)

Para a análise dos resultados, foi realizada a quantificação relativa dos transcritos por meio da fórmula de unidades relativas de expressão (URE), estabelecida pela equação:

$$URE = 10^4 \div 2^{\Delta C_q}$$

onde, C_q (do inglês, *cycle of quantification*) e $\Delta C_q = C_q \text{ Médio dos Genes Alvos} - C_q \text{ Médio da média geométrica dos genes endógenos}$ (ALBESIANO et al., 2003; BUSTIN et al., 2009).

3.10 Ensaio de estimativa do tempo de duplicação da população

Para determinar o potencial proliferativo das MSC-like em relação às UC-MSC foi utilizado o ensaio de estimativa do tempo de duplicação da população (do inglês, *Doubling Time Assay*). Para isso, na passagem 5 (P5), 1×10^4 células foram plaqueadas em triplicata em placas de 6 poços com 2 mL de meio α -MEM 15% SFB. Ao atingir 90% de confluência, as células foram tripsinizadas, contadas e novamente plaqueou-se 1×10^4 células em triplicata, iniciando-se uma nova passagem. O ensaio foi conduzido até a passagem 8 (P8). Os números de células inicial e final em cada passagem foram usados para calcular o número de duplicações. Para tanto aplicou-se a seguinte fórmula:

$$N = 3,3 \times \log_{10}\left(\frac{N_f}{N_i}\right)$$

onde N corresponde ao número de duplicações, N_i o número inicial de células plaqueadas e N_f , o número de células recuperadas ao final de cada passagem.

Para obter o tempo em horas necessário para uma duplicação, o número de duplicações (N) obtido foi dividido pelo período de tempo (horas) de cada passagem:

$$\text{Tempo de Duplicação} = \frac{N}{\text{período de tempo de cada passagem}}$$

3.11 Ensaio de Imunomodulação Linfoproliferativa

No dia anterior ao início do ensaio, as MSC-like e as UC-MSC foram plaqueadas em triplicata em uma placa de 24 poços em três diferentes densidades celulares: 1×10^5 células/poço, $0,5 \times 10^5$ células/poço e $0,25 \times 10^5$ células/poço. No dia seguinte, aproximadamente 40 mL de sangue foram coletados em tubos BD Vacutainer® Sodium Heparin (Becton Dickinson) para o isolamento de PBMC por gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Science) conforme as instruções do fabricante. Após o isolamento, parte da suspensão de PBMC foi reservada (2×10^6 células) e a outra parte (no mínimo 2×10^7) seguiu para a marcação com *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) (Invitrogen).

A suspensão celular contendo 2×10^6 foi diluída de forma que a solução final obtida tinha 4 mL de volume final e densidade celular de $0,5 \times 10^5$ células/mL. Após esta etapa a solução foi conservada em geladeira até o momento do uso.

Para o processo de marcação, a suspensão celular de no mínimo 2×10^7 células foi incubada por um período de 10 minutos a 37°C em uma solução contendo 5 mM de CFSE diluído em PBS 0,1% albumina humana. Após a etapa de marcação foram feitas duas etapas

de lavagem com 20 mL de RPMI 1640 (*Gibco*) 10% SFB a 335 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, as células marcadas foram ressuspensas na densidade de $0,5 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI 1640 10% SFB.

A suspensão celular de PBMC marcadas foi então dividida em duas: a primeira fração não recebeu nenhum tratamento, enquanto que a segunda recebeu adição do mitógeno fitoematoaglutinina (PHA) (*Sigma-Aldrich*) na concentração de 0,5 µg/mL.

O meio de cultura foi retirado dos poços contendo MSC, previamente plaqueadas, e foi adicionado 1 mL de suspensão de PBMC marcadas com CFSE e estimuladas por PHA. Em outra placa de 24 poços foram cultivadas somente PBMC em três condições diferentes: i) PBMC não marcada com CFSE, ii) PBMC marcada com CFSE e não estimulada com PHA; e iii) PBMC marcada com CFSE e estimulada com PHA. As duas placas de cultivo foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante cinco dias. No quinto dia de co-cultivo, as PBMC foram coletadas, marcadas com anticorpos anti-CD3(APC), anti-CD4(PE) e anti-CD8(PCY5) (*Becton Dickinson*) e analisadas por citometria de fluxo. Este ensaio comparou a porcentagem de proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ co-cultivados com MSC com àqueles cultivados sem a presença das MSC. O monitoramento da proliferação dos linfócitos foi realizado por meio da diminuição de intensidade de fluorescência do CFSE. Este protocolo foi baseado no mesmo descrito por Strazza (2014).

3.12 Análise Estatística

As análises dos resultados de imunofenotipagem, expressão gênica, estimativa do tempo de duplicação da população e o potencial de imunomodulação foram realizadas com auxílio do software *GraphPad InStat software*, versão 6.05 para Windows (*GraphPad Software*; www.graphpad.com). O nível de significância para as análises estatística foi de 0,05 e os teste utilizados foram: teste *t* de Student não pareado com correção de Welch, ANOVA de duas vias e teste de comparação múltipla de *Sidak*, ANOVA de duas vias e teste de comparação múltipla de Bonferroni e ANOVA de duas vias e teste de comparação múltiplo de Turkey.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 A indução de iPSC ao fenótipo mesenquimal gera uma população celular não pluripotente, aderente ao plástico e fibroblastoide.

Para indução à diferenciação das iPSC ao fenótipo mesenquimal, as colônias de iPS-PBMC foram inicialmente privadas da troca diária de meio mTeSR1TM. Após o terceiro dia do processo de indução ao fenótipo mesenquimal, as colônias de iPS-PBMC (n=3) demonstraram sinais de envelhecimento (cerne amarelado) e pontos de diferenciação (células individualizadas e com morfologia variada) (Figura 2B). Após 7 dias de cultivo (Figura 2C), o meio de cultura apresentou cor amarela e debris celulares. Entre o 9º-12º dia (Figura 2D-2E), as células cultivadas em meio de cultura α -MEM 15% SFB, apresentaram maior número de células individualizadas e as poucas colônias que restaram apresentaram o cerne escuro.

Após atingir 100% de confluência, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em frascos T de 25 cm² para a seleção de células aderentes ao plástico. A população de células aderentes exibiu uma morfologia mais uniforme e semelhante a de células epiteliais como descrito na literatura (HYNES et al., 2014) (Figura 2F). Na passagem posterior (etapa de expansão), as células aderentes apresentaram uma morfologia fibroblastoide uniforme (Figura 2G).

Figura 2. Indução ao fenótipo mesenquimal. Esquema representativo da indução de uma iPSC derivada de células mononucleares de sangue periférico (iPS-PBMC) ao fenótipo mesenquimal. (A)

início do processo. As setas em azul demonstram as alterações morfológicas no decorrer do processo de indução ao fenótipo mesenquimal e as linhas azuis pontilhadas mostram os momentos de intervenção como a substituição do meio de cultura, colheita das células por ação enzimática e a expansão do fenótipo desejado. Dia 0 (antes da indução), colônias de iPS-PBMC cultivadas em mTeSRTM1 apresentam bordas delineadas e cerne claro e compacto (A). Dia 3, envelhecimento das colônias e aparecimento de pontos de diferenciação (B). Dia 7, o meio mTeSRTM1 é substituído pelo meio α -MEM 15% SFB (C). Dia 9-12, aumento do número de células individuais e as colônias de iPS restantes apresentam cerne escuro (D-E). Seleção de células com capacidade de aderência ao plástico (F). Células individualizadas e com morfologia fibroblastoide (G). Imagens A, D, E, F e G obtidas em microscópio de contraste de fase com barra de escala de 500 μ m (aumento de 40X). Imagens B e C obtidas em microscópio de contraste de fase com barra de escala de 200 μ m (aumento de 100X).

Depois de 15 a 20 dias do processo de indução ao fenótipo mesenquimal, as colônias de iPSC diferenciaram-se em uma população de células individualizadas, aderentes e com morfologia fibroblastoide semelhante a das UC-MSc e por isso foram denominadas MSC-like. A Figura 3 mostra as três linhagens de iPS-PBMC (iPS-PBMC 01, iPS-PBMC 02 e iPS-PBMC 03), as três linhagens MSC-like (MSC-like 01, MSC-like 02 e MSC-like 03) provenientes das iPS-PBMC, respectivamente, e as três UC-MSc (UC-MSc 01, UC-MSc 02 e UC-MSc 03).

Figura 3. Morfologia das linhagens iPS-PBMC, MSC-like e UC-MSC. Linhagens de iPSC derivadas de células mononucleares do sangue periférico (iPS-PBMS) (n=3) (AI-AIII). A morfologia de uma célula-tronco pluripotente consiste em uma borda delineada e de um cerne compacto e claro. Células mesenquimais-like (MSC-Like) (n=3) diferenciadas das iPS-PBMC (BI-BIII). Apresentam-se como células individualizadas e com uma morfologia fibroblastoide semelhante às células estromais mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC) (n=3) (CI-CIII). A análise da morfologia foi feita em microscópio de contraste de fase e as imagens obtidas apresentam barra de escala de 500 µm (aumento de 40x).

As MSC-like obtidas foram caracterizadas pela expressão de RNA mensageiro (mRNA) de genes de pluripotência NANOG e OCT-3/4 por PCR em tempo real e também pela expressão de suas proteínas, por citometria de fluxo. Para as análises, as células-tronco embrionárias H1 (H1-ESC) e H9 (H9-ESC) e suas respectivas MSC-like (H1-MSC-like e H9-MSC-like) foram utilizadas como controle. A análise por PCR em tempo real mostrou que a expressão gênica mRNA de NANOG e de mRNA de OCT-4 foram, respectivamente, 35000 e 20000 vezes menor nas MSC-like quando comparadas com as iPS-PBMC (p-valor = 0,04). Os dados também mostraram uma menor expressão dos genes de pluripotência nas H1-MSC-like em comparação a H1-ESC (Figura 5) indicando assim se tratar de células não pluripotentes. Corroborando com este resultado, a imunofenotipagem por citometria de fluxo demonstrou

que a porcentagem de MSC-like positivas para as proteínas NANOG e OCT-4 foi baixa (3%), quando comparada com as ESC e as iPS-PBMC (Figura 5).

Figura 4. Expressão do mRNA dos genes de pluripotência NANOG e OCT-3/4. Análise da expressão gênica por PCR quantitativa para as linhagens iPS derivadas de células mononucleares do sangue periférico (iPS-PBMC) (n=3), células mesenquimais-like (MSC-like) (n=3), célula-tronco embrionária H1 (H1-ESC) e H1 diferenciada em célula mesenquimal-like (H1-MSC-like) para genes de pluripotência (NANOG, OCT-3/4). Os resultados demonstram a expressão relativa de genes associados à pluripotência. Os dados representam a unidade relativa de expressão (URE) média normalizada pelos genes endógenos β 2-microglobulina, β -actina e GAPDH e desvio padrão amostral. A análise estatística entre amostras foi feita de acordo com o teste *t* de Student não pareado com correção de Welch com nível de significância (α) de 5%.

Figura 5. Imunofenotipagem para Marcadores de pluripotência NANOG e OCT-3/4. Análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo das linhagens iPSC derivadas de células mononucleares do sangue periférico (iPS-PBMC) (n=3) e das células mesenquimais-like MSC-like (n=3) em relação à expressão dos marcadores de pluripotência (NANOG, OCT-3/4). Como controle positivo do experimento, foram utilizadas duas células-tronco embrionárias (ESC): H1-ESC e H9-ESC; e duas MSC-like provenientes de ESC (ESC-MSC-like): H1-MSC-like e H9-MSC-like. Os dados representam a porcentagem média de células positivas para determinado marcador e o desvio padrão amostral. A análise estatística entre amostras foi feita de acordo com um ANOVA de duas vias e teste de comparação múltiplo de Sidak com nível de significância (α) de 5%.

4.2 As MSC-like são positivas para CD73, CD90, CD105 e negativas para marcadores hematopoéticos e HLA-DR

Após a indução ao fenótipo mesenquimal, as MSC-like foram submetidas à análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo usando um painel de anticorpos composto por marcadores hematopoéticos (anti-CD14, anti-CD19, anti-CD34 e anti-CD45), anti-HLA-DR, anti-CD73, anti-CD90 e anti-CD105. Este ensaio foi realizado para determinar se a população de MSC-like exibia o perfil de marcadores de superfície estabelecido pela ISCT. Para esta análise, as UC-MSC foram utilizadas como controle.

Os resultados demonstram que as MSC-like (n=3) foram negativas (menos de 2%) para marcadores hematopoéticos e HLA-DR. Em relação aos demais antígenos de superfície, mais de 90% das MSC-like (n=3) foram positivas para CD73 e CD90 (Tabela 4). A análise estatística por ANOVA de duas vias com teste de comparação de Sidak com nível de

significância de 5% indicou que não há diferença significativa entre as médias de marcadores hematopoéticos, HLA-DR, CD73 e CD90 das *MSC-like* em relação as das UC-*MSC*.

No entanto, para o marcador CD105, a porcentagem média de *MSC-like* positivas foi menor ($73,7 \pm 34,7\%$) que a encontrada nas UC-*MSC* ($97,0 \pm 2,7\%$). A análise estatística pelo teste t de *Student* não pareado com correção de Welch indicou que a diferença entre as duas médias não é significativa.

Tabela 4. Imunofenotipagem das linhagens *MSC-like*.

Linhagens	Antígenos de Superfície (% média de células positivas $\pm$ desvio padrão amostral)							
	CD14	CD19	CD34	CD45	HLA-DR	CD73	CD90	CD105
<i>MSC-like</i> (n=3)	0,2 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 1,4	1,1 $\pm$ 1,3	0,3 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,4	91,5 $\pm$ 4,5	95,4 $\pm$ 2,8	73,7 $\pm$ 34,7
UC-<i>MSC</i> (n=3)	0,4 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 3,0	0,6 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 2,0	1,0 $\pm$ 1,1	97,7 $\pm$ 2,3	98,0 $\pm$ 1,4	97,0 $\pm$ 2,7

MSC-like: Células mesenquimais-*like*; UC-*MSC*: Células Estromais Mesenquimais do Cordão Umbilical.

4.3 As *MSC-like* são capazes de se diferenciarem em adipócitos e osteócitos

Com o intuito de avaliar a capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas, as *MSC-like* foram induzidas à diferenciação em adipócitos e osteócitos *in vitro*. Como controle positivo deste ensaio foram utilizadas as UC-*MSC*.

O período de indução até o aparecimento dos primeiros sinais de diferenciação adipogênica (acúmulos de vesículas lipídicas) variou entre as *MSC-like*: *MSC-like* 01 / 20 dias, *MSC-like* 02 / 19 dias e *MSC-like* 03 / 17 dias. As UC-*MSC* apresentaram indícios de diferenciação adipogênica após 15 dias de indução. Embora não tenha sido relatado grandes diferenças em relação ao período de diferenciação, notou-se que as vesículas exibidas pelas *MSC-like*, foram menores que as vesículas lipídicas observadas nas UC-*MSC*. Além disso, também houve uma diferença em relação à distribuição na placa de cultura, uma vez que, as vesículas lipídicas das *MSC-like* não se mostravam presentes ao longo de toda a área da placa de cultura como observado nas UC-*MSC*. As Figuras 6 e 7 representam os resultados obtidos pelo ensaio de diferenciação adipogênica das *MSC-like* e das UC-*MSC*, respectivamente, após a coloração com o corante *Oil Red*.

Figura 6. Análise morfológica de MSC-like diferenciadas em adipócitos. Diferenciação adipogênica de células mesenquimais-like (MSC-like) coradas com *Oil Red*. MSC-like 01 (A e D) após 20 dias, MSC-like 02 (B e E) após 19 dias e MSC-like 03 (C e F) após 17 dias. Células cultivadas em meio indutor e diferenciadas em adipócitos (A à C). Células cultivadas em meio de cultura padrão e não diferenciadas em adipócitos (D a F). Imagens A, D, C e F obtidas em microscópio de contraste de fase com barra de escala de 50 µm (aumento de 600X). Imagens B e E obtidas em microscópio de contraste de fase com barra de escala de 50 µm (aumento de 400X). As setas pretas indicam as vesículas lipídicas coradas em vermelho pelo *Oil Red*

Figura 7. Análise morfológica de UC-MSC diferenciadas em adipócitos. Diferenciação adipogênica de células estromais mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC) coradas com *Oil Red*. UC-MSC 01 (A e D) após 15 dias, UC-MSC 02 (B e E) após 15 dias e UC-MSC 03 (C e F) após 15 dias. Células cultivadas em meio indutor e diferenciadas em adipócitos (A à C). Células cultivadas em meio de cultura padrão e não diferenciadas em adipócitos (D à F). Imagens A à F obtidas em microscópio de contraste de fase com barra de escala de 50 µm (aumento de 400X). As setas pretas indicam as vesículas lipídicas coradas em vermelho pelo *Oil Red*.

O período de indução até o aparecimento de sinais de diferenciação osteogênica (acúmulo de cristais de oxalato de cálcio) foi de 13 dias para as MSC-like 01 e 03 e de 19 dias para a MSC-like 02. A UC-MSC 03 apresentou indícios de diferenciação osteogênica após 15 dias de indução e as UC-MSC 01 e 02, após 18 dias. Novamente não houve grande diferença no período de diferenciação. Contudo, o acúmulo de cristais de oxalato de cálcio na linhagem

MSC-*like* 01 apresentou-se por toda a área da placa de cultura diferentemente das outras linhagens MSC-*like* em que o acúmulo se mostrou mais pontual. As Figuras 8 e 9 representam os resultados obtidos pelo ensaio de diferenciação osteogênica das MSC-*like* e das UC-MSC, respectivamente, após a coloração com o corante *Alizarin Red*.

Figura 8. Análise morfológica de MSC-like diferenciadas em osteócitos. Diferenciação osteogênica de células mesenquimais-like (MSC-like) coradas com *Alizarin Red*. MSC-like 01 (A e D) após 13 dias, MSC-like 02 (B e E) após 19 dias e MSC-like 03 (C e F) após 13 dias. Células cultivadas em meio indutor e diferenciadas em osteócitos (A à C). Células cultivadas em meio de cultura padrão e não diferenciadas em osteócitos (D à F). Imagens A, D, C e F obtidas em microscópio de contraste de fase com barra de escala de 200 µm (aumento de 100X). Imagens B e E obtidas em microscópio de contraste de fase com barra de escala de 100 µm (aumento de 200X). As setas pretas indicam acúmulos de oxalato de cálcio corados em vermelho pelo *Alizarin Red*.

Figura 9. Análise morfológica de UC-MSC diferenciadas em osteócitos. Diferenciação osteogênica de células estromais mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC) coradas com *Alizarin Red*. UC-MSC 01 (A e D) após 18 dias, UC-MSC 02 (B e E) após 18 dias e UC-MSC 03 (C e F) após 15 dias. Células cultivadas em meio indutor e diferenciadas em osteócitos (A à C). Células cultivadas em meio de cultura padrão e não diferenciadas em osteócitos (D à F). Imagens de A à F obtidas em microscópio de contraste de fase com barra de escala de 200 µm (aumento de 100X). As setas pretas indicam acúmulos de oxalato de cálcio corados em vermelho pelo *Alizarin Red*.

4.4 As MSC-like demonstram capacidade de proliferação menor que as UC-MSC

A taxa de proliferação das MSC é um fator limitante à expansão e à quantidade de células na terapia celular, desta forma, as MSC-like foram comparadas com as UC-MSC em

relação ao potencial de proliferação pelo ensaio de tempo de duplicação. As células foram cultivadas por 3 passagens (P5-P8) consecutivas e os resultados (Tabela 5) demonstraram que as UC-MSC precisaram de um período menor de tempo (horas) para se duplicar do que as MSC-like. Esta diferença foi significativa entre as passagens 5 e 6 como observado na Tabela 5. Em média, o tempo de duplicação da UC-MSC foi aproximadamente duas vezes menor do que o das MSC-like.

Tabela 5. Tempo de duplicação das linhagens MSC-like e UC-MSC entre as passagens 5 e 8.

Passagem	MSC-like (n=3)	UC-MSC (n=3)
	Tempo de Duplicação Médio (horas)	Tempo de Duplicação Médio (horas)
P5-P6**	66,3±27,1	26,5±8,3
P6-P7	45,1±1,8	35,2±2,3
P7-P8	54,4±5,8	30,5±3,8

MSC-like: Células mesenquimais-like; UC-MSC: Células Estromais Mesenquimais do Cordão Umbilical; P5: passagem 5; P6: passagem 6; P7: passagem 7.

** : A análise estatística entre amostras foi feita de acordo com um ANOVA de duas vias e teste de comparação múltipla de Bonferroni com nível de significância (α) de 5%.

A Figura 10 mostra o gráfico de número de duplicações acumuladas ao longo das 3 passagens. O tempo de duplicação médio menor das UC-MSC permitiu a obtenção de um número maior de duplicações em relação às MSC-like ao longo do cultivo.

Figura 10. Ensaio de Tempo de Duplicação. Quantidade de duplicações acumuladas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC) e células mesenquimais-like (MSC-like) por número de dias. Cada linhagem foi cultivada por 3 passagens (P5-P8).

4.5 As MSC-like não apresentam propriedades imunomoduladoras

As MSC são conhecidas por exercer um efeito parácrino imunomodulatório sobre as células do sistema imunológico. Assim as MSC-like e as UC-MSC foram analisadas frente à propriedade imunomoduladora pelo efeito de inibir a proliferação de linfócitos T. Foram analisados dois grupos: i) PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com mitógeno e não co-cultivadas com MSC (controle positivo do experimento); e ii) PBMC (marcadas e estimuladas) e co-cultivadas (co-cultivos I a III) com MSC-like/UC-MSC para avaliar o efeito imunomodulatório. Ao final deste experimento, a proliferação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ do primeiro grupo foi comparada com a proliferação destas células no segundo grupo.

Os resultados demonstraram que os linfócitos T $CD4^+$ apresentaram proliferação menor quando co-cultivados com UC-MSC (Tabela 6 e Figura 11). No entanto a análise estatística dos dados por ANOVA de duas vias com teste de comparação múltipla de Turkey com nível de significância de 5% mostrou que esta diferença não foi significativa.

Os linfócitos T $CD4^+$ não tiveram sua proliferação influenciada quando co-cultivados com MSC-like. A porcentagem de proliferação de linfócitos T $CD4^+$ nos co-

cultivos I a III (respectivamente, $40,2 \pm 22,7\%$; $40,1 \pm 17,8\%$; $43,1 \pm 17,9\%$) foi maior do que a do controle positivo ($37,7 \pm 8,6\%$) como também pode-se observar na Tabela 6 e na Figura 11.

Tabela 6. Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ livres e co-cultivados com MSC.

Porcentagem Média de Proliferação de linfócitos T CD4 ⁺	Controle Positivo (%)	Co-Cultivo I (%)	Co-Cultivo II (%)	Co-Cultivo III (%)
Ensaio de Imunomodulação para UC-MSC	$37,7 \pm 8,6$	$10,4 \pm 8,7$	$13,6 \pm 9,0$	$21,2 \pm 4,7$
Ensaio de imunomodulação para MSC-like	$37,7 \pm 8,6$	$40,2 \pm 22,7$	$40,1 \pm 17,8$	$43,1 \pm 17,9$

Co-Cultivo I: 10^5 (MSC-like ou UC-MSC) /mL + 5×10^5 PBMC (marcadas e estimuladas)/mL; Co-Cultivo II: $0,5 \times 10^5$ (MSC-like ou UC-MSC) /mL + 5×10^5 PBMC (marcadas e estimuladas)/mL; Co-cultivo III: $0,25 \times 10^5$ (MSC-like ou UC-MSC) /mL + 5×10^5 PBMC (marcadas e estimuladas)/mL; UC-MSC: célula estromal mesenquimal do cordão umbilical MSC-like: células mesenquimais-like.

Figura 11. Ensaio de Imunomodulação – Análise da proliferação de linfócitos T CD4⁺. Comparação da proliferação de linfócitos T CD4⁺ presentes na população de PBMC com àqueles presentes nos co-cultivos de PBMC e MSC-like/UC-MSC. O controle positivo era formado por 5×10^5 PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com o mitógeno fitoemaglutinina. Foram realizados três co-cultivos de PBMC + MSC simultaneamente: I) 10^5 (MSC-like ou UC-MSC)/mL + 5×10^5 PBMC (marcadas e estimuladas)/mL; II) $0,5 \times 10^5$ (MSC-like ou UC-MSC) /mL + 5×10^5 PBMC (marcadas e estimuladas)/mL; III) $0,25 \times 10^5$ (MSC-like ou UC-MSC)/mL + 5×10^5 PBMC (marcadas e estimuladas)/mL. A análise estatística entre amostras foi feita de acordo com um ANOVA de duas vias e teste de comparação múltiplo de Turkey com nível de significância (α) de 5%.

A análise de proliferação de linfócitos T CD8⁺ co-cultivados com UC-MSC em três condições demonstraram menos de 20% de proliferação (Tabela 7) nas três condições de co-cultivo. Os valores de porcentagem de proliferação nos co-cultivos são próximos (respectivamente, $9,8 \pm 4,7\%$; $10,7 \pm 4,3\%$; $8,3 \pm 4,2\%$), sugerindo que a propriedade imunomoduladora dentro destas condições foi constante (Tabela 7 e Figura 12).

As porcentagens de proliferação de linfócitos T CD8⁺ co-cultivados com MSC-like em três condições diferentes (respectivamente, $50,9 \pm 29,4\%$; $51,9 \pm 32,4\%$; $55,8 \pm 31,0\%$) quando comparadas com a proliferação do controle positivo ($63,3 \pm 9,1\%$) se mostraram menores, no entanto, estas diferenças (Tabela 7 e Figura 12) não foram significantes de acordo com a análise estatística (ANOVA de duas vias com teste de comparação múltipla de Turkey com nível de significância de 5%).

Tabela 7. Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ livres e co-cultivados com MSC.

Porcentagem Média de Proliferação de linfócitos T CD8 ⁺	Controle Positivo (%)	Co-Cultivo I (%)	Co-Cultivo II (%)	Co-Cultivo III (%)
Ensaio de Imunomodulação para UC-MSC	63,3±9,1	9,8±4,7**	10,7±4,3**	8,3±4,2**
Ensaio de imunomodulação para MSC-like	63,3±9,1	50,9±29,4	51,9±32,4	55,8±31,0

Co-Cultivo I: 10⁵ (MSC-like ou UC-MSC) /mL + 5x10⁵ PBMC (marcadas e estimuladas)/mL; Co-Cultivo II: 0,5x10⁵ (MSC-like ou UC-MSC) /mL + 5x10⁵ PBMC (marcadas e estimuladas)/mL; Co-cultivo III: 0,25x10⁵ (MSC-like ou UC-MSC) /mL + 5x10⁵ PBMC (marcadas e estimuladas)/mL; UC-MSC: célula estromal mesenquimal do cordão umbilical; MSC-like: células mesenquimais-like.

** : ANOVA de duas vias com teste múltiplo de Turkey com nível de significância (α) de 5%.

Figura 12. Ensaio de Imunomodulação – Análise de proliferação de linfócitos T CD8⁺. Proliferação de linfócitos T CD8⁺ presentes na população de PBMC com àqueles presentes nos co-cultivos de PBMC e MSC-like/UC-MSC. O controle positivo era formado por 5×10^5 PBMC marcados com CFSE e estimulados com o mitógeno fitoemaglutinina. Foram realizados três co-cultivos de PBMC + MSC simultaneamente: I) 10^5 (MSC-like ou UC-MSC)/mL + 5×10^5 PBMC (marcadas e estimuladas)/mL; II) $0,5 \times 10^5$ (MSC-like ou UC-MSC) /mL + 5×10^5 PBMC (marcadas e estimuladas)/mL; III) $0,25 \times 10^5$ (MSC-like ou UC-MSC)/mL + 5×10^5 PBMC (marcadas e estimuladas) /mL. A análise estatística entre amostras foi feita de acordo com um ANOVA de duas vias e teste de comparação múltiplo de Turkey com nível de significância (α) de 5%.

Discussão

5 DISCUSSÃO

As iPSC representam uma fonte de maior disponibilidade para obtenção de células estromais mesenquimais. Ademais, as células mesenquimais derivadas de iPSC, as *MSC-like*, são células promissoras para aplicação em terapias personalizadas. Em paralelo, a terapia celular dispõe atualmente das propriedades terapêuticas das UC-MSC, uma população celular de fácil isolamento, rendimento notável, alta capacidade de proliferação e ausência de tumorigenicidade. Assim, perante a relevância das iPSC como fonte alternativa para obtenção de MSC e do desempenho *in vitro* demonstrado pelas *MSC-like* tornou-se necessário a comparação destas com as UC-MSC.

Neste trabalho, três iPS-PBMC foram induzidas ao fenótipo mesenquimal e as *MSC-like* obtidas foram caracterizadas em relação à expressão de genes e marcadores de pluripotência, aderência ao plástico, imunofenotipagem para marcadores de superfície e capacidade de diferenciação (adipogênica e osteogênica). Após a etapa de caracterização, as *MSC-like* e as UC-MSC foram comparadas frente à capacidade de proliferação celular e imunomodulação.

O protocolo utilizado no nosso trabalho para geração de MSC a partir de iPSC consistiu em interromper a troca diária de meio mTeSR1TM (meio de cultura responsável por manter a autorrenovação das iPSC), seguida da dissociação enzimática de colônias de iPSC com posterior plaqueamento das células individualizadas em placas não tratadas com gelatina e cultivadas em meio α -MEM acrescido somente de 15% de SFB. O resultado da indução das iPS-PBMC ao fenótipo mesenquimal foi uma população de células aderentes ao plástico, não pluripotentes e com morfologia fibroblastoide.

O protocolo aqui adotado mostrou-se de fácil execução assim como os descritos por Guzzo e cols. (2013), Hynes e cols. (2014) e Kang e cols. (2015) (GUZZO *et al.*, 2013; HYNES *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2015). No protocolo de Guzzo e cols. (2013), as colônias de iPSC inicialmente foram dissociadas enzimaticamente com acutase, a seguir a suspensão celular foi filtrada em membrana de 40 μ m e depois cultivadas a uma densidade celular de 1×10^4 células/cm² em placas previamente tratadas com gelatina e cultivadas utilizando meio D-MEM *High Glucose* (Gibco) 10% SFB (Hyclone) acrescido de 5 ng/mL bFGF. Os autores relataram uma população de morfologia heterogênea nas duas primeiras passagens tornando-se uma população de morfologia homogênea nas passagens posteriores. Hynes e cols. (2014) partem da individualização física das colônias por pitetagem. Os fragmentos obtidos foram plaqueados sobre poços com gelatina e o cultivo foi feito em meio α -MEM 15% SFB. As

células foram cultivadas em placas tratadas com gelatina por mais duas passagens e foram necessárias cerca de 5 a 10 passagens posteriores em placas não tratadas com gelatina para que a população adquirisse morfologia uniforme. Kang e cols. (2015) diferente dos outros autores substituem o meio de cultivo de iPSC (D-MEM 20% *Knockout Serum Replacement*, 2 mM L-glutamina, 1% penicilina/streptomicina, 0,1 mM 2-mercaptoetanol e 10 ng/mL de bFGF) por meio de cultivo para MSC (DMEM *Low Glucose* 10% SFB). As colônias foram cultivadas por duas semanas no meio para MSC e subsequentemente transferidas para placas tratadas com gelatina com auxílio de tripsina.

A comparação dos protocolos de Guzzo e cols. (2013), Hynes e cols. (2014), Kang e cols. (2015) com aquele utilizado por nós demonstrou que não há necessidade de acrescentar o bFGF ao meio de cultivo de MSC e nem mesmo o tratamento das placas de cultura com gelatina para garantir uma população de células aderentes.

Ao analisar as etapas que compõe o protocolo utilizado aqui (interrupção da troca diária de meio mTeSR1TM, dissociação enzimática de colônias de iPSC, plaqueamento das células individualizadas em placas não tratadas com gelatina e cultivado em meio α -MEM acrescido somente de 15% de SFB), supõe-se que a obtenção de células aderentes ao plástico se deve à interrupção da troca do meio mTeSR1TM seguido do plaqueamento em superfície plástica livre de gelatina. O meio mTeSR1TM é principalmente responsável pela manutenção de altos níveis de expressão de múltiplos genes associados ao estado indiferenciado das iPSC como por exemplo POU5F1 (OCT-4) e NANOG (LEE et al., 2011). O gene POU5F1 codifica o fator de transcrição Oct-4 que se liga à região promotora ATGCAAT/TACGTTTA promovendo a transcrição de genes envolvidos na manutenção do estado indiferenciado e pluripotente das células-tronco pluripotentes, incluindo NANOG e o próprio POU5F1 (COVAS & ZAGO, 2006). A manipulação do meio de cultura interfere no ciclo de autorrenovação das células fazendo com que as iPSC se diferenciem. O plaqueamento em superfície plástica livre de gelatina atuaria como um método de seleção positivo somente para células diferenciadas e com capacidade de aderência ao plástico. Um fato que corrobora com esta suposição é que as MSC-like obtidas são células aderentes e com baixa expressão gênica para POU5F1 (OCT-4) e NANOG. A presença de gelatina facilitaria a seleção de células com perfil aderente diversificado, isto explica porque Hynes e cols. (2014) necessitaram de 5 a 10 passagens posteriores para obter uma população homogênea.

Dado que o protocolo de indução ao fenótipo mesenquimal gerou células aderentes e com morfologia fibroblastoide, a etapa seguinte foi a avaliação do perfil imunofenotípico desta população obtida. As MSC-like apresentaram menos 2% de sua população como células

positivas para marcadores hematopoéticos e HLA-DR, mais delas 90% eram positivas para CD73 e CD90 e menos de 80% para CD105.

Em relação aos marcadores hematopoéticos (CD14, CD19, CD34, CD45) e HLA-DR, a porcentagem de MSC-like apresentou-se condizente ao preconizado pela ISCT e aos relatos da literatura (GUZZO *et al.*, 2013; HYNES *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2015; LIAN *et al.*, 2010). No entanto, é possível observar que o valor dos desvios que acompanham as médias é alto (CD19 $1,1 \pm 1,4\%$ e CD34 $1,1 \pm 1,3\%$ na população de MSC-like, por exemplo) (Tabela 4).

O desvio padrão amostral é um reflexo da variabilidade entre as amostras e é sabido também que o valor do desvio padrão é inversamente proporcional ao número de amostras (n) (PAGANO & GAUVREAU, 2010). A análise dos valores de porcentagem de MSC-like positivas para CD19 e para CD34 mostra que há uma variação de 0,0 a 2,7% e de 0,0 a 2,6% (Apendice 1), respectivamente. Além disso, como o n deste trabalho foi igual a 3 (n=3), esperava-se então altos valores de desvio. Outro fator influente é que a porcentagem de células positivas para marcadores hematopoéticos é uma medida muito baixa (menos de 2%), o que a deixa vulnerável a erros experimentais. Uma maneira de abaixar o valor do desvio padrão amostral neste caso seria aumentar o número de amostras.

Em relação a CD73, CD90 e CD105, o perfil imunofenotípico obtido não atende ao critério II estabelecido pela ISCT - mais de 95% da população de MSC deveria ser positiva para CD73, CD90 e CD105. Dentre os três marcadores (Tabela 4), somente CD90 foi presente em mais de 95% da população, CD73 foi presente em menos 92% das células e somente $73,7 \pm 34,7\%$ da população de MSC-like foi positiva para CD105. Assim como nos marcadores hematopoéticos, CD19 e CD34, o desvio que acompanha a média para CD105 apresenta alto valor em decorrência de n amostral baixo e da grande variabilidade entre as amostras: a porcentagem de MSC-like positivas para CD105 variou de 34 a 98,2% (Apêndice 2).

No estudo proposto por Brown e cols. (2014), MSC derivadas da medula óssea foram comparadas com MSC derivadas de células-tronco embrionárias (H1-ESC e H9-ESC) em termos de perfil imunofenotípico. Os resultados demonstraram que as MSC derivadas da H9-ESC eram compostas por uma população com baixa porcentagem de células positivas para CD73, CD90 e CD105, diferentemente das MSC obtidas da H1-ESC, que se mostraram fenotipicamente semelhante às MSC da medula óssea em relação aos mesmos marcadores. Os autores atribuem estes resultados às diferenças intrínsecas entre as linhagens H9-ESC e H1-ESC (BROWN; SQUIRE; LI, 2014). Embora não mencionadas pelos autores, tais diferenças intrínsecas são de caráter genético e epigenético. Tanto em ESC quanto em iPSC, estes

fatores tornam cada linhagem única (SABAPATHY; KUMAR, 2016) e, portanto, podem ser interferentes no comprometimento de cada linhagem ao fenótipo mesenquimal durante o processo de indução. Vale ressaltar também que os critérios estabelecidos pela ISCT são baseados na BM-MSK e não levam em consideração fatores adicionais como origem tecidual, idade dos doadores e diferentes condições de cultivo que podem alterar o padrão de expressão de marcadores de superfície (PELEKANOS, 2016). No nosso trabalho, foram utilizadas três iPSC (iPS-PBMC 01, iPS-PBMC 02 e iPS-PBMC 03), cada uma proveniente de doadores distintos em sexo e idade. Logo, este fato permite supor que a variabilidade presente nas análises de imunofenotipagem das MSC-like podem ser decorrentes da contribuição genética e epigenética de cada doador assim como suas idades.

Adicionalmente, a análise de aderência ao plástico e avaliação da expressão de marcadores de superfície, as MSC-like foram também avaliadas em relação à capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas. Os adipócitos diferenciados a partir das MSC-like mostraram-se presentes somente em alguns pontos da placa de cultura e produziram vesículas lipídicas menores em comparação a dos adipócitos derivados das UC-MSK. Em relação à diferenciação osteogênica, a linhagem MSC-like 01 demonstrou acúmulos de oxalato de cálcio por toda a placa de cultura em período de apenas 13 dias diferentemente das demais linhagens que mesmo dentro deste período ou um pouco superior a ele mostraram somente diferenciações pontuais. A soma destes resultados sugere que as MSC-like são menos predispostas à diferenciação adipogênica do que à osteogênica.

Resultados similares são relatados em MSC-like provenientes de ESC (BARBERI *et al.*, 2005; BROWN; SQUIRE; LI, 2014) e iPSC (CHEN *et al.*, 2012; HYNES *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2015). Os autores não encontraram motivos claros para justificar o comportamento das MSC-like em relação à diferenciação em linhagens mesodérmicas, mas sim levantaram fatores de influência a serem considerados.

Brown e cols. (2014), apontam a metodologia empregada para a indução ao fenótipo mesenquimal como fator interferente no processo de diferenciação em linhagens mesodérmicas. Os autores relatam que a linhagem H1-ESC foi induzida ao fenótipo mesenquimal por dois métodos distintos, gerando linhagens MSC-like com diferentes capacidades de diferenciação em linhagens mesodérmicas, indicando assim que a metodologia utilizada poderia gerar células em diferentes estágios de comprometimento mesodérmico.

Chen e cols. (2012) ressaltam a influência de parâmetros *in vitro* como o meio de cultura utilizado no cultivo das MSC-like, o meio de cultura e os substratos utilizados no ensaio de diferenciação e que há possibilidade de alteração na expressão do gene DLK-

1/PREF-1 durante o cultivo. Este gene em especial codifica proteínas transmembrana envolvidas na diferenciação de vários tipos celulares, incluindo adipócitos.

Hynes e cols. (2014) propõem que o tecido de origem da iPSC pode influenciar nas características de diferenciação das *MSC-like* em linhagens mesodérmicas. Os autores geraram iPSC a partir de fibroblastos de diferentes tecidos (gengiva, ligamento periodontal e pulmão) e as diferenciaram em *MSC-like*. A verificação da capacidade de diferenciação em osteócitos demonstrou resultados divergentes, sendo que a *MSC-like* proveniente de iPSC geradas de ligamento periodontal apresentou resultados mais proeminentes *in vitro* e *in vivo*. Segundo os autores, há relatos de outros tipos celulares isolados do ligamento periodontal que também apresentaram um fenótipo similar à de um osteoblasto e a capacidade de formar acúmulos de oxalato de cálcio (ARCEO *et al.*, 1991; NOJIMA *et al.*, 1990; SOMERMAN *et al.*, 1988). De acordo com Hynes e cols. (2014), os resultados encontrados por eles e as informações baseadas na literatura, demonstraram que mesmo após a reprogramação celular ao fenótipo pluripotente, há vestígios de memória epigenética do tecido de origem da iPSC e que estas podem influenciar no comportamento das células derivadas da iPSC. Adicionalmente, Kang e cols. (2015) relatam que a metodologia de reprogramação de células somáticas à iPSC também pode ser um fator interferente. Os resultados destes autores mostram que *MSC-like* provenientes de iPSC obtidas pela reprogramação com vetores lentivirais apresentam maior potencial de diferenciação adipogênica do que a outra linhagem derivada de iPSC obtidas pela reprogramação com coquetel de mRNA.

As iPSC (n=3) utilizadas no nosso trabalho foram provenientes do mesmo tipo de células somáticas (PBMC). Além disso, a metodologia de reprogramação das células somáticas ao fenótipo de iPSC foi a mesma para as três amostras de PBMC. Logo, nós acreditamos que a origem do tecido e a metodologia de reprogramação não seriam fatores de influência nos resultados aqui obtidos para diferenciação em adipócitos e osteócitos. É pertinente tomarmos como fatores de influência nos resultados de diferenciação a metodologia de indução ao fenótipo mesenquimal, o protocolo de cultivo das *MSC-like*, a metodologia do ensaio de diferenciação e também os fatores intrínsecos de cada doador de células somáticas.

Por fim, seriam necessárias novas abordagens dentro dos elementos acima listados (metodologia de indução ao fenótipo mesenquimal, as condições de cultivo das *MSC-like*, metodologia do ensaio de diferenciação e fatores intrínsecos de cada doador) para avaliar se há ou não interferência deles na capacidade de diferenciação mesodérmica das *MSC-like*.

Após o processo de caracterização, as *MSC-like* foram comparadas a UC-*MSC* frente a propriedade de proliferação. O tempo de duplicação médio das UC-*MSC* ($30,7 \pm 4,4$ horas) foi aproximadamente duas vezes menor que o das *MSC-like* ($55,3 \pm 10,6$ horas) ao longo de três passagens (neste caso, P5 à P8). O tempo de duplicação médio das UC-*MSC* relatado na literatura é de 21 (SHAER et al., 2014), 24 (LU et al., 2006), 38 (PRATA, 2011), 40 (HAN et al., 2013; LI et al., 2014) a 45 horas (BADOWSKI; MUISE; HARRIS, 2014). E entre as *MSC-like* há relatos de tempo de duplicação de 26 (FROBEL et al., 2014), 53 (LIU et al., 2013a), 58 (BROWN; SQUIRE; LI, 2014), 72 (LIAN et al., 2007), 85 (CHEN et al., 2012) a 120 horas (LIAN et al., 2007). Com exceção do trabalho de Frobel e cols. (2014), a literatura demonstra que as *MSC-like* realmente apresentariam um tempo de duplicação médio maior que as UC-*MSC*.

Como já supracitado, o potencial de proliferação elevado das UC-*MSC* se deve à alta atividade da enzima telomerase (ARUTYUNYAN et al., 2016). Portanto, propõe-se que a disparidade entre a capacidade de proliferação das UC-*MSC* e das *MSC-like* seja em razão da diferença na expressão gênica de TERT e TERC, genes responsáveis por codificar as proteínas componentes da telomerase.

As iPSC são descritas como células com altos níveis de expressão de TERT e alta atividade da enzima telomerase (MARIÓN; BLASCO, 2010) e ao que tudo indica a indução a indução ao fenótipo mesenquimal alterou estas particularidades gerando *MSC-like* com menor potencial de proliferação. Portanto, complementarmente é necessário a avaliação da expressão do gene TERT e da atividade da telomerase previamente nas iPS-PBMC e pós indução nas *MSC-like*, assim como uma comparação entre as UC-*MSC* e *MSC-like* nestes dois quesitos também para uma comparação entre as duas linhagens.

Além da propriedade de proliferação, neste trabalho também foi avaliada a capacidade de imunomodulação das UC-*MSC* e das *MSC-like*. Os resultados demonstraram que linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ apresentaram proliferação menor que o controle positivo quando co-cultivados com as UC-*MSC*, no entanto, a análise estatística dos resultados demonstrou que esta diferença só foi significativa em relação aos linfócitos T CD8⁺. As UC-*MSC* são descritas como imunomoduladoras (LI et al., 2014) e esperava-se que ambas as populações esta diferença fosse significativa. Ao compararmos o controle positivo de proliferação de linfócitos T CD4⁺ com o controle positivo de T CD8⁺, observou-se respectivamente uma porcentagem abaixo de 40% para T CD4⁺ e mais de 60% para T CD8⁺. Logo, acredita-se que o estímulo com o mitógeno (PHA a 0,5µg/mL) não foi o suficiente para

prover a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e a porcentagem baixa de proliferação decorrente não foi suficiente para criar uma diferença significativa.

Observou-se também que as *MSC-like* não exibiram atividade imunomoduladora sobre a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Estes dados contrariam os relatos de Fu e cols. (2012), Kimbrel e cols. (2014), Fu e cols. (2015), Ng e cols. (2016) e Giuliani e cols. (2017) (FU et al., 2012, 2015; GIULIANI et al., 2011b; KIMBREL et al., 2014; NG et al., 2016). De acordo com Frobel e cols (2014), os protocolos de reprogramação da célula somática à iPSC e a indução da iPSC ao fenótipo mesenquimal são processos que alteram o padrão de metilação do genoma e consequentemente a expressão gênica. Assim, acredita-se que expressão gênica dos genes das *MSC-like* envolvidos no processo de imunomodulação pode ter sido alterada durante os processos anteriormente citados, sendo necessária a avaliação deste parâmetro também futuramente.

Outro fator influente aos nossos resultados seria o número de doadores de PBMC usados no ensaio de imunomodulação, pois aqui foi utilizado as células de apenas um doador. Ng e cols. (2016) relatam que as *MSC-like* geradas por eles foram capazes de conter a proliferação de PBMC de 4 dos 5 doadores utilizados no ensaio de imunomodulação (NG *et al.*, 2016). Isto indica também a necessidade de se aumentar o número de doadores de PBMC para o ensaio de imunomodulação para averiguar com certeza se as *MSC-like* não exibem esta propriedade.

Os nossos resultados, em resumo, demonstraram que a adição de bFGF e o tratamento das placas com gelatina não são fatores influentes na obtenção de células aderentes durante o processo de indução ao fenótipo mesenquimal. Além disso, fatores intrínsecos do doador podem ter sido influentes no perfil imunofenotípico e na capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas das *MSC-like*. Ainda no contexto de diferenciação em linhagens mesodérmicas, adicionalmente a possível influência dos fatores intrínsecos poderiam também serem fatores de influência o método de reprogramação para obtenção de iPSC, o protocolo de indução ao fenótipo mesenquimal e as condições de cultivo das *MSC-like*. A diferença na capacidade proliferativa entre as UC-*MSC* e as *MSC-like* poderia ser atribuída a expressão gênica dos genes responsáveis pela enzima telomerase. Em relação a comparação da capacidade imunomoduladora entre as UC-*MSC* e as *MSC-like*, os resultados indicaram a necessidade da repetição do experimento para melhores conclusões. É necessário que o número de doadores de PBMC seja aumentado, que a população de PBMC seja estimulada adequadamente e também a verificação da expressão de genes responsáveis pelo processo de imunomodulação nas *MSC-like*.

Por fim, acredita-se que o perfil de propriedades biológicas demonstrado pelas MSC-*like* pode ser melhorado com base em uma investigação detalhada dos fatores elencados.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que as *MSC-like* geradas neste trabalho assim como as UC-MSC, foram uma população de células de morfologia fibroblastoide, com aderência ao plástico, baixa porcentagem de células positivas para marcadores hematopoéticos e HLA-DR e com capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos. Contudo, as *MSC-like* apresentaram um perfil imunofenotípico para o marcador CD105 distinto das UC-MSC. Frente ao quesito de proliferação as *MSC-like* apresentaram funcionalidade menor que as UC-MSC. A comparação da capacidade imunomodulatória entre as duas linhagens demonstrou que as UC-MSC foram aptas em conter a proliferação de linfócitos T CD8⁺ mas não de linfócitos T CD4⁺. As *MSC-like* não foram capazes de conter a proliferação de ambas as populações de linfócitos.

Referências

7 REFERÊNCIAS

- ALBESIANO, E. et al. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: Expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3333–3339, 2003.
- ARCEO, N. et al. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. **Journal of periodontology**, v. 62, n. 8, p. 499–503, 1991.
- ARUTYUNYAN, I. et al. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–17, 2016.
- ASAKURA, A.; KOMAKI, M.; RUDNICKI, M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 68, n. 4–5, p. 245–253, 2001.
- BADOWSKI, M.; MUISE, A.; HARRIS, D. T. Mixed effects of long-term frozen storage on cord tissue stem cells. **Cytotherapy**, v. 16, n. 9, p. 1313–1321, 2014.
- BARBERI, T. et al. Derivation of Multipotent Mesenchymal Precursors from Human Embryonic Stem Cells. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 6, p. e161, 2005.
- BERNARDO, M. E.; FIBBE, W. E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 4, p. 392–402, 2013.
- BONGSO, A.; FONG, C.-Y. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem cell reviews**, v. 9, n. 2, p. 226–40, 2013.
- BROWN, P. T.; SQUIRE, M. W.; LI, W.-J. Characterization and evaluation of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells and bone marrow. **Cell and Tissue Research**, v. 358, n. 1, p. 149–164, 2014.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.
- CAMPAGNOLI, C. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first- trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, n. 0006–4971 SB–AIM SB–IM, p. 2396–2402, 2001.
- CAREY, B. W. et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 1, p. 157–162, 2009.
- CHEN, M.-Y. et al. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Experimental hematology**, v. 37, n. 5, p. 629–640, 2009.
- CHEN, Y. S. et al. Small Molecule Mesengenic Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Generate Mesenchymal Stem/Stromal Cells. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, n. 2, p. 83–95, 1 fev. 2012.
- COLLINS, E. et al. Differential Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cells Based on Source of Origin. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 9, p. 4381–4390, 2014.
- COVAS, D. T. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 36, n. 9, p. 1179–83, 2003.
- COVAS, D. T. et al. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. **Experimental cell**

research, v. 309, n. 2, p. 340–4, 2005.

DE LIMA PRATA, K. et al. Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. **Cytotherapy**, v. 14, n. July 2011, p. 1–7, 2012.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DORRONSORO, A. et al. Immunoregulation : Mechanisms of Action and Clinical Applications. v. 2013, 2013.

EGUSA, H. et al. Comparative Analysis of Mouse-Induced Pluripotent Stem Cells and Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation In Vitro. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 18, p. 2156–2169, 2014.

EL OMAR, R. et al. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies? **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 20, n. 5, p. 523–544, 2014.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British journal of haematology**, v. 109, n. 1, p. 235–242, 2000.

FONG, C. Y. et al. Human Wharton's Jelly Stem Cells Have Unique Transcriptome Profiles Compared to Human Embryonic Stem Cells and Other Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2011.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. STROMAL CELLS RESPONSIBLE FOR TRANSFERRING THE MICROENVIRONMENT OF THE HEMOPOIETIC TISSUES. **Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 331–340, abr. 1974.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and tissue kinetics**, v. 3, n. 4, p. 393–403, out. 1970.

FROBEL, J. et al. Epigenetic Rejuvenation of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reports**, v. 3, n. 3, p. 414–422, set. 2014.

FU, Q. L. et al. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells modulate T-cell phenotypes in allergic rhinitis. **Allergy**, v. 67, n. 3, p. 1215–1222, 2012.

FU, X. et al. Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells and Bone Marrow. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 3–4, p. 616–626, fev. 2015.

FUSAKI, N. et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 85, n. 8, p. 348–362, 2009.

GAGE, F. H. [Mammalian neural stem cells]. **Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme**, v. 53, n. 4 Suppl, p. 311–317, 2008.

GAUTHAMAN, K. et al. Extra-embryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 24, n. 2, p. 235–246, 2012.

GIULIANI, M. et al. Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. **Blood**, v. 118, n. 12, p. 3254–3262, 2011a.

GIULIANI, M. et al. Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. **Blood**, v. 118, n. 12, p. 3254–3262, 22 set. 2011b.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625–13630, 2000.

- GUZZO, R. M. et al. Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 2, p. 480–490, 2013.
- HALME, D. G.; KESSLER, D. A. FDA Regulation of Stem-Cell–Based Therapies. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 16, p. 1730–1735, 19 out. 2006.
- HAN, Y.-F. et al. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. **Cytotechnology**, v. 65, n. 51, p. 819–827, 2013.
- HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 1, p. 12, 2011.
- HIMENO, T. et al. Mesenchymal stem cell-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells ameliorate diabetic polyneuropathy in mice. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- HOFFMANN, A. et al. Comparison of in vitro -cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 4, n. 7, p. 524–531, 2016.
- HU, G. et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 10, 2015.
- HU, Y. et al. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 141, n. 5, p. 342–9, 2003.
- HYNES, K. et al. Generation of Functional Mesenchymal Stem Cells from Different Induced Pluripotent Stem Cell Lines. **Stem cells and development**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2014.
- IN 'T ANKER, P. S. et al. Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. **Experimental hematology**, v. 31, n. 10, p. 881–9, 2003a.
- IN 'T ANKER, P. S. et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, v. 102, n. 4, p. 1548–1549, 2003b.
- IN 'T ANKER, P. S. et al. Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1338–1345, 2004.
- JEON, O. H. et al. Human iPSC-derived osteoblasts and osteoclasts together promote bone regeneration in 3D biomaterials. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 26761, 2016.
- JUNG, Y.; BAUER, G.; NOLTA, J. A. Concise review: Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 30, n. 1, p. 42–7, jan. 2012a.
- JUNG, Y.; BAUER, G.; NOLTA, J. A. Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells: Progress Toward Safe Clinical Products. **STEM CELLS**, v. 30, n. 1, p. 42–47, jan. 2012b.
- KANG, R. et al. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 144, 2015.
- KARAHUSEYINOGLU, S. et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. **Stem cells**, v. 25, p. 319–331, 2007.
- KIM, J. B. et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. **Nature**, v. 461, n. 7264, p. 649–643, 2009.

- KIMBREL, E. A. et al. Mesenchymal Stem Cell Population Derived Immunomodulatory and Therapeutic Properties. v. 23, n. 14, p. 1611–1624, 2014.
- KOBOLAK, J. et al. Mesenchymal stem cells: identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro engineering of their niche. **Methods (San Diego, Calif.)**, p. (in press), 2015.
- KOBOLAK, J. et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods**, v. 99, p. 62–68, abr. 2016.
- LEE, W. et al. **Maintenance of human pluripotent stem cells using mTeSRTM1** Stem Cell Research. **Anais...** 2011 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2011.05.004>>
- LI, X. et al. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. **International Journal of Molecular Medicine**, p. 695–704, 25 jun. 2014.
- LIAN, Q. et al. Derivation of Clinically Compliant MSCs from CD105+, CD24– Differentiated Human ESCs. **Stem Cells**, v. 25, n. 2, p. 425–436, 2007.
- LIAN, Q. et al. Functional Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells Attenuate Limb Ischemia in Mice. **Circulation**, v. 121, n. 9, p. 1113–1123, 2010.
- LIU, G.-H. et al. Modelling Fanconi anemia pathogenesis and therapeutics using integration-free patient-derived iPSCs. **Nature communications**, v. 5, p. 4330, 2014.
- LIU, J. et al. Reprogramming of mesenchymal stem cells derived from iPSCs seeded on biofunctionalized calcium phosphate scaffold for bone engineering. **Biomaterials**, v. 34, n. 32, p. 7862–7872, 2013a.
- LIU, J. et al. Reprogramming of mesenchymal stem cells derived from iPSCs seeded on biofunctionalized calcium phosphate scaffold for bone engineering. **Biomaterials**, v. 34, n. 32, p. 7862–7872, out. 2013b.
- LIU, L. et al. Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v. 294, n. 1, p. 1–8, 2004.
- LU, L. et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. **Haematologica**, v. 91, p. 1017–1026, 2006.
- MARIÓN, R. M.; BLASCO, M. A. Telomeres And Telomerase in Adult Stem Cells and Pluripotent Embryonic Stem Cells. In: **Stem Cells**. [s.l: s.n.]. p. 118–131.
- MATHON, N. F.; LLOYD, A. C. Milestones in Cell Division Cell Senescence and Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 3, p. 203–213, 2001.
- MATTAR, P.; BIEBACK, K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. November, p. 1–8, 2015.
- MCELREAVEY, K. D. et al. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, n. 1, p. 29S–29S, 1 fev. 1991.
- MEIRELLES, L. D. S. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n. 5–6, p. 419–27, 2009.
- MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive

- therapeutics for regenerative medicine. **Experimental & molecular medicine**, v. 45, n. 11, p. e54, 2013.
- NG, J. et al. Immunomodulatory Properties of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 2853, n. May, p. 2844–2853, 2016.
- NOJIMA, N. et al. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. **Journal of Periodontal Research**, v. 25, n. 3, p. 179–185, maio 1990.
- OKITA, K. et al. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 949–953, 7 nov. 2008.
- PALADINO, F. V. et al. Comparison between isolation protocols highlights intrinsic variability of human umbilical cord mesenchymal cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 1, p. 123–136, 2016.
- PICANÇO-CASTRO, V. et al. Pluripotent Reprogramming of Fibroblasts by Lentiviral-mediated Insertion. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 1, 2011.
- PICANÇO-CASTRO, V. et al. Can pluripotent stem cells be used in cell-based therapy? **Cellular reprogramming**, v. 16, n. 2, p. 98–107, 2014.
- RICHARDSON, S. M. et al. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine: Focus on Articular Cartilage and Intervertebral Disc Regeneration. **Methods**, 2015.
- RYAN, J. M. et al. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 2, p. 8, 2005.
- RYU, H.-H. et al. Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fat, Bone Marrow, Wharton's Jelly, and Umbilical Cord Blood for Treating Spinal Cord Injuries in Dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 12, p. 1617–1630, 2012.
- SABAPATHY, V.; KUMAR, S. hiPSC-derived iMSCs: NextGen MSCs as an advanced therapeutically active cell resource for regenerative medicine. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. XX, n. X, p. 1–18, 2016.
- SERAKINCI, N.; GRAAKJAER, J.; KOLVRAA, S. Telomere stability and telomerase in mesenchymal stem cells. **Biochimie**, v. 90, n. 1, p. 33–40, 2008.
- SHAER, A. et al. Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cells derived from placental decidua basalis; umbilical cord wharton's jelly and amniotic membrane. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 30, n. 5, p. 1022–1026, 2014.
- SMITH, A. A glossary for stem-cell biology. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1060–1060, 28 jun. 2006.
- SOMERMAN, M. J. et al. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. **Journal of dental research**, v. 67, n. 1, p. 66–70, 1988.
- SOMMER, C. A. et al. Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. **Stem Cells**, v. 27, n. 3, p. 543–549, 2009.
- SQUILLARO, T.; PELUSO, G.; GALDERISI, U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. PubMed Commons. **Cell Transplantation**, v. 25, p. 829–848, 2016.
- STADTFELD, M. et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, n. 5903, p. 945–9, 7 nov. 2008.
- SYPECKA, J.; SARNOWSKA, A. Mesenchymal cells of umbilical cord and umbilical cord blood as a source of human oligodendrocyte progenitors. **Life Sciences**, v. 139, p. 24–29, 2015.
- TERESA CONCONI, M. Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from

- Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview. **The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal**, v. 4, n. 1, p. 6–20, 2011.
- TRIVANOVIĆ, D. et al. Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. **Life Sciences**, v. 141, p. 61–73, nov. 2015.
- TROYER, D. L.; WEISS, M. L. Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. **Stem Cells**, v. 26, n. 3, p. 591–599, mar. 2008.
- VANGSNESS, C. T.; STERNBERG, H.; HARRIS, L. Umbilical Cord Tissue Offers the Greatest Number of Harvestable Mesenchymal Stem Cells for Research and Clinical Application: A Literature Review of Different Harvest Sites. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 31, n. 9, p. 1836–1843, 2015.
- VILLA-DIAZ, L. G. et al. Derivation of Mesenchymal Stem Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells Cultured on Synthetic Substrates. **STEM CELLS**, v. 30, n. 6, p. 1174–1181, jun. 2012.
- WANG, H.-S. et al. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1330–1337, 2004.
- WARREN, L. et al. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 5, p. 618–630, nov. 2010.
- WOLTJEN, K. et al. Europe PMC Funders Group piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. v. 458, n. 7239, p. 766–770, 2013.
- YAMANAKA, S. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–72, 2007.
- YU et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. **Science (New York, NY)**, v. 318, n. 5858, p. 1917–20, 2007.
- YU, J. et al. Human Induced Pluripotent Stem Cell Free of Vector Transgene Sequences. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 797–801, 2009.
- YUSA, K. et al. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. **Nature methods**, v. 6, n. 5, p. 363–369, 2009.
- ZHANG, Y. et al. Potent Paracrine Effects of human induced Pluripotent Stem Cell- derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Doxorubicin-induced Cardiomyopathy. **Nature Publishing Group**, n. August 2014, p. 1–17, 2015.
- ZHOU, W.; FREED, C. R. Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells**, v. 27, n. 11, p. 2667–2674, 2009.
- ZUK, P. A. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue : Implications for Cell-Based Therapies. v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

Apêndices

8 APÊNDICES

Apêndice 1. Imunofenotipagem – marcadores hematopoéticos. Análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo das células mesenquimais-like (MSC-like) (n=3) (Coluna A1-A3) e em relação a marcadores hematopoéticos (CD14, CD19, CD34 e CD45) (Linha 01-04) utilizando como controle células estromais mesenquimais (UC-MSC) (n=3) (Coluna B1-B3). Os dados representam a porcentagem de células positivas para determinado marcador.

Apêndice 2. Imunofenotipagem – marcadores CD73, CD90, CD105 e HLA-DR. Análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo das células mesenquimais-like (MSC-like) (n=3)

(Coluna C1-C3) e em relação aos marcadores (CD73, CD90, CD105 e HLA-DR) (Linha 05-08) utilizando como controle células estromais mesenquimais (UC-MSC) (n=3) (Coluna D1-D3). Os dados representam a porcentagem de células positivas para determinado marcador.

Anexos

9 ANEXOS

9.1 Comitê de Ética

Anexo 1. Aprovação do projeto de pesquisa no qual foi feito o isolamento e a caracterização de células estromais mesenquimais do cordão umbilical pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), processo nº 11429/2009.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2015

Ofício n° 2281/2015
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado "GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPS) A PARTIR DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE INDIVÍDUOS COM FENÓTIPO DE INTERESSE PARA TRANSFUSÕES SANGÜÍNEAS" - versão 3, de 25/05/2015, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - versão 2, de 10/04/2015, foram analisados pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 410ª Reunião Ordinária, realizada em 22/06/2015 e enquadrados na categoria: **APROVADO**, de acordo o Processo HCRP n° 2038/2015.

Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.

De acordo com Carta Circular n° 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução n° 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

DRª. MARCIA GUTMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
DRª. SIMONE KASHIMA HADDAD (Orientadora)
LUCAS FERIOLI CAELLI
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário - Monte Alegre
14048-900 - Ribeirão Preto - SP
Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
PAA-0002733, PIS-0002106 e Registro PB/CONEP nº 5440
(14) 3632-2224
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo 2. Aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), CAAE 41458915.3.0000.5440 do projeto de pesquisa no qual foram geradas e caracterizadas as iPSC.