

**ISABELLA RODRIGUES FERNANDES**

**Cultura e Caracterização de Células do Trofoblasto  
Extraviloso (TEV) derivado da placenta humana a termo**

**São Paulo**

**2010**

## RESUMO

FERNANDES, I. R. **Cultura e Caracterização de Células do Trofoblasto Extraviloso (TEV) derivado da placenta humana a termo.** [Culture and characterization of extravillous trophoblast cells (EVT) derived from human term placenta]. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A placenta é um anexo embrionário que tem atraído grande interesse como fonte de células-tronco para medicina regenerativa, devido à plasticidade fenotípica de alguns dentre os vários tipos celulares isolados a partir deste tecido. Apesar de terem a mesma origem, não fazem parte do embrião, portanto o uso da placenta como fonte de células embrionárias não provoca debates éticos. Uma característica que vale a pena mencionar, é que a placenta está envolvida na manutenção da tolerância do feto pelo organismo materno, pois contém células que apresentam propriedades imunomoduladoras. Por fim, o tecido placentário é disponibilizado após o parto e é geralmente descartado. Estas características tornam esse tecido de grande interesse para protocolos de terapia celular, tanto que tem surgido bancos de célula-tronco de placenta humana. Alguns trabalhos demonstraram plasticidade de células extraídas da placenta, porém existe ainda a necessidade de se definir melhor a região de coleta e os métodos de extração e isolamento dessas células. Nosso grupo estabeleceu a cultura de células derivadas da região do trofoblasto extraviloso (TEV) de placenta humana a termo, que são as células responsáveis pelos mecanismos de imunotolerância materno-fetal. As células TEV apresentam os marcadores de pluripotência Oct-4 e Nanog, e, portanto, podem reter mesmo extraídas da placenta a termo, alguma plasticidade celular, caracterizando-as como células-tronco. Entretanto, nossa experiência no cultivo destas células mostrou que existem limitações relacionadas ao tempo de cultivo celular e capacidade de proliferação das TEV, que certamente fornece argumentos sólidos para limitar o seu uso em protocolos de terapia celular em medicina regenerativa.

Palavras-chave: Célula placentária. Trofoblasto extraviloso. Placenta a termo. Terapia celular. Célula-tronco.

## ABSTRACT

FERNANDES, I. R. **Culture and characterization of extravillous trophoblast cells (EVT) derived from human term placenta.** [Cultura e Caracterização de Células do Trofoblasto Extraviloso (TEV) derivado da placenta humana a termo]. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The placenta is attached embryo that has attracted great interest as a source of stem cells for regenerative medicine due to phenotypic plasticity of some of the various cell types isolated from this tissue. Despite having the same origin, they are not part of the embryo, so the use of placenta as a source of embryonic cells does not provoke ethical debates. A feature worth mentioning is that the placenta is involved in maintaining tolerance of the fetus by the mother, because it contains cells that have immunomodulatory properties. Finally, the placental tissue is present after birth and is usually discarded. These characteristics make this fabric of great interest for cell therapy protocols, which has emerged both banks of stem cells from human placenta. Some studies have demonstrated plasticity of cells extracted from the placenta, but there is still a need to better define the catchment area and the methods of extraction and isolation of these cells. Our group has established a culture of cells derived from the extravillous trophoblast region (TEV) from human placenta at term, which are the cells responsible for the mechanisms of maternal-fetal immunotolerance. TEV cells have the pluripotency markers Oct-4 and Nanog, and therefore can retain, even extracted from the placenta at term, some cellular plasticity, characterizing them as stem cells. However, our experience in growing these cells showed that there are limitations related to the time of cell culture and proliferation capacity, which certainly provides strong arguments for limiting their use in cell therapy protocols in regenerative medicine. Keywords: Placental Cell. Extravillous trophoblast. Placenta at term. Cell therapy. Stem cell.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um campo em grande expansão dentro da medicina é a chamada medicina regenerativa, cujo objetivo final é basicamente a reconstituição de tecidos com as mesmas funcionalidades originais, ou seja, antes dos danos que sofreram. Pesquisas com células-tronco surgiram com grande peso nesse cenário, visando seu uso em protocolos de terapia celular, principalmente para aquelas doenças cujos tratamentos atuais não são efetivos na prática, não oferecendo prognóstico de cura ao paciente.

Doenças genéticas degenerativas, lesões adquiridas com ou sem necrose de tecido, cujos tecidos perderam suas características e funções originais, são as maiores candidatas da medicina regenerativa. Por conta disso, muitas pesquisas com células-tronco vêm sendo realizadas, tentando caracterizar uma grande variedade de células para que se possa de um modo geral, indicar no futuro qual será a melhor célula para cada patologia.

Em 1908, o russo Alexander Maksimov postulou a presença de células tronco hematopoiéticas. As primeiras aplicações terapêuticas utilizando células-tronco foram feitas com células multipotentes derivadas de tecidos adultos hematopoiéticos em transplantes autólogos ou alogênicos. Atualmente, há diversos estudos utilizando células-tronco e suas aplicabilidades.

Um tipo celular singular da placenta são as células trofoblásticas extravilosas (TEV) da placenta. Essas células expressam em sua membrana celular moléculas do antígeno leucocitário humano de classe I, tipo G (HLA-G), uma molécula pouco polimórfica em humanos, ao invés de expressar os genes clássicos do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), antígeno leucocitário humano de classe I, tipo A (HLA-A) e antígeno leucocitário humano de classe I, tipo B (HLA-B), altamente polimórficos.

Além disso, acredita-se que essas moléculas HLA-G tenham uma importante participação na imunorregulação durante a gestação, impedindo o reconhecimento do feto por parte das células do sistema imune materno. Essas características poderiam conferir as células TEV vantagens para serem usadas em transplantes alogênicos, evitando a rejeição e o uso de medicamentos imunossupressores, o que

muitas vezes provoca inúmeros efeitos colaterais indesejáveis, deixando este tipo de terapia desconfortável para o paciente.

Neste projeto estabelecemos, caracterizamos e verificamos o potencial de sobrevivência e proliferação *in vitro*, das células do trofoblasto extraviloso (TEV) derivado da placenta humana a termo.

## 7 Conclusões

Com a finalização desse trabalho podemos concluir que:

- Foi possível estabelecer o cultivo de células TEV derivadas da placenta humana a termo (37 a 40 semanas de gestação).
- As células TEV mantêm suas características morfológicas e seu padrão de expressão de proteínas encontradas no tecido placentário e quando realizado o cultivo.
- As células TEV e o tecido placentário aparentemente possuem potencial de proliferação celular, porém esse potencial diminui muito e rapidamente quando as células estão fora do organismo, *in vitro*.
- As células TEV são células-tronco, porém não apresentam capacidade proliferativa *in vitro* como outras células-tronco de diferentes origens previamente descritas na literatura, inibindo, portanto seu uso em protocolos de terapia celular aplicados na medicina regenerativa.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular & molecular**, 3 ed., 2000, Rio de Janeiro, ed. Guanabara, p. 384, 385, 378, 379.

ADACHI, K.; SUEMORI, H.; YASUDA, S. Y.; NAKATSUJI, N.; KAWASE, E. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. **Genes Cells**, v. 15, n. 5, p. 455-470, 2010.

ALVES, C.; VEIGA, S.; TORALLES, M. B. P.; LOPES, A. C. L. O papel do complexo principal de histocompatibilidade na fisiologia da gravidez e na patogênese de complicações obstétricas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, n. 4, 2007.

APPS, R.; GARDNER, L.; MOFFETT, A. A critical look at HLA-G. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 7, p. 313-321, 2008.

BENAITREAU, D.; DOS SANTOS, E.; LENEVEU, M. C.; ALFAIDY, N.; FEIGE, J. J.; MAZANCOURT, P.; PECQUERY, R.; DIEUDONNÉ, M. N. Effects in adiponectin on human trophoblast invasion. **Jornal of Endocrinology**, v. 207, p. 45-53, 2010.

BHALLA, A.; STONE, P. R.; LIDDELL, H.; ZANDERIGO, A.; CHAMLEY, L. W. Comparison of the expression of human leukocyte antigen (HLA)-G and HLA-E in the women with normal pregnancy and those with recurrent miscarriage. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 583-589, 2006.

BORLONGAN, C. V.; PAROLINI, O. International Placenta Stem Cell Society: CARGNONI, A.; GIBELLI, L.; TOSINI, A.; SIGNORONI, P. B.; NASSUATO, C.; ARIENTI, D.; ALBERTINI, A.; WENGLER, G. S.; PAROLINI, O. Transplantation of allogenic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis. **Cell Transplantation**, v. 18, n. 4, p. 405-422, 2009.

CARGNONI, A.; GIBELLI, L.; TOSINI, A.; SIGNORONI, P. B.; NASSUATO, C.; ARIENTI, D.; ALBERTINI, A.; WENGLER, G. S.; PAROLINI, O. Transplantation of allogenic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis. **Cell Transplantation**, v. 18, n. 4, p. 405-422, 2009.

CENTRULO, C. L.; CENTRULO, K. J. Placental and pregnancy stem cells. **Stem cell Reviews**, v. 2, p. 79-80, 2006.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, p. 643-655, 2003.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, p. 643-655, 2003.

CHEN, L. J.; HAN, Z. Q.; ZHOU, H.; ZOU, L.; ZOU, P. Inhibition of HLA-G expression via RNAi abolishes resistance of extravillous trophoblast cell line TEV-1 to NK lysis. **Placenta**, v. 31, n.6, p. 519-527, 2010.

EVANGELISTA, M.; SONCINI, M.; PAROLINI, O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? **Cytotechnology**, v. 58, n. 1, p. 33-42, 2008.

FAUZA, D. Amniotic fluid and placental stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 877-891, 2005.

FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI, K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cell**, v. 22, p. 649-658, 2004.

GENNERO, L.; ROSS, M. A.; SPERBER, K.; DENYSENKO, T.; BERNABEI, P.; CALISTI, G. F.; PAPOTTI, M.; CAPPIA, S.; PAGNI, R.; AIMO, G.; MENGOZZI, G.; CAVALLO, G.; REGUZZI, S.; PESCARMONA, G. P.; PONZETTO, A. Pluripotent plasticity of stem cells and liver reproduction. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 3, p. 178-89, 2010.

GIUSTA, M. S.; ANDRADE, H.; SANTOS, A. V.; CASTANHEIRA, P.; LAMANA, L.; PIMENTA, A. M.; GOES, A. M. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue undergoing osteoblast differentiation. **Cytotherapy**, v. 12, n. 4, p. 478-90, 2010.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J. Immunol Methods**, v.119, p. 203-210, 1989.

HATTOR, N.; NISHINO, K.; KO Y. G.; HATTORI N.; OHGANE J.; TANAKA, S.; SHIOTA, K. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17063-9, 2004.



HATTORI, N.; IMAO, Y.; NISHINO, K.; HATTORI, N.; OHGANE, J.; YAGI, S.; TANAKA, S.; SHITA, K. Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cell. **Genes to Cell**, v. 12, p. 387-396, 2007.  
Hence, 1998.

HEMBERG, M.; YANG, W.; NATALE, D.; BROWN, T. L.; DUNK, C.; GERGTT, C. E.; TANAKA, S. Stem cells from fetal membranes -A workshop report. **Placenta**, v. 22, p. S17-S19, 2008.

HVIID, T. V. F. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**. V. 12, n. 3, p. 209-232, 2006.

HWANG, J. H.; SEOK, O. S.; SONG, H. R.; JO, J. Y.; LEE, J. K. HOXC10 as a potencial marker for discriminating between amnion and decidua-derived mesenchymal stem cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 11, n.2; p.269-278, 2009.

JAMES, J. L.; STONE, P.R.; CHAMLEY, L. W. The isolation and characterization of a population of extravillous trophoblast progenitors from first trimester human placenta. **Human Reproduction**, v. 22, n. 8, p. 2111-2119, 2007.

KARAOZ, E.; AYHAN, S.; GACAR, G.; AKSOY, A.; DURUKSU, G.; OKÇU, .A; DEMIRCAN, P. C.; SARIBOYACI, A. E.; KAYMAZ, F.; KASAP, M. Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potencial and ultrastrutural characteristics. **Cytotherapy**, v. 12, n. 3, p. 288-302, 2010.

KLEIN, G. Physiology or Medicine 1980. The Nobel Lectures, p. 374-375, 1980.  
LE BOUTEILLER, P.; BLASCHITZ, A. The functionaly oh HLA-G is emerging. **Immnological Reviews**, v. 16, p. 233-244, 1999.

LE BOUTEILLER, P.; SOLIER, C.; PROLL, P.; AGUERRE-GIRR, M.; FOURNEL, S.; LENFANT, F. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 3, p. 223-233, 1999.

MAGATTI, M.; DE MUNARI, S.; VERTUA, E.; NASSAUTO, C.; ALBERTINI, A.; WENGLER, G. S.; PAROLINI, O. Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. **Cell Transplantation**, v. 18, n. 8, p. 899-914, 2009.

MATIKAINEN, T.; LAINE, J. Placenta – an alternative source of stem cells. **Toxicology and Applied Pharmacology** 207, p. S544-S549, 2005.

MCMASTER, M.; LIBRACH, C. L.; ZHOU, Y.; LIM, J. H.; JANATPOUR, M. J.; DEMARS, R.; KOVATS, S.; DAMSKY, C.; FISHER, S. J. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 3771-3778, 1995.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SAGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cell. **Cell**, v. 113, p. 631-642, 2003.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. Placenta e membranas fetais. In: \_\_\_\_\_ **Embrriologia médica**, ed. Elsevier, 7 ed., 2004, cap.7, p.132-140.

OMI, H.; OKAMOTO, A.; NIKAIDO, T.; MITSUYOSHI, U.; KAWAGUCHI, R.; UMEHARA, N.; SUGIURA, K. Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of E6/E7/hTERT and its transcriptional profile during hypoxia and reoxygenation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 23, p. 423-433, 2009.

PAPPA, K. I.; ANAGNOU, N. P. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? **Regenerative Medicine**, v. 4, n. 3, p. 423-433, 2009.

PAROLINI, P.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P.; BILIC, G.; UHRING, H. J.; EVANGELISTA, E.; HENNERBICHLER, S.; LIU, B.; MAGATTI, M.; MAO, N.; MIKI, T.; MARONGIU, F.; NAKAJIMA, H.; NIKAIDO, T.; PORTMANN-LANZ, B.; SANKAR, V.; SONCINI, M.; STADLER, G.; SURBEK, D.; TAKAHASHI, T.; REDL, H.; SAKURAGAWA, N; WOLBANK, S; ZEISBERGER, S.; ZISCH, A.; STROMG, S. C. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 300–311, 2008.

PIETERNELLA, S.; SCHERJON, S. A.; KEUR, K.; GROOT-SWINHS, G. M. J. S.; CLASS, F. H. J.; FIBBE, W. E.; KANHAI, H. H. H. Isolation of mesenchymal stem cell or maternal origin from human placenta. **Stem cells**, v. 22, p. 1338-1345, 2004. Planting the Seed for Placenta Stem Cell Research. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 5, p. 507-8, 2010.

PORTMANN-LANZ, C. B.; SCHOEBERLEIN, A.; HUBER, A.; SAGER, R.; MALEK, A.; HOLZGREVE, W.; SURBEK, D. V. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous for pre- and perinatal neuroregeneration. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 194, p. 664-673, 2006.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; LEMAULT, J.; CAROSELLA, E. D. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, p. 413-421, 2007.

SEMENOV, O. V.; KOESTENBAUER, S.; RIEGEL, M.; ZECH, N.; ZIMMERMANN, R.; ZISCH, A. H.; MALEK, A. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 202, p. 193.e1-13, 2010.

SHANKARKUMAR, U. The human leukocyte antigen (HLA) system. **International Journal of Human Genetics**, v. 4, n. 2, p. 91-103, 2004.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-76, 2006.

TARRADE, A.; GOFFIN, F.; MUNAUT, C.; LAI-KUEN, R.; TRICOTTET, V.; FOIDART, J.M.; VIDAUD, M.; FRANKENNE, F.; EVAIN-BRION, D. Effect of Matrigel on human extravillous trophoblast differentiation: modulation of pattern gene expression. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1628-1637, 2002.

TARRADE, A.; RENÉ L. K.; MALASSINÉ, A.; TRICOTTET, V.; BLAIN, P.; VIDAUD, V.; EVAIN-BRION, D. Characterization of Human Villous and Extravillous Trophoblasts Isolated from First Trimester Placenta. **Laboratory Investigation**, v. 81, p. 1199-1211, 2001.

WHITNEY, KA. Placental site trophoblastic tumor. **The American Journal of Nursing**, v. 109, n. 12, p. 33-37, 2009.

WONG, C. J.; CASPER, R. F.; ROGERS, J. M. Epigenetic changes to human umbilical cord blood cells cultured with three proteins indicate state. **Experimental Cell Research**, v. 16, n. 6, p. 927-939, 2010.

YU, S. J.; SONCINI, M.; KANEKO, Y.; HESS, D. C.; PAROLINI, O.; BORLONGAN, C. V. Amnion: a potent graft source for cell therapy in stroke. **Cell Transplantation**, v. 18, n. 2, p. 111-118, 2009.

ZAEHRES, H.; KÖGLER, G.; ARAUZO-BRAVO, M. J.; BLEIDISSEL, M.; SANTOURLIDIS, S.; WEINHOLD, S.; GREBER, B.; KIM, J.B.; BUCHHEISER, A.; LIEDTKE, S.; EILKEN, H. M.; GRAFFMANN, N.; ZHAO, X.; MEYER, J.; REINHARDT, P.; BURR, B.; WACLAWCZYK, S.; ORTMEIER, C.; UHRBERG, M.; SCHÖLER, H. R.; CANTZ, T.; WERNET, P. Induction of pluripotency in human cord blood unrestricted somatic stem cells. **Experimental Hematology**, v. 38, n. 9, p. 809-18, e. 818.e1-2, 2010.

ZHAO, H. X.; LI, Y.; JIN, H.F.; XIE, L.; LIU, C.; JIANG, F.; LUO, Y. N.; YIN, G.W.; LI, Y.; WANG, J.; LI, L. S.; YAO, Y .Q.; WANG, X. H. Rapid and efficient reprogramming of human amnion-derived cells into pluripotency by three factors OCT4/SOX2/NANOG. **Differentiation**.v.80, n. 2-3, p.123-9, 2010.