

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PAULA HANSEN SUSS**

**ESTUDO *IN VIVO* DA CAPACIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
E CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS PROVENIENTES DO CORDÃO E  
DO SANGUE UMBILICAL HUMANO NA MELHORA FUNCIONAL E PRÓ-  
ANGIOGÊNICA NO TRATAMENTO DA MIOCARDIOPATIA ISQUÊMICA**

**CURITIBA**

**2012**

**PAULA HANSEN SUSS**

**ESTUDO *IN VIVO* DA CAPACIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
E CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS PROVENIENTES DO CORDÃO E  
DO SANGUE UMBILICAL HUMANO NA MELHORA FUNCIONAL E PRÓ-  
ANGIOGÊNICA NO TRATAMENTO DA MIOCARDIOPATIA ISQUÊMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde da Pontifícia  
Universidade Católica do Paraná, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo R. S. Brofman  
Co-Orientador: Prof. Dr. Alejandro Correa  
Dominguez

**CURITIBA**

**2012**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

Aos dez dias do mês de agosto de 2012, realizou-se a sessão pública de defesa de tese "ESTUDO *IN VIVO* DA CAPACIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS PROVENIENTES DO CORDÃO E DO SANGUE UMBILICAL HUMANO NA MELHORA FUNCIONAL E PRÓ-ANGIOGÊNICA NO TRATAMENTO DA MIOCARDIOPATIA ISQUÊMICA" apresentada por PAULA HANSEN SUSS para obtenção do título de doutora; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman (PUCPR) - Presidente	
Prof. Dr. Fabio Rueda Faucz PUCPR	
Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague PUCPR	
Prof. Dr. Marco Augusto Stimamiglio (ICC FIOCRUZ)	
Profª. Drª. Patrícia Rieken Macedo Rocco (UFRJ)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman      Conceito: Aprovado  
Prof. Dr. Fabio Rueda Faucz              Conceito: Aprovado  
Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague            Conceito: Aprovado  
Prof. Dr. Marco Augusto Stimamiglio    Conceito: Aprovado  
Profª. Drª. Patrícia Rieken Macedo Rocco    Conceito: Aprovado  
Conceito Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman  
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho  
Coordenador do PPGCS PUCPR

**Dedico esta tese a Samuel Ieger Suss.**

## **AGRADECIMENTOS**

À PUCPR, por permitir o desenvolvimento deste trabalho e por fornecer uma excelente infraestrutura que possibilitou a realização de diversos experimentos.

Ao Professor Dr. Paulo Roberto Slud Brofman, por ter me aceitado como orientanda e por garantir todas as condições para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Alejandro Correa Dominguez, pela orientação como meu co-orientador e, principalmente, por me ajudar a concretizar e conquistar mais uma fase de minha vida.

À Alexandra Cristina Senegaglia e Carmen Lúcia Kunyoshi Rebelatto, que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio, tornando possível a realização deste projeto.

À Fabiane Barchiki, Luiz Guilherme Capriglione e Lye Miyague, que tornaram os dias cansativos de experimento muito mais divertidos e com os quais eu pude contar sempre.

Ao trio Danielle Jackowski, Letícia Fracaro e Lidiane Leite, que participou diretamente deste trabalho e me ajudou em todos os momentos.

À Francieli Mognon, um agradecimento especial por sua amizade e exemplo de profissionalismo.

À Valderez Ravaglio Jamur (Duca), por sua valiosa contribuição nos experimentos de FISH e pelos momentos divertidos.

A todos os estagiários, que passaram pelo Laboratório Experimental de Cultivo Celular e que trabalharam direta ou indiretamente neste projeto.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR, em especial a Andressa Vaz Schittini, pelo acolhimento, ajuda e participação no presente trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Márcia Olandoski, pelo auxílio, atenção e, principalmente, pelas importantes contribuições na análise estatística.

À Ana Paula Camargo Martins e Marina Viola Azevedo do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Lúcia Noronha, pela ajuda na histopatologia e por me auxiliarem nas análises com a maior disposição.

Aos amigos Eduardo Discher Vieira e João Gabriel Roderjan Mendonça, por me fornecerem segurança e amizade durante todos estes anos de convívio.

À equipe do Biotério da PUCPR, em especial, ao Rafael Zotz pelo auxílio nos cuidados com os animais.

À equipe do Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia da PUCPR, em especial ao Álvaro Roberto Gonçalves Machado e Misael Gomes Barbosa, pela colaboração nos experimentos cirúrgicos.

Ao Hospital e Maternidade Victor Ferreira do Amaral, por permitir a entrada da equipe para realizar a coleta dos cordões.

Às doadoras, que num gesto de amor permitiram a realização deste trabalho.

Aos animais experimentais que foram sacrificados para que esse estudo pudesse ser desenvolvido.

Às agências de fomento CNPq e Fundação Araucária pelos financiamentos concedidos, imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seu inestimável apoio em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!

Quando você se lança numa jornada e o fim parece cada vez mais distante, então você percebe que o verdadeiro fim é o percurso.

KARLFRIED GRAF DÜRCKHEIM

## RESUMO

**Introdução:** Tendo em vista que as doenças cardiovasculares constituem uma importante causa de morbi-mortalidade, se faz necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na tentativa de diminuir o imenso impacto social e econômico. Neste sentido a terapia celular tem demonstrado resultados promissores em estudos pré-clínicos e clínicos. As células progenitoras endoteliais (CPE) e as células-tronco mesenquimais (CTM) têm se mostrado importantes reguladoras no processo de reparo tecidual, na formação de novos vasos e na regeneração de regiões isquêmicas. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito do transplante das CPE derivadas do sangue de cordão umbilical humano, das CTM derivadas da geléia de Wharton e a associação destes dois tipos celulares no tratamento do modelo experimental de miocardiopatia isquêmica (MI) em ratos. **Metodologia:** Os procedimentos foram realizados com a aprovação do comitê de ética da PUCPR. Foram utilizados ratos Wistar (300-350 g) para desenvolver o modelo experimental da MI e do transplante celular. Foi realizada a ligadura da artéria coronária esquerda e 7 dias após a indução da MI foi realizada a análise ecocardiográfica. Os animais com fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE)  $\leq$  40% foram selecionados para o estudo. No nono dia após a indução da MI os animais foram randomizados entre os grupos experimentais e foram injetados com uma das seguintes condições em 200 $\mu$ L de meio: (1)  $2 \times 10^6$  CTM; (2)  $2 \times 10^6$  CPE; (3)  $1 \times 10^6$  CTM +  $1 \times 10^6$  CPE; ou (4) meio (controle) . Depois de 30 dias pós-transplante foi realizada análise ecocardiográfica seguida por eutanásia. Avaliações histológicas foram realizadas por meio das colorações de Hematoxilina e Eosina, tricrômico de Masson e Picrossírius Red. A localização de células humanas foi feita pela metodologia de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) em cortes parafinados do coração dos ratos e foi realizada a quantificação da expressão de proteínas angiogênicas humanas no sangue periférico dos ratos. **Resultados:** Os grupos de ratos que receberam a terapia celular apresentaram um aumento do nível de proteínas angiogênicas humanas no sangue periférico, houve menor deposição de colágeno nos tecidos cardíacos e uma melhoria global da função cardíaca. Ao analisar comparativamente os valores das médias da FEVE nos grupos antes e após o transplante observa-se boa correlação na melhora da FEVE entre os grupos que receberam a terapia celular. Pequenas quantidades das células transplantadas foram detectadas no tecido cardíaco por FISH. **Conclusão:** Estes resultados sugerem que a terapia celular é importante na atenuação da progressão da disfunção ventricular esquerda após a MI. CPE derivadas do sangue de cordão umbilical humano e as CTM derivadas da geléia de Wharton podem representar uma promissora fonte celular para a cardiomioplastia celular e uma estratégia terapêutica eficaz na melhora da função cardíaca após a MI.

**Palavras-chave:** Cordão umbilical. Sangue de cordão umbilical. Geleia de Wharton. Célula-tronco mesenquimal. Célula progenitora endotelial. Infarto do miocárdio.



## ABSTRACT

**Introduction:** Given that cardiovascular disease constitutes an important cause of morbidity and mortality, it is necessary to develop new therapeutic strategies in an attempt to reduce the immense social and economic impact. Cell therapy has shown promising results in several preclinical studies and clinical trials. Endothelial progenitor cells (EPC) and mesenchymal stem cells (MSC) have been shown to be important in regulating the tissue repair process, the formation of new vessels, and regeneration of ischemic regions. **Objective:** The aim of this study was to compare the effect of transplantation of human umbilical cord blood-derived EPC, human Wharton's jelly-derived MSC and the combination of these two cell types in the treatment of ischemic cardiomyopathy (IC) in a rat model. **Methodology:** Animal procedures were performed with the approval of the PUCPR Animal Care Committee. Wistar rats (300-350 g) were used for the infarction and cell transplantation model. Left coronary artery ligation procedures were performed and baseline echocardiography was performed 7 days after IC induction. The animals with left ventricular ejection fraction (LVEF)  $\leq 40\%$  were selected for the study. On the ninth day after induced IC, animals were randomized into experimental groups and injected with one of the following medium: (1)  $2 \times 10^6$  MSC; (2)  $2 \times 10^6$  EPC; (3)  $1 \times 10^6$  MSC plus  $1 \times 10^6$  EPC; or (4) medium only (control). Thirty days after treatment, an echocardiographic analysis of rat hearts was performed followed by euthanasia. Histologic assessments were performed by hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, and picrossirius red staining. Localization of human cells in paraffin-embedded sections of rat heart tissue was done by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and quantification of angiogenic growth factor protein-expression levels in the peripheral rat blood was performed. **Results:** The groups that received cell therapy presented increased levels of human angiogenic growth factors in peripheral blood less collagen deposition in heart tissue, and an improved myocardial function. Upon comparative analysis between the mean LVEF values for the groups before and after transplant, we observed an improvement in cardiac function (increase in LVEF) among the groups given cell therapy. In addition, low quantities of transplanted cells were detected in myocardial tissue by FISH. **Conclusion:** These results suggest that cellular therapy is important in attenuating the progression of left ventricular dysfunction after IC. Human umbilical cord blood-derived EPC and human Wharton's jelly-derived MSC may represent promising cell sources for cellular cardiomyoplasty and an effective therapeutic strategy for improving cardiac function in IC.

**Key-words:** Human umbilical cord. Human umbilical cord blood. Wharton's jelly. Mesenchymal stem cells. Endothelial progenitor cells. Acute myocardial infarction.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Taxas de mortalidade por doença isquêmica do coração para população adulta de 20 a 74 anos, Brasil e regiões, 1990 e 2006. ....	23
Figura 2 – Propriedades das células-tronco: auto-renovação e capacidade de diferenciação.....	27
Figura 3 – Plasticidade das Células-Tronco.....	28
Figura 4 – História resumida das células-tronco mesenquimais. ....	31
Figura 5 – Caracterização das CPE precoces e tardias por marcadores de superfície celular.....	38
Figura 6 – Esquema retratando o potencial de origem e diferenciação das células progenitoras endoteliais a partir de células-tronco hematopoéticas e células não hematopoéticas. ....	39
Figura 7 – Estrutura do cordão umbilical: composto por duas artérias, uma veia cercada pela geléia de Wharton e pelo epitélio amniótico. ....	45
Figura 8 – Representação esquemática dos protocolos utilizados para a obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical.....	47
Figura 9 – Principais etapas da coleta de sangue do cordão umbilical e placentário. ....	55
Figura 10 – Ilustração das principais etapas do isolamento de CMO provenientes do SCUh.....	56
Figura 11 – Ilustração das principais etapas do isolamento das células CD133 <sup>+</sup> provenientes do SCUh. ....	58
Figura 12 – Ilustração das principais etapas do isolamento de CTM provenientes da GW.....	60
Figura 13 – Fluxograma da composição dos grupos.....	68
Figura 14 – Fluxograma dos ensaios pré-clínicos.....	68
Figura 15 – Principais etapas da indução da miocardiopatia isquêmica. ....	70
Figura 16 – Análise ecocardiográfica. ....	72
Figura 17 – Principais etapas do transplante. ....	73
Figura 18 – Eutanásia por perfusão transcardíaca.....	75
Figura 19 – Blocos de parafina contendo os fragmentos do coração.....	77
Figura 20 – Principais etapas da metodologia de arranjo de anticorpos. ....	82

Figura 21 – Fotomicrografia de contraste de fase da cultura primária de CPE derivadas do SCUh. ....	87
Figura 22 – Fotomicrografia de contraste de fase da cultura primária de células-tronco mesenquimais derivadas da geleia de Wharton do CUh.....	88
Figura 23 – Imunofluorescência indireta com dupla marcação para vWF e CD31 de células progenitoras endoteliais de sangue de cordão umbilical humano em cultura. ....	92
Figura 24 – Imunofluorescência indireta com dupla marcação de células progenitoras endoteliais de sangue de cordão umbilical humano em cultura. ....	93
Figura 25 – Dupla marcação positiva CPE para UEA-1-FITC e Dil-acLDL. ....	94
Figura 26 – Imunofluorescência indireta para vimentina e CD105 de CTM em cultura. ....	95
Figura 27 – Ensaio de Diferenciação Adipogênica, Osteogênica e Condrogênica..	96
Figura 28 – Ensaio de formação de túbulos capilares. Barra da escala= 500µm.....	97
Figura 29 – Organograma do comportamento dos animais no estudo.....	100
Figura 30 – Demonstração histológica da espessura da cicatriz do ventrículo esquerdo após alterações morfológico-estruturais que ocorrem após 30 dias do infarto corados em HE.....	102
Figura 31 – Secções histológicas da região do ventrículo esquerdo de corações de ratos obtidas 30 dias após o transplante coradas por HE. ....	103
Figura 32 – Cortes histológicos na região do ventrículo esquerdo corados por tricrômio de Masson. ....	104
Figura 33 – Fotomicrografias de corte histológico do ventrículo esquerdo corado por Picrossírius red.....	109
Figura 34 – Localização das células transplantadas por hibridização <i>in situ</i> por fluorescência.....	112
Figura 35 – Citocinas e fatores de crescimento presentes no sangue periférico humano e de rato sadio.....	113
Figura 36 – Citocinas e fatores de crescimento presentes no sangue periférico dos animais transplantados .....	113
Figura 37 – Mapa da membrana de arranjo de anticorpos das citocinas e fatores de crescimento.....	114

Gráfico 1 – Quantificação por amostra da expressão em percentual de moléculas presentes nas CTM da GW por imunofenotipagem. ....	90
Gráfico 2 – Quantificação média da expressão em percentual de moléculas presentes nas CTM da GW por imunofenotipagem. ....	90
Gráfico 3 – Quantificação por amostra da expressão em percentual de moléculas presentes nas CPE por imunofenotipagem.....	91
Gráfico 4 – Quantificação média da expressão em percentual de moléculas presentes nas CPE por imunofenotipagem.....	91
Gráfico 5 – Percentual de colágeno e de tecido sadio nos diferentes grupos corado em tricrômio de Masson. ....	106
Gráfico 6 – Valores expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos nos diferentes grupos.....	106
Gráfico 7 – Percentual de colágeno e de tecido sadio nos diferentes grupos corado em Picrossírius red analisado em campo claro.....	108
Gráfico 8 – Percentual dos diferentes tipos de colágeno nos diferentes grupos corado em Picrossírius red analisado em luz polarizada. ....	111
Gráfico 9 - Valores expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos nos diferentes grupos.....	111
Gráfico 10 – Média da área diastólica final pré e pós-transplante dentro de cada grupo.....	119
Gráfico 11 – Média do volume diastólico final pré e pós-transplante dentro de cada grupo.....	120
Gráfico 12 – Média da área sistólica final pré e pós-transplante dentro de cada grupo.....	121
Gráfico 13 – Média do volume sistólico final pré e pós-transplante dentro de cada grupo.....	122
Gráfico 14 – Média da fração de ejeção pré e pós-transplante dentro de cada grupo.....	123

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características utilizadas na identificação das células progenitoras endoteliais.....	36
Tabela 2 – Características das diferentes metodologias de isolamento das CTM provenientes da GW.....	46
Tabela 3 – Anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica das CTM. ....	62
Tabela 4 – Anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica das CPE.....	62
Tabela 5 – Relação dos anticorpos utilizados em ensaios de imunofluorescência indireta das CPE e CTM.....	64
Tabela 6 – Relação da medicação utilizada nos procedimentos de indução da miocardiopatia isquêmica, ecocardiografia pré e pós-transplante, transplante e eutanásia.....	76
Tabela 7 – Dados da coleta de CUh e SCUh.....	83
Tabela 8 – Dados dos isolamentos de células mononucleares provenientes do SCUh.....	84
Tabela 9 – Dados dos isolamentos de células 133 <sup>+</sup> provenientes do SCUh.....	85
Tabela 10 – Análise da correlação das variáveis do isolamento das células provenientes do SCUh. ....	85
Tabela 11 – Dados dos isolamentos de CTM provenientes do CUh.....	86
Tabela 12 – Análise da correlação das variáveis do isolamento das células provenientes do CUh.....	86
Tabela 13 – Perfil imunofenotípico das CTM da GW analisado por citometria de fluxo.....	89
Tabela 14 – Perfil imunofenotípico das CPE do SCUh analisado por citometria de fluxo.....	89
Tabela 15 – Média das variáveis ecocardiográficas no 7 <sup>o</sup> dia após indução da MI...98	
Tabela 16 – Média das variáveis ecocardiográficas no 30 <sup>o</sup> dia após o transplante. .99	
Tabela 17 – Taxa de mortalidade nos diferentes grupos após o transplante. ....	101
Tabela 18 – Estudo de correlações feito entre os grupos. ....	101
Tabela 19 – Comparação do percentual de mortalidade do grupo controle com os grupos que receberam o transplante celular. ....	101
Tabela 20 – Valores medianos do percentual de colágeno e de tecido sadio nos diferentes grupos corado por Tricrômio de Masson. ....	105

Tabela 21 – Valores de p da comparação dois a dois entre os quatro grupos experimentais.....	105
Tabela 22 – Valores medianos do percentual de colágeno e de tecido sadio por Picrossírius red em campo claro. ....	107
Tabela 23 – Comparação entre os grupos dos valores de p para o percentual de colágeno e tecido sadio por Picrossírius red em campo claro.....	108
Tabela 24 – Valores do percentual de colágeno vermelho, amarelo e verde por Picrossírius red analisado em luz polarizada. ....	110
Tabela 25 – Comparação dos valores de p do percentual de colágeno vermelho, amarelo e verde por Picrossírius red analisado em luz polarizada. ....	110
Tabela 26 – Valores da média de expressão das citocinas e fatores de crescimento humanos presentes no sangue periférico dos animais nos diferentes grupos experimentais.....	114
Tabela 27 – Coeficiente da expressão das citocinas e fatores de crescimento humanos presentes no sangue periférico dos animais nos diferentes grupos. ....	115
Tabela 28 – Análise estatística dos parâmetros ecocardiográficos dos grupos CPE+CTM, CTM, CPE e Tx Meio. ....	116
Tabela 29 – Comparação das variáveis ecocardiográficas que apresentaram valor de $p < 0,05$ .....	118
Tabela 30 – Comparação entre os valores da área diastólica final pré e pós-transplante dentro de cada grupo.....	119
Tabela 31 – Comparação entre os valores do volume diastólico final pré e pós-transplante dentro de cada grupo.....	120
Tabela 32 – Comparação entre os valores da área sistólica final pré e pós-transplante dentro de cada grupo.....	121
Tabela 33 – Comparação entre os valores do volume sistólico final pré e pós-transplante dentro de cada grupo.....	122
Tabela 34 – Comparação entre os valores da fração de ejeção pré e pós dentro de cada grupo. ....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µg/kg	Micrograma por kilograma
µL	Microlitro
7AAD	7-amino-actinomicina D
Ac	Anticorpo
AcMo	Anticorpo Monoclonal
ADFVE	Área diastólica final do ventrículo esquerdo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Aloficocianina (do inglês <i>allophycocyanin</i> )
ASFVE	Área sistólica final do ventrículo esquerdo
ATB	Antibiótico
BSA	Albumina de soro bovino (do Inglês <i>Bovine serum albumin</i> )
CD	Grupos de Diferenciação Celular (do inglês <i>cluster of differentiation</i> )
CD 105	Endogлина
CD 106	Molécula de Adesão Vascular
CD 117	Proteína tirosina quinase Kit
CD 133	Prominina-1
CD 14	Marcador de monocito
CD 144	VE-Caderina
CD 146	Molécula de adesão celular associada a melanoma
CD 166	Molécula de adesão de leucócito ativado
CD 19	Antígeno linfocitário-B
CD 201	Receptor de Proteína C Ativada
CD 235a	Glicoforina A
CD 29	Integrina beta-1
CD 309	Receptor para o fator de crescimento endotelial vascular -2
CD 31	Molécula de Adesão plaquetária/endotelial
CD 34	Antígeno CD34
CD 44	Antígeno Pgp-1
CD 45	Antígeno leucocitário comum
CD 73	Ecto-5'-nucleotidase

CD 90	Antígeno de superfície celular Thy-1
CE	Células Endoteliais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFU-F	unidades formadoras de colônias fibroblásticas (do Inglês <i>colony forming units-fibroblast</i> )
cm <sup>2</sup>	Centímetro Quadrado
CMO	Células Mononucleares
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPE	Célula Progenitora Endotelial
CPEC	Células progenitoras endoteliais circulantes
CT	Célula-Tronco
CTA	Célula-Tronco Adulta
CTE	Células-Tronco Embrionárias
CTH	Célula-Tronco Hematopoética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CUh	Cordão Umbilical Humano
D123	Proteína do ciclo de divisão celular (do inglês <i>Cell division cycle protein 123</i> )
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenilindol (do inglês <i>4'-6-Diamidino-2-phenylindole</i> )
DCV	Doenças Cardiovasculares
Dil-acLDL	Lipoproteína de baixa densidade acetilada marcada com 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (do inglês <i>1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-labelled acetylated low-density lipoprotein</i> )
ECG	Eletrcardiograma
EDTA	Acido Etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
FE	Fração de ejeção
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (do Inglês <i>fluorescence in situ hybridization</i> )
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína (do Inglês <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )



g	Força centrífuga
GVHD	Doença do enxerto contra o hospedeiro (do Inglês <i>graft-versus-host disease</i> )
GW	Geleia de Wharton
H	Hora
HE	Hematoxilina e Eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (do Inglês <i>Hepatocyte growth factor</i> )
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano (do Inglês <i>major histocompatibility complex, class II, DR</i> )
HLA-G	Antígeno leucocitário humano G (do Inglês <i>human leukocyte antigen G</i> )
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina (do Inglês <i>insulin-like growth factor-I</i> )
IgG	Imunoglobulina G
IMDM	Meio de Dulbecco modificado por Iscove's (do Inglês <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> )
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (do Inglês <i>Low Density Lipoproteins</i> )
LDL-ox	Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (do Inglês <i>oxidized low density lipoprotein</i> )
M	Molaridade
MCP-2	Proteína quimiotática de monócito 2 (do Inglês <i>Monocyte Chemotactic Protein-2</i> )
MCP-3	Proteína quimiotática de monócito 3 (do Inglês <i>Monocyte Chemotactic Protein-3</i> )
mg/kg	miligrama por quilograma
min.	Minuto(s)
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
Oct-4	Octâmero-4 (do Inglês <i>Octamer-4</i> )
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Valor de p

PBS	Tampão fosfato salina (do Inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
PE	Ficoeritrina (do Inglês <i>Phycoerythrin</i> )
PerCP	Complexo Proteína Clorofila Peridina (do Inglês <i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i> )
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial Hidrogeniônico
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Rotação por minuto
SBF	Soro bovino fetal
Sca-1	Antígeno 1 de células-tronco (do Inglês <i>Stem Cells Antigen-1</i> )
SCUh	Sangue de cordão umbilical humano
SDF-1	Fator derivado do estroma da medula óssea (do Inglês <i>stromal cell-derived factor-1</i> )
SP	Sangue Periférico
SSC	Solução salina sódio-citrato (do Inglês <i>saline-sodium citrate</i> )
SSEA-4	Antígeno embrionário estágio específico 4 (do Inglês <i>Stage-specific embryonic antigen 4</i> )
TA	Tecido Adiposo
Tx	Transplante
UEA-1-FITC	Aglutinina <i>Ulex Europeus</i> tipo 1 conjugada com isotiocianato de fluoresceína (do inglês <i>FITC-labeled Ulex europaeus agglutinin I</i> ).
VDFVE	Volume diastólico final do ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (do Inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
VSFVE	Volume sistólico final do ventrículo esquerdo
vWF	Fator de von Willebrand (do Inglês <i>von Willebrand Factor</i> )
y1	Controle isotópico conjugado com FITC
y2	Controle isotópico conjugado com PE
y3	Controle isotópico conjugado com PerCP
y4	Controle isotópico conjugado com APC

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	22
1.2 INFARTO DO MIOCÁRDIO E TERAPIA CELULAR .....	23
1.3 CÉLULAS-TRONCO .....	26
1.4 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS .....	28
<b>1.4.1 Células-Tronco Mesenquimais .....</b>	<b>29</b>
<b>1.4.2 Células Progenitoras Endoteliais .....</b>	<b>35</b>
1.5 MODELO EXPERIMENTAL.....	42
<b>1.5.1 Terapia celular em modelos experimentais utilizando CTM e CPE .....</b>	<b>43</b>
1.6 CORDÃO UMBILICAL .....	44
<b>1.6.1 Terapia Celular com Sangue de Cordão Umbilical .....</b>	<b>47</b>
1.7 FONTES CELULARES ALTERNATIVAS PRESENTES NO SANGUE E NO CORDÃO UMBILICAL.....	48
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>51</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
<b>4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS .....</b>	<b>53</b>
4.1 LOCAL DO ESTUDO.....	53
4.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	53
4.3 OBTENÇÃO DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO HUMANO.....	53
<b>4.3.1 Critérios de inclusão .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3.2 Critérios de exclusão.....</b>	<b>54</b>
4.4 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO HUMANO.....	56
4.5 PURIFICAÇÃO DE CPE OBTIDAS DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO HUMANO .....	56
<b>4.5.1 Cultivo de CPE .....</b>	<b>58</b>
<b>4.5.2 Manutenção do cultivo de CPE .....</b>	<b>58</b>
<b>4.5.3 Dissociação de CPE .....</b>	<b>59</b>

4.6 ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA GELÉIA DE WHARTON PROVENIENTES DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO.....	59
<b>4.6.1 Manutenção do cultivo de CTM.....</b>	<b>60</b>
<b>4.6.2 Dissociação de CTM.....</b>	<b>60</b>
4.7 CARACTERIZAÇÃO CELULAR.....	61
<b>4.7.1 Análises morfológicas.....</b>	<b>61</b>
<b>4.7.2 Imunofenotipagem.....</b>	<b>61</b>
<b>4.7.3 Imunofluorescência indireta.....</b>	<b>62</b>
<b>4.7.4 Dupla marcação fluorescente direta de CPE com UEA-1-FITC e DIL-AC-LDL.....</b>	<b>64</b>
4.8 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL.....	65
<b>4.8.1 Ensaios de diferenciação adipogênica e osteogênica.....</b>	<b>65</b>
<b>4.8.2 Ensaio de diferenciação condrogênica.....</b>	<b>65</b>
<b>4.8.3 Ensaio de formação de túbulos capilares <i>in vitro</i>.....</b>	<b>66</b>
4.9 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS.....	66
<b>4.9.1 Aspectos éticos nos cuidados com animais.....</b>	<b>66</b>
<b>4.9.2 Desenho experimental.....</b>	<b>67</b>
<b>4.9.3 Indução da miocardiopatia isquêmica.....</b>	<b>68</b>
<b>4.9.4 Avaliação por ecocardiografia da função cardíaca após a indução da miocardiopatia isquêmica.....</b>	<b>71</b>
<b>4.9.5 Transplante de células.....</b>	<b>72</b>
<b>4.9.6 Avaliação por ecocardiografia da função cardíaca após o transplante...74</b>	<b>74</b>
<b>4.9.7 Eutanásia.....</b>	<b>74</b>
4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	77
<b>4.10.1 Hematoxilina-Eosina.....</b>	<b>77</b>
<b>4.10.2 Tricrômio de Masson.....</b>	<b>78</b>
<b>4.10.3 Picrossírius red.....</b>	<b>78</b>
4.11 LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRANSPLANTADAS POR HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> POR FLUORESCÊNCIA.....	79
4.12 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS ANGIOGÊNICAS NO SANGUE PERIFÉRICO POR ARRANJOS DE ANTICORPOS.....	80
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	82
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
<b>5.1 COLETA DE SANGUE E CORDÃO UMBILICAL HUMANO.....</b>	<b>83</b>

5.2 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES PROVENIENTES DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO.....	84
5.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS PROVENIENTES DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO .....	85
5.4 ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA GELÉIA DE WHARTON PROVENIENTES DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO.....	86
5.5 CARACTERIZAÇÃO CELULAR .....	87
5.5.1 <b>Análise morfológica das células progenitoras endoteliais.....</b>	<b>87</b>
5.5.2 <b>Análise morfológica das células-tronco mesenquimais .....</b>	<b>88</b>
5.5.3 <b>Imunofenotipagem de CPE e CTM.....</b>	<b>89</b>
5.5.4 <b>Imunofluorescência indireta de CPE.....</b>	<b>92</b>
5.5.5 <b>Dupla marcação fluorescente direta de CPE com UEA-1-FITC e DIL-ACLDL .....</b>	<b>94</b>
5.5.6 <b>Imunofluorescência indireta de CTM .....</b>	<b>95</b>
5.6 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL .....	96
5.6.1 <b>Ensaio de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica.....</b>	<b>96</b>
5.6.2 <b>Ensaio de formação de túbulos capilares <i>in vitro</i> .....</b>	<b>97</b>
5.7 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS.....	98
5.7.1 <b>Indução da miocardiopatia isquêmica .....</b>	<b>98</b>
5.7.2 <b>Avaliação por ecocardiografia da função cardíaca após a indução da miocardiopatia isquêmica .....</b>	<b>98</b>
5.7.3 <b>Transplante de células .....</b>	<b>99</b>
5.7.4 <b>Avaliação por ecocardiografia da função cardíaca após 30 dias do transplante.....</b>	<b>99</b>
5.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	102
5.8.1 <b>Hematoxilina-Eosina.....</b>	<b>102</b>
5.8.2 <b>Tricrômio de Masson.....</b>	<b>104</b>
5.8.3 <b>Picrossírius red.....</b>	<b>107</b>
5.9 LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRANSPLANTADAS POR HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> POR FLUORESCÊNCIA (FISH) .....	112
5.10 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS ANGIOGÊNICAS NO SANGUE PERIFÉRICO POR ARRANJOS DE ANTICORPOS .....	113
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	116
5.11.1 <b>Comparação entre os grupos CPE+CTM, CTM, CPE e TX MEIO .....</b>	<b>116</b>

5.11.2 Comparação entre as avaliações pré e pós dentro de cada grupo.....	119
6 DISCUSSÃO.....	124
7 CONCLUSÃO.....	135
REFERÊNCIAS.....	136
APÊNDICE A – FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS.....	163
APÊNDICE B – FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS.....	164
APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	165
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	167
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS.....	169
ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA .....	171
ANEXO D – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA .....	184
ANEXO E – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA.....	190
ANEXO F – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA.....	197
ANEXO G – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA .....	203
ANEXO H – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA .....	214
ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA.....	225
ANEXO J – RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO .....	233
ANEXO K – RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO .....	234
ANEXO L – RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO.....	235

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por 1/3 das mortes em todo o mundo, sendo que 80% desses óbitos são registrados em países de baixa e média renda (1). No Brasil, as DCV são a principal causa de morte, provavelmente devido a associação do aumento da expectativa de vida aliado à ingesta de dietas ricas em gorduras saturadas, ao tabagismo e ao estilo de vida sedentário (2). Em nosso País, as DCV apresentam três importantes características: altas taxas em faixas etárias mais jovens, altas taxas entre mulheres e a hipertensão arterial como fator principal na gênese da doença (3).

Em 2006, as doenças do aparelho circulatório foram responsáveis pelo internamento de 1.157.509 pacientes pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e por 29,4% dos óbitos no país, sendo as principais causas de morte, nos homens, as doenças isquêmicas do coração e as doenças cerebrovasculares, enquanto nas mulheres predominaram as doenças cerebrovasculares (4).

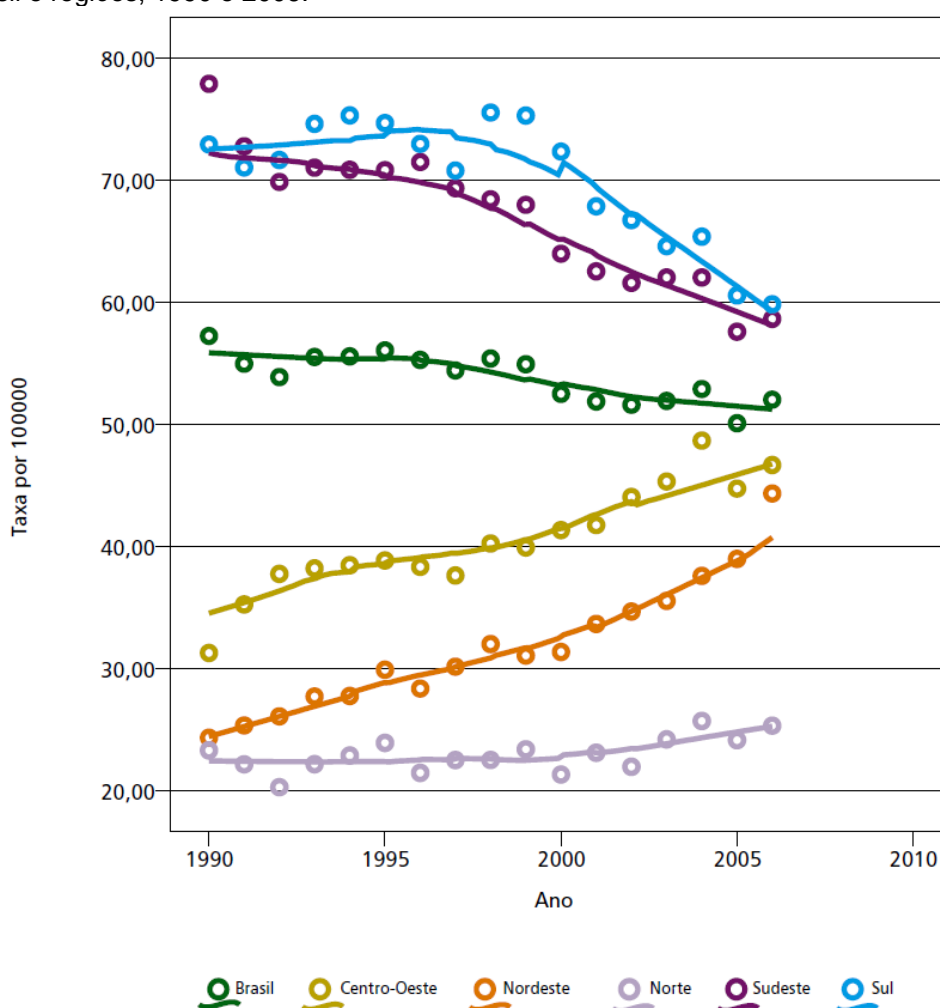
As doenças isquêmicas do coração são a segunda maior causa de morte e em 2006, foram responsáveis por 8,8% do total de óbitos no país (4). Segundo os registros oficiais entre 1990 a 2006, na população adulta de 20 a 74 anos, o risco de morte por doenças isquêmicas do coração apresentou uma tendência a redução nas regiões Sul e Sudeste e um aumento nas regiões Centro Oeste, Nordeste e Norte (4) (figura 1).

Dentre as doenças isquêmicas do coração, o infarto agudo do miocárdio (IAM) é a principal causa de óbito na população mundial (5, 6), correspondendo, no Brasil, a 6,7% da proporção de óbitos (4).

O estudo dos Fatores de Risco para Infarto do Miocárdio no Brasil - FRICAS (7) realizado entre 1994 e 1995 em 20 centros médicos no Brasil, relacionou como fatores de risco para ocorrência de IAM a hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, sobrepeso e história familiar positiva. Corroborando com o obtido pelo estudo FRICAS, o estudo Avaliação dos Fatores de Risco para Infarto Agudo do Miocárdio - AFIRMAR analisou 1.279 pares de pacientes caso-controle entre 1997 e 2000. Demonstrou-se neste estudo que os fatores de risco clássicos

são os responsáveis pelo aparecimento do IAM na população brasileira (8). Os dados obtidos por esses estudos indicam que se faz necessário a aplicação de políticas de saúde preventivas no Brasil, uma vez que as DCV constituem um grave problema socioeconômico. Com isso, mostra-se imprescindível a realização de programas educacionais com o intuito de atenuar, por meio de mudanças comportamentais, a exposição do paciente aos fatores de risco.

Figura 1 – Taxas de mortalidade por doença isquêmica do coração para população adulta de 20 a 74 anos, Brasil e regiões, 1990 e 2006.



Fonte: Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude\\_brasil\\_2008\\_web\\_20\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude_brasil_2008_web_20_11.pdf), 2008.

## 1.2 INFARTO DO MIOCÁRDIO E TERAPIA CELULAR

A ocorrência do IAM, resultante em sua maioria devido a doença aterosclerótica coronariana, caracteriza uma situação clínica de extrema gravidade e com risco de vida. A maioria das mortes por IAM ocorre nas primeiras horas de



manifestação da doença, sendo 40%-65% dos casos na primeira hora e, aproximadamente, 80% nas primeiras 24 horas (9).

Ocorre geralmente quando há uma interrupção súbita e intensa do fluxo sanguíneo, em uma ou mais artérias coronárias, freqüentemente ocasionado pelo trombo gerado na ruptura da placa aterosclerótica (10), instalando-se o processo inflamatório na região infartada.

A aterosclerose é uma doença inflamatória, sendo a disfunção endotelial o fator desencadeador da formação da placa. O processo da aterogênese é desencadeado por fatores agressores do endotélio. Esta agressão permite uma maior passagem de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para o espaço subendotelial onde a LDL é oxidada. A partir disso, as células endoteliais (CE) expõem as moléculas de adesão na superfície endotelial onde os monócitos são aderidos. As proteínas quimiotáticas no subendotélio atraem monócitos que migram e se diferenciam em macrófagos no subendotélio. Os macrófagos fagocitam as LDL oxidadas (LDL-ox) via receptores *scavenger*. Estes receptores reconhecem apenas as moléculas de LDL-ox. Os macrófagos que fagocitam várias moléculas de LDL-ox são denominados de células espumosas e começam a se acumular no espaço subendotelial dando início a formação das estrias gordurosas, sendo esta a primeira lesão macroscópica da aterosclerose (11).

A extensão da lesão concebida após o infarto depende da duração e da gravidade na falha da perfusão sanguínea (12), podendo gerar uma lesão celular irreversível e necrose miocárdica (13). No entanto, o grau de infarto também é modulado por uma série de fatores, incluindo o fornecimento de sangue, a medicação em uso e o pré-condicionamento isquêmico do tecido (14). A diminuição do fluxo sanguíneo para os tecidos, o que define a isquemia, resulta em uma menor oferta de substratos necessários, tais como o oxigênio e glicose e um excessivo acúmulo de resíduos metabólicos (15). A oclusão da artéria coronária resulta em alterações complexas da arquitetura ventricular que evoluem por semanas após o evento isquêmico (16). O IAM é, atualmente, uma das mais importantes causas de remodelação cardíaca, e contribui, significativamente, para a dilatação ventricular, fibrose miocárdica, disfunção ventricular e desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (17).

O desconforto associado ao IAM muitas vezes é difuso, não localizado, não posicional, não afetado pelo movimento da região, e pode ser acompanhado de

dispnéia, sudorese, náuseas ou desmaio. Esses sintomas não são específicos para isquemia do miocárdio e, portanto, podem ser mal diagnosticados e atribuídos a distúrbios gastrointestinais, neurológicos, pulmonares ou musculares. O IAM também pode ocorrer com sintomas atípicos, ou mesmo assintomáticos, sendo detectado apenas pelo histórico clínico do paciente, eletrocardiograma, elevações nos níveis séricos de biomarcadores ou por imagem (18) para um tratamento rápido e eficaz.

O processo de remodelamento após o IAM pode ser dividido em quatro etapas: primeiramente ocorre a morte de células por necrose ou apoptose, ocasionando o adelgaçamento das paredes cardíacas com a liberação sistêmica e local de mediadores inflamatórios; seguida por inflamação caracterizada pela grande quantidade de células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e mastócitos) e degradação da matriz extracelular; logo após ocorre a formação de tecido de granulação constituído de neovasculatura, macrófagos e miofibroblastos; e por fim ocorre a formação da cicatriz tecidual não contrátil com diminuição da função ventricular esquerda (19, 20). Na espécie humana, estes eventos se completam entre dois e três meses (21). Todas as etapas do remodelamento são reguladas por citocinas e fatores de crescimento (22).

O coração adulto humano possui uma capacidade limitada de regeneração (23) mesmo com a presença de células progenitoras residentes cardíacas (24). Embora a circulação possa ser restabelecida, as áreas de fibrose não contribuem para o desempenho miocárdico global em função da perda das unidades contráteis (25).

Embora grandes avanços tenham sido alcançados no entendimento dos mecanismos após o evento isquêmico, nenhuma medicação ou procedimento utilizado clinicamente tem demonstrado eficácia na restauração da cicatriz miocárdica. Devido a estes fatores surgiu a necessidade do desenvolvimento de novas opções terapêuticas para reparar o miocárdio lesado (26), buscando a multiplicação de cardiomiócitos funcionais, a formação de neovasos, o controle da apoptose e da fibrose, além de modular a resposta inflamatória e aumentar a função ventricular esquerda (27).

Nesse contexto surge a terapia celular com o objetivo de utilizar células-tronco (CT) no tratamento das DCV. Vários estudos pré-clínicos (28-32) e clínicos

(33, 34) têm demonstrado resultados promissores desta estratégia terapêutica no tratamento destas graves doenças (35, 36).

Muitos tipos celulares têm sido estudados na regeneração do miocárdio e o potencial terapêutico de células como células mononucleares (CMO) (37-39) cardiomiócitos fetais (40), mioblastos esqueléticos (41-46), células  $133^+$  (47, 48) e células-tronco mesenquimais (CTM) (49, 50) tem sido extensamente pesquisado para esta finalidade. No entanto, diversos fatores devem ser considerados na escolha do tipo celular mais adequado para a regeneração cardíaca. Já foi demonstrado na literatura que as CMO derivadas da medula óssea (MO) (38) e os mioblastos esqueléticos (46) não foram efetivas para a terapia cardíaca.

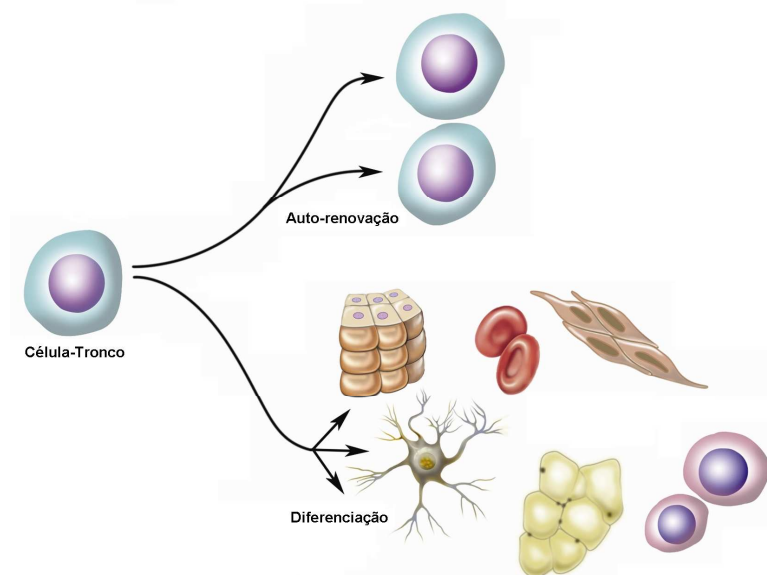
Em especial as células progenitoras endoteliais (CPE) e as CTM têm se mostrado importantes reguladoras no processo de reparo tecidual, na formação de novos vasos e na regeneração de regiões isquêmicas (51, 52), sendo estes tipos celulares o foco do presente estudo.

### 1.3 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas e não especializadas, definidas pela sua capacidade de proliferação, auto-renovação e diferenciação (figura 2). A divisão pode ocorrer por mitose, onde são originadas duas linhagens de células, sendo uma indiferenciada e a outra diferenciada. A auto-renovação ocorre por mitose simétrica, onde produzem duas células filhas idênticas e que permanecem indiferenciadas, repondo o *pool* de CT (53).

O conceito da CT foi proposto em 1961 por Till e McCulloch (54) que desenvolveram um ensaio clonogênico *in vivo*, onde identificaram células clonogênicas da medula óssea de murinos com capacidade de auto-renovação e multipotencialidade (55).

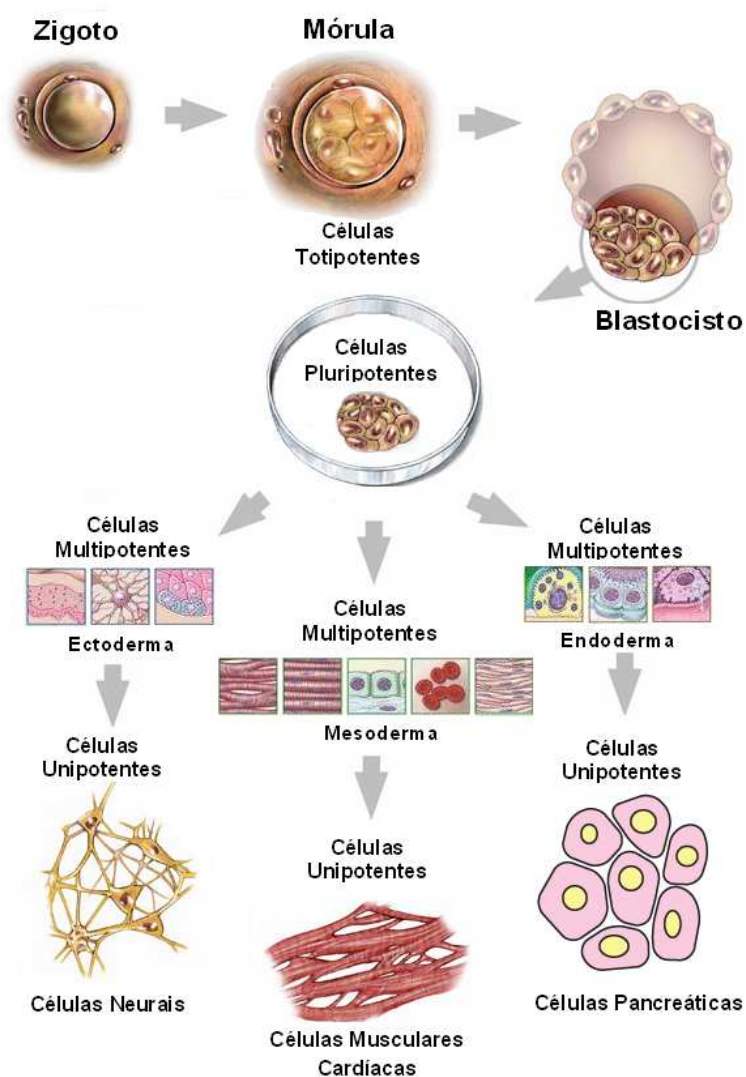
Figura 2 – Propriedades das células-tronco: auto-renovação e capacidade de diferenciação.



Fonte: Adaptado de [http://delsold.nas.edu/dels/rpt\\_briefs/Understanding\\_Stem\\_Cells.pdf](http://delsold.nas.edu/dels/rpt_briefs/Understanding_Stem_Cells.pdf)

As CT podem ser classificadas pela capacidade de se diferenciar em diferentes tecidos. Uma CT é classificada como totipotente quando for capaz de originar todos os tecidos do organismo, incluindo os extraembrionários. São as células que formam o embrião. Após o desenvolvimento do zigoto é possível obter da massa interna do blastocisto as CT pluripotentes. Estas tem a capacidade de se diferenciar em células dos três folhetos germinativos, com exceção da placenta e dos anexos embrionários e apresentam alta capacidade de proliferação. As CT multipotentes podem ser encontradas na maioria dos tecidos do organismo adulto e podem diferenciar-se nas células de um dos três folhetos embrionários, dando origem a uma limitada variedade de linhagens celulares diferenciadas. Por fim, as CT unipotentes podem originar apenas um único tipo celular específico com capacidade limitada de auto-renovação (figura 3) (56-58).

Figura 3 – Plasticidade das Células-Tronco



Fonte: Adaptado de [http://www.biophylaxis.com/en/pages/stem\\_glossary.php](http://www.biophylaxis.com/en/pages/stem_glossary.php)

#### 1.4 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

As células-tronco adultas (CTA) são indiferenciadas, porém são encontradas em tecidos diferenciados (58). Possuem uma menor capacidade de auto-renovação quando comparadas com as células-tronco embrionárias (CTE), sendo um dos motivos os baixos níveis de telomerase (59). No entanto, são poderosas ferramentas no estudo da auto-renovação e diferenciação celular (60).

A função das CT encontradas em tecidos adultos é atuar na manutenção e reparo tecidual. Todos os órgãos e tecidos possuem o seu próprio compartimento de CT, sendo estas regiões denominadas de nicho. Nestas as células encontram-se quiescentes prontas para serem ativadas, proliferarem e mobilizadas em resposta a

liberação de citocinas por ferimentos ou doenças (61). O nicho tem um papel fundamental no controle da proliferação celular, além de abrigar outros tipos celulares que controlam a diferenciação e apoptose das CT (62).

O principal mecanismo de ação das CTA é pela secreção de vários fatores tróficos e imunorregulatórios, sendo este mecanismo denominado de efeito parácrino (63).

Devido ao envelhecimento do organismo, o número e a capacidade funcional das CTA diminui (64), reduzindo o seu potencial de diferenciação e a sua capacidade regenerativa (65). Zaim et al. (2012) verificaram se a idade do doador e o cultivo por longos períodos afetam o potencial de diferenciação e de proliferação das células-tronco mesenquimais derivadas da MO humana. Para isso, selecionaram doadores saudáveis de três faixas-etárias: criança (0 a 12 anos), adulto (25 a 50 anos) e idoso (acima de 60 anos). Em relação a morfologia, nas passagens iniciais as células de todos os doadores apresentaram morfologia fusiforme. Durante as passagens celulares as células gradualmente apresentaram morfologia achatada e assim permaneceram até o período máximo de expansão. O número de células em divisão decresceu em passagens avançadas. Houve correlação direta entre a idade do doador e o potencial de diferenciação, onde células de doadores mais velhos apresentaram redução no potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico. Já o potencial de diferenciação condrogênico demonstrou-se independente da idade do doador. Diante do exposto, conclui-se que as células de doadores adultos perdem as características de CT durante a expansão contínua *in vitro*. Por isso, a idade do doador e o período de expansão são parâmetros críticos que afetam a morfologia, o potencial proliferativo e a habilidade de diferenciação das CTM. Estes parâmetros devem ser considerados na escolha da fonte celular ideal em estudos pré-clínicos e clínicos (66).

#### 1.4.1 Células-Tronco Mesenquimais

As CTM representam um tipo de CTA que pode ser facilmente isolada de vários tecidos e expandida *in vitro* (67). Correspondem a uma pequena população celular variando, por exemplo, na medula óssea de 0,001% a 0,01% das células nucleadas com capacidade multipotencial e de autorrenovação (68).

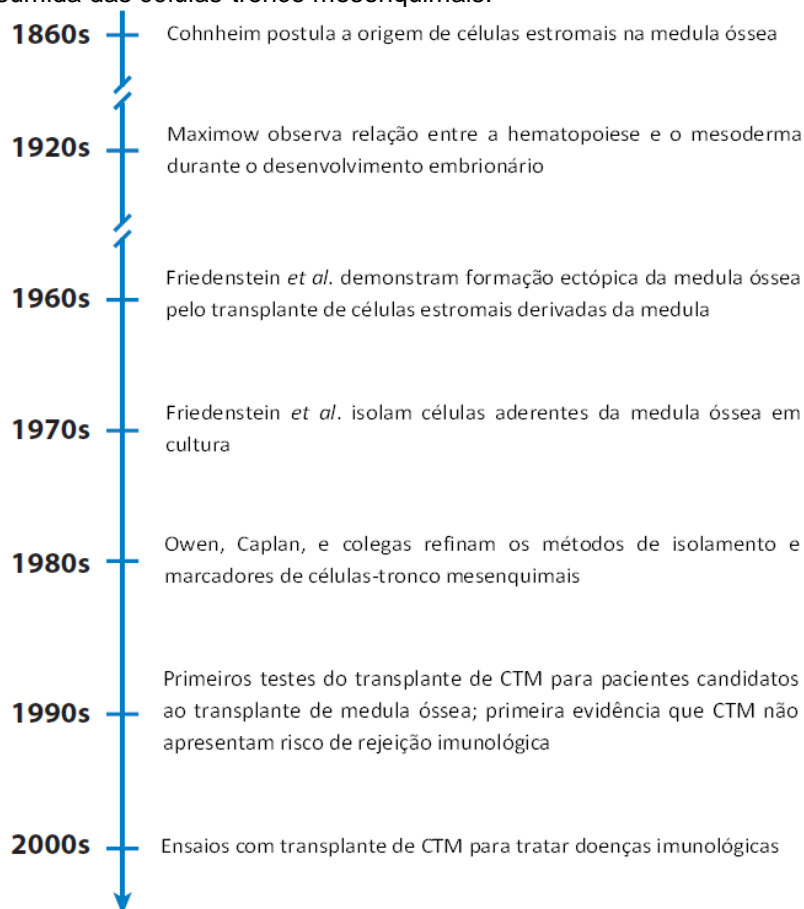
Em recente revisão, Parekkadan e Milwid (2010) fizeram um breve levantamento sobre a história da descoberta das CTM. Primeiramente, Cohnheim (1867) hipotetizou a origem na medula óssea de fibroblastos envolvidos na cicatrização de feridas distais. No início do século XX, Maximow (1924) descreveu a relação entre os componentes recém-formados do sangue e da mesoderme durante a embriogênese. Inicialmente, ele postulou a importância do tecido estromal da medula no apoio do desenvolvimento e da manutenção do sangue e órgãos hematopoéticos. Estas observações feitas por Cohnheim e Maximow foram a primeira indicação de um reservatório de células estromais na MO envolvidas no reparo natural e na hematopoese (69).

Friedenstein et al. (1968) foram os pioneiros no estudo de células precursoras não-hematopoéticas da MO de camundongos. Estas foram caracterizadas por sua capacidade de formar colônias aderentes *in vitro*, que, fenotipicamente, se parecem com fibroblastos e, por isso, foram denominadas de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F) (70).

Durante a década de 80, diversos estudos demonstraram que células isoladas pelo método de Friedenstein et al. (1968) possuíam a capacidade de diferenciação em células de múltiplas linhagens como osteoblastos, condroblastos, adipócitos e mioblastos (71, 72).

No final de 1980, Maureen Owen e Arnold Caplan elaboraram trabalhos com base nos achados iniciais de Friedenstein e propuseram a existência de CTA responsáveis pela geração da linhagem mesenquimal. Caracterizaram o estroma da medula e demonstraram a heterogeneidade desta população (73, 74). Ao mesmo tempo, Caplan et al. (1991) hipotetizaram, em um trabalho de embriogênese de aves, que uma subpopulação do estroma medular está ligada ao desenvolvimento de tecidos mesenquimais. Além disso, eles identificaram o primeiro conjunto de antígenos expressos por CTM que reagem com os anticorpos monoclonais CD105 e CD73. Caplan cunhou o termo CTM para descrever este subtipo de célula estromal da medula envolvido no processo de geração da linhagem mesenquimal (74). Logo após a descoberta dos métodos para isolar e cultivar CTM, o campo começou a crescer rapidamente, e muitos grupos iniciaram testes em humanos para avaliar a segurança e eficácia da terapêutica (figura 4) (69).

Figura 4 – História resumida das células-tronco mesenquimais.



Fonte: Adaptado de Parekkadan e Milwid, 2010 (69).

A MO é composta por uma rede de tecido conjuntivo e uma variedade de células estromais, incluindo, CE, adipócitos, macrófagos, células reticulares, fibroblastos, osteoprogenitores, CT hematopoéticas (CTH), CTM e CPE (75, 76).

Dentre as células que compõe a MO há uma rara população celular denominada CTM que dá suporte na hematopoese, no crescimento e na diferenciação de CT hematopoéticas. Na revisão realizada por Caplan (2007) há duas capacidades importantes em relação a este tipo celular. A primeira é a alta capacidade de diferenciação em células não-mesenquimais de múltiplas linhagens *in vitro* e *in vivo*. E a segunda é que estas células secretam uma ampla variedade de macromoléculas bioativas que atuam na regulação da resposta do sistema imunológico e na estruturação do microambiente regenerativo de áreas lesadas, sendo denominada de atividade trófica (77).

Há diversas denominações na literatura para as CTM: CT estromais (78), Células estromais da MO (79-81) ou como sugerido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, Células estromais mesenquimais multipotentes (82). Esta



diversidade de nomenclatura pode ser explicada pela diferença nos protocolos de isolamento e caracterização celular utilizados por diferentes grupos de pesquisa.

Estima-se, por meio do ensaio de CFU-F, que o número de CTM presentes na MO decresce com a idade (77), sendo encontrada uma a cada  $10^4$  células em recém nascidos, uma a cada  $10^5$  células em adolescentes e uma a cada  $10^6$  células em adultos (83). Este declínio também ocorre com a densidade vascular, sendo estes alguns dos indícios utilizados por Caplan (2009) para demonstrar que as CTM estão em contato coordenado com os vasos sanguíneos (83).

As CTM encontram-se distribuídas por todo o organismo pós-natal. Já foram isoladas de órgãos e tecidos como a parede das artérias (84), o tecido muscular esquelético e a derme (85), o tecido adiposo (TA) (86), a membrana sinovial (87), a polpa dentária (88), o endotélio e subendotélio da veia umbilical (89), a veia safena (90), o rim (91), o sangue de cordão umbilical (SCUh) (92-94), a placenta (95), a MO (96), a cartilagem articular (97), o ligamento periodontal (98), o osso trabecular (99), o pulmão (100), o sangue menstrual (101), entre outros.

Essa ampla distribuição por todo o organismo pós-natal foi confirmada por Covas et al. (2008), bem como, suas similaridades com pericitos (102). Meirelles, Chagastelles e Nardi (2006) têm demonstrado que as CTM são provenientes da região perivascular dos vasos sanguíneos, podendo ser responsáveis pela reposição celular nos tecidos ou órgãos em que se encontram, sugerindo um modelo em que pericitos são CT ao longo de toda vasculatura justificando a ampla distribuição desse tipo celular (103).

O potencial de diferenciação *in vitro* e *in vivo* e a expressão de marcadores são características similares entre pericitos e CTM. Alguns estudos sugerem que as CTM da MO são originárias dos pericitos (104, 105), porém nem todo pericito é uma CT. Os pericitos estão em contato direto com as CE e diferem na morfologia, na expressão de marcadores e na densidade nos diferentes órgãos do organismo (106).

O perfil fenotípico das CTM quando observadas em microscópio é alongado e oblongo, morfologia fibroblastóide alongada, fusiforme e pontiaguda, com núcleo eucromático, oval, grande, central e com citoplasma abundante (107).

Há uma grande divergência nas definições das CTM na literatura. O Comitê de CTM e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular estipulou três critérios mínimos para definir as CTM, com o objetivo de padronização, a saber: 1)

possuir como característica a aderência ao plástico quando mantidas em condições padrão de cultivo *in vitro*; 2) a expressão conjunta dos antígenos de superfície CD105, CD73 e CD90 e a não expressão dos antígenos de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19, e HLA-DR; 3) potencial de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (82).

As CTM não possuem marcadores de superfície exclusivos, por isso são definidas por uma combinação de características fenotípicas e funcionais, sendo positivas em mais de 95% para os antígenos CD 105, CD 73, CD 90 e selecionadas negativamente em menos de 2% para os antígenos CD 45, CD 34, CD 31, CD 14 ou CD 11b, CD 79 $\alpha$  ou CD 19 e HLA-DR (82).

As CTM possuem a habilidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos, condroblastos (68, 82) e também em fibroblastos, mioblastos, cardiomioblastos (81), neurônios, CE vasculares e cardiomiócitos (49, 108) sob condições específicas *in vitro*.

Existem algumas evidências de que as CTM sejam não imunogênicas ou pouco imunogênicas, em virtude de seu imunofenótipo distinto associado à ausência de expressão de antígeno de histocompatibilidade (HLA) de classe II (109) e de moléculas co-estimuladoras CD40L, CTLA-4, CD 80 e CD86 (110-112), além de secretarem fatores que diminuem a resposta dos linfócitos T (113). Estes dados sugerem que a CTM podem ser utilizadas terapeuticamente em transplantes alogênicos, pois funcionariam em qualquer receptor como uma “célula universal” (83). O fato das CTM não estimularem a resposta linfocitária pode ser explicado pela ausência das moléculas co-estimulatórias que são essenciais para a proliferação de linfócitos T (111, 112). Após a diferenciação das CTM o nível de HLA de classe II aumenta, no entanto, a interação com os linfócitos T não aumenta *in vitro* (110).

Estas células secretam uma ampla gama de citocinas angiogênicas como VEGF, bFGF, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), proteína quimiotática de monócito 2 e 3 (MCP-2 e MCP-3) (114-119).

As CTM em cultura sintetizam matriz extracelular (colágeno tipo I, fibronectina, colágeno tipo IV e laminina) e uma pequena fração sintetiza antígenos associados ao fator VIII (81).

Em comparação com outros tipos de células, as CTM parecem possuir propriedades únicas que permitem uma terapia celular conveniente e altamente

eficaz no tratamento de diversas doenças. As CTM estão sendo testadas no tratamento de doenças cardíacas (120, 121), lesões ósseas (122), lesões das cartilagens (123, 124), lesões dos tendões (125), fibrose pulmonar (126), lesões da medula espinhal (127), lesões do sistema nervoso central (128), doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) (129), doenças hepáticas (130), doenças genéticas como a osteogênese imperfeita (131) e a síndrome de Hurler (132), com resultados encorajadores. Esses primeiros estudos foram importantes porque forneceram evidências preliminares da segurança da terapia com CTM, bem como a base para os processos de produção em escala clínica.

Como candidatas para a terapia cardíaca, a utilização de CTM tem fornecido abrangentes benefícios funcionais, que incluem a diminuição da área cicatricial e do tamanho do infarto, restauração do mecanismo de acoplamento eletro-mecânico, melhora da função ventricular regional e global, aumento da densidade vascular e da perfusão miocárdica (133, 134). Alguns estudos sugerem que o transplante de células da MO possa induzir a angiogênese. Tomita et al. (1999) observaram que as células da MO induziram a angiogênese no miocárdio isquêmico (135). Nagaya et al. (2004), em um estudo experimental em ratos infartados, demonstraram que as CTM injetadas por via intravenosa são capazes de enxertar a área isquêmica e diferenciarem-se em cardiomiócitos e CE vasculares, resultando em angiogênese e miogênese, com consequente melhora da função cardíaca (117).

Esta capacidade angiogênica das CTM pode ser devido a diferenciação destas em CE (136, 137) ou pelo provável potencial parácrino (118). Observa-se que o efeito trófico das CTM é de grande importância na regeneração dos tecidos. Após o enxerto, elas poderiam contribuir para a reparação dos tecidos através da secreção de uma série de moléculas tróficas que incluem glicoproteínas solúveis da matriz extracelular, citocinas e fatores de crescimento (138), além da conexão direta célula-célula entre as CTM e o tecido adjacente (139). Tem-se verificado que estas moléculas tróficas podem não só reduzir a apoptose, a inflamação e a fibrose tecidual, como também estimular a regeneração celular do tecido. Na fase aguda da lesão parecem desempenhar o seu papel na regeneração principalmente através de sua função trófica (140).

Até o momento, a MO, o TA, o SCUh e o cordão umbilical (CUh) têm sido considerados como as principais fontes de CTM para a regeneração e engenharia tecidual (141). No entanto, a obtenção da MO é um procedimento altamente

invasivo, trabalhoso e doloroso (142). Além disso, a idade do paciente leva ao declínio da capacidade de diferenciação e da viabilidade celular, conseqüentemente o potencial terapêutico também diminui (143). Portanto, é necessária a busca de fontes alternativas de CTM para a aplicação clínica.

#### 1.4.2 Células Progenitoras Endoteliais

As CPE foram primeiramente isoladas por Asahara et al. (1997) a partir do sangue periférico (SP). Neste trabalho foi isolada uma população heterogênea de células circulantes, que após diferenciação, expressaram marcadores de células endoteliais e contribuíram para a formação de novos vasos em modelos animais de isquemia, derrubando o dogma de que a diferenciação de células mesodermis em angioblastos e posteriormente em células endoteliais ocorre apenas no desenvolvimento embrionário (144). Desde então vários estudos têm demonstrado que estas células desempenham um papel importante na neovascularização do tecido cardíaco isquêmico (145, 146), dos membros inferiores isquêmicos (147, 148) e da isquemia cerebral (149).

As CPE são definidas por terem propriedades análogas aos angioblastos embrionários (150). Em geral, são caracterizadas pela expressão dos marcadores de superfície CD133, CD34, receptor de fator de crescimento endotelial vascular-2 (VEGFR2), pela absorção de lipoproteína de baixa densidade-acetilada e pela ligação à lectina (32, 144, 151, 152) (tabela 1).

O termo CPE tem sido utilizado por diversos autores para descrever diferentes populações celulares que variam dos hemangioblastos até as CE diferenciadas (153-155). Também há divergência entre os marcadores de superfície e os métodos de isolamento e cultivo (144, 156-158). Experimentalmente, o pré-plaqueamento pode ser uma maneira de reduzir a heterogeneidade das CPE cultivadas, por excluir rapidamente as células aderentes como monócitos diferenciados ou possíveis células endoteliais adultas (156).

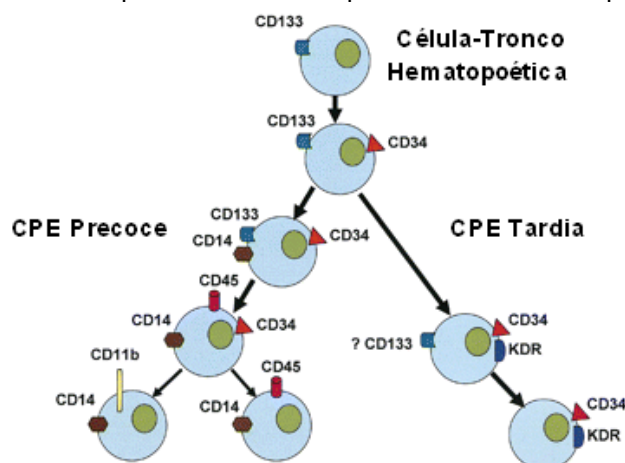
Tabela 1 – Características utilizadas na identificação das células progenitoras endoteliais.

IDENTIFICADOR	DISTRIBUIÇÃO	FUNÇÃO	
CD45	Leucócitos	Molécula de sinalização que regula a diferenciação e proliferação de leucócitos	
CD14	Monócitos, macrófagos, alguns neutrófilos	Receptor de endotoxinas que regula a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF por monócitos	
CD115	Monócitos, macrófagos	Receptor de macrófago-colônia estimulante fator regulador da proliferação e diferenciação mielóide	
CD117 (c-Kit)	Células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras hematopoiéticas	Receptor do fator de célula-tronco; estimula a proliferação celular	
CD133	Células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras hematopoiéticas	Desconhecida	
CD34	Células-tronco hematopoiéticas, células progenitoras hematopoiéticas e endotélio de capilar	Molécula de adesão intercelular; liga as selectinas-E e -L e regula as interações leucócitos/ células endoteliais	
CD31	Leucócitos, plaquetas, endotélio	Molécula de adesão que parecem ser importantes para a migração celular transendotelial para sites na inflamação aguda	
Absorção de lipoproteína de baixa densidade acetilada	Macrófagos, monócitos, endotélio	Não disponível; processo fagocitário ocorrendo em células mielóides e endoteliais	
Ligação a Lectina	Macrófagos, monócitos, endotélio	Não disponível; coloração histoquímica	
CD105	Endotélio, macrófagos ativados, músculo liso	Constituinte do receptor do fator de crescimento transformador beta-1; importante regulador da angiogênese	
CD141	Endotélio, músculo liso, monócitos, e neutrófilos	Liga-se a trombina, ativa a proteína C e inicia a via anticoagulante	
Fator de von Willebrand	Endotélio, plaquetas	Hemostasia	
Tie-2 (CD202)	Endotélio, monócitos, células-tronco	Receptor de angiopietina-1; regula o remodelamento e mantém a integridade vascular	
CD146	Endotélio, células de melanoma, células dendríticas	Molécula de adesão intercelular	
E-selectin (CD62E)	Endotélio	Molécula de adesão que regula as interações leucócito/célula endotelial e do tráfico de célula para locais de inflamação	
CD144	Endotélio	Molécula de adesão intercelular reguladora da permeabilidade e proliferação endotelial	
VEGFR-2 (CD309, KDR, Flk1)	Endotélio	Regulação da adesão e sinalização endotelial, essencial para o desenvolvimento embrionário vascular	
Óxido nítrico sintase endotelial	Endotélio	Geração enzimática de óxido nítrico	

Fonte: Adaptado de Padfield, Newby e Mills, 2010 (159).

Vários autores diferem em relação à descrição das CPE (144, 157, 158). No entanto, Hur et al. em 2004 sugeriram a existência de dois diferentes tipos de CPE encontradas no sangue periférico que diferem na morfologia, na taxa de proliferação, no comportamento e na expressão gênica. Estes dois tipos foram denominados de CPE “precoce” e CPE “tardia” devido ao tempo que aparecem na cultura. O primeiro tipo apresenta tempo de vida curto de 3 a 4 semanas e morfologia fusiforme (160). O número da população de CPE “precoce” CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup> no sangue periférico em humanos saudáveis é de 0,002% do total de células mononucleares, correspondendo de 70 a 210 células/mL (161). Gradualmente perdem a expressão de CD45 e CD31 e passam a expressar baixos níveis de KDR (kinase insert domain receptor) e VE-caderina, porém após a 3<sup>a</sup> semana perdem estes marcadores e morrem. Esta população é semelhante a descrita por Asahara et al. (1997). Já o segundo tipo aparece entre a 2<sup>a</sup> e a 4<sup>a</sup> semana após o plaqueamento, apresenta tempo de vida longo, rápida proliferação, morfologia pavimentosa, longos e altos níveis de expressão gênica de VE-caderina, Flt-1, KDR, e-NOS e vWF. Esta população é semelhante as células obtidas nos trabalhos de Lin et al. (2000) e Reyes et al. (2002). Hur et al. (2004) propõem diferentes papéis na vasculogênese para as CPE “precoces” e CPE “tardias”. As CPE “precoces” contribuem para a vasculogênese por meio da secreção de citocinas angiogênicas e no recrutamento, indução da proliferação e sobrevivência das células endoteliais adultas. Já as CPE “tardias” proporcionam um número suficiente de células endoteliais devido ao seu alto potencial de proliferação (figura 5) (160). Ambos os subtipos podem induzir a neovascularização em animais e podem atuar sinergeticamente (162), não apenas pela incorporação das CPE aos neovasos, mas também pela liberação de citocinas pró-angiogênicas que atuam de forma parácrina.

Figura 5 – Caracterização das CPE precoces e tardias por marcadores de superfície celular.



Fonte: Adaptado de Shantsila et al. 2008.

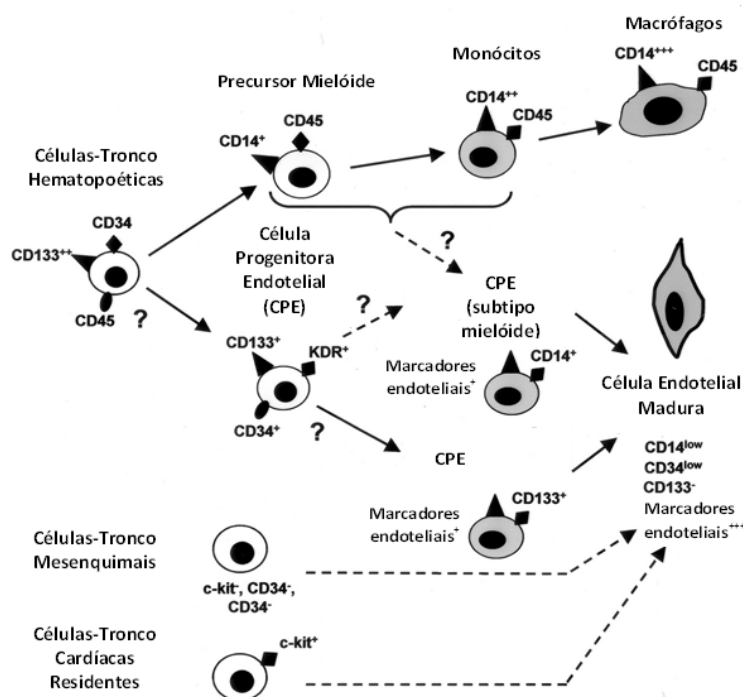
No aspecto funcional, as CPE demonstram algumas propriedades tanto das células hematopoéticas quanto das endoteliais. Uma importante característica funcional destas células é a sua capacidade em formar unidades formadoras de colônias (64), sendo este comportamento típico de células de origem hematopoética (150). Além disso, as CPE demonstram algumas características funcionais de CE como a formação de túbulos capilares e a produção de óxido nítrico (153, 163). Em cultivos prolongados apresentam a morfologia *cobblestone* típica de CE adultas (157, 164).

As CPE representam uma população celular heterogênea de múltiplas origens e fenótipos distintos, sendo capazes de originar células endoteliais funcionais. Na hierarquia estabelecida no sistema hematopoético, as células progenitoras têm um menor potencial de diferenciação quando comparadas com as células-tronco. No entanto, CPE possuem um grau de “tronquicidade” (*stemness*) que inclui a auto-renovação, clonogenicidade e capacidade de diferenciação (165).

A MO, o SP e o SCUh contêm células progenitoras que são capazes de se diferenciar em CE adultas, contribuindo para a re-endotelização e a neovascularização (144, 154, 160, 166-169). Este tipo celular também tem sido isolado do tecido adiposo (161, 170). Diversos estudos sugerem que outras populações celulares, além das CT hematopoéticas, também originam CE (figura 6). CT/progenitoras derivadas da MO adulta e as células progenitoras adultas multipotentes têm se diferenciado em células da linhagem endotelial. CT tecido

residente foram isoladas do coração e também demonstraram capacidade em se diferenciar em células da linhagem endotelial (158, 171, 172).

Figura 6 – Esquema retratando o potencial de origem e diferenciação das células progenitoras endoteliais a partir de células-tronco hematopoéticas e células não hematopoéticas.



Fonte: Adaptado de Urbich e Dimmeler. *Circulation Research*. 2004; 95: 343-353.

A quantidade limitada de CPE na circulação periférica tem sido um dos principais obstáculos nos estudos clínicos (173). Vários autores têm tentado expandir estas células *ex vivo* para obter um produto homogêneo para a terapia celular (173, 174). Estudos pré-clínicos sugerem que seria necessário coletar mais de 10 litros de sangue periférico autólogo para isolar um número de CPE efetivo na neovascularização (148, 175).

CPE isoladas da MO representam células mais imaturas quando comparadas com as isoladas do sangue periférico, expressando o marcador hematopoético CD133 (176). O fenótipo destas células geralmente é CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup>/VE-caderina<sup>-</sup> (153, 161). A expressão do CD133 distingue as CPE das células endoteliais maduras e dos monócitos.

Há cada vez mais evidências de que as CT são mobilizadas a partir da MO para a circulação, diferenciam-se em células progenitoras endoteliais circulantes (CPEC) e em locais de isquemia contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos. Quando migram para a circulação sistêmica as CPE gradualmente



perdem a propriedade progenitora e começam a expressar marcadores endoteliais adultos. Portanto, a perda do CD133 reflete a transformação das CPEC em células com características de endoteliais mais maduras. VEGF e fator derivado do estroma da medula óssea (SDF-1) são produzidos em áreas isquêmicas e têm um papel importante na mobilização das CPE (153, 166, 177-179). O VEGF induz a diferenciação de células progenitoras CD34<sup>+</sup> (144), CD133<sup>+</sup> (153) e CMO do SP em CE (151, 180).

Múltiplos fatores associados a idade estão envolvidos na diminuição do número e da função das CPE no organismo (181). Alguns estudos têm descrito a influência das condições patológicas, como a hipertensão arterial, diabetes, hiperlipidemia, do uso de medicamentos, sedentarismo e tabagismo e por outros fatores de risco cardiovasculares (64, 182). Por isso, as CPE têm sido amplamente estudadas como um marcador biológico de doenças cardiovasculares (64, 182, 183).

Um dos fatores de risco cardiovascular mais importantes é a hiperlipidemia, ou seja, o nível elevado de LDL colesterol. *In vitro* a LDL-oxidada reduziu o número de CPE, prejudicando a capacidade de proliferação, migração, adesão e vasculogênese (184), além de aumentar a taxa de senescência celular (185).

*In vivo* o número de CPE apresenta redução significativa em pacientes com hipercolesterolemia (64). O número de células CD34/KDR<sup>+</sup> está correlacionado negativamente com o nível de LDL colesterol no soro (186). *Diabetes mellitus* reduz a quantidade e tem efeito prejudicial nas funções das CPE (187, 188).

O número de CPEC também pode ser influenciado pela falência crônica renal (189, 190). Fumantes também têm baixos níveis de CPE (191, 192) e reduzida atividade funcional destas células (192). No entanto, Wang et al. (2004) demonstraram em um estudo experimental que baixas concentrações de nicotina aumentam o número e a atividade de CPE, enquanto que altos níveis foram associados a citotoxicidade (193).

DCV também modificam o número e a função de CPEC. Pacientes com doença coronária arterial estável têm um número reduzido de CPE, de células CD34<sup>+</sup> e dano na função de CPE (186, 194). Hill et al. (2003) demonstraram uma forte correlação entre o número de CPE circulantes e o índice de risco de Framingham (64). Na insuficiência cardíaca a mobilização ocorre de forma bifásica, com um aumento no número de CPE durante a fase inicial e uma diminuição durante

a fase avançada (195). No entanto, um aumento significativo no número de CPE é observado em pacientes com IAM (196).

Outros fatores de risco associados à redução do número de CPE e ao dano nas funções celulares incluem o histórico familiar de doença arterial coronariana, sedentarismo e o nível de proteína C reativa (186, 197).

Até o presente momento não foi definido qual é o melhor fator para aumentar os níveis de CPE na circulação periférica. Vários fatores estão sendo estudados em modelos animais e em humanos, como o fator de estimulação de colônia por granulócito (G-CSF), o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (147), a eritropoietina (EPO) (198), SDF-1 e o VEGF-165 (199).

Alguns fármacos que atuam de forma ateroprotetora têm demonstrado relação direta no aumento do número e na funcionalidade de CPE *in vitro*, em camundongos (151, 200) e em pacientes com doença coronária arterial estável (151, 152, 200). As estatinas aumentam a proliferação, a migração, a atividade funcional e previnem a senescência e a apoptose (151, 152, 200, 201). O estrogênio e o exercício físico também tiveram a mesma atuação nas CPE (202-204).

Em um estudo clínico foram utilizadas CPE originárias de SP e da MO no tratamento do infarto do miocárdio. As células de ambas as fontes tiveram resultados efetivos na melhora da viabilidade e contratilidade miocárdica (201), porém o pequeno número de CPE encontradas no SP é fator limitante para a sua aplicação clínica (205), sendo necessário buscar formas de aumentar a quantidade destas células.

Vários estudos vêm demonstrando que tanto as CT quanto as progenitoras isoladas a partir de tecidos adultos têm o potencial para aumentar a neovascularização e regeneração do miocárdio infartado (29, 30, 115, 135, 144, 171, 206). Senegaglia et al. (2008) demonstraram que as células CD133<sup>+</sup> do cordão umbilical diferenciadas *in vitro* têm função semelhante à das células endoteliais, sendo este tipo celular uma ferramenta atrativa para a regeneração de tecidos isquêmicos (174).

## 1.5 MODELO EXPERIMENTAL

Para melhor compreender a fisiopatologia da insuficiência cardíaca, bem como desenvolver novas formas de tratamento, os pesquisadores têm desenvolvido modelos animais que simulem a doença humana. A escolha do modelo animal é importante, porque, embora seja possível induzir a hipertrofia cardíaca e a insuficiência cardíaca com uma variedade de intervenções em diferentes animais, para que o modelo experimental seja útil, a fisiopatologia deve ser a mais próxima possível do que ocorre em humanos (207).

O modelo de ligadura da artéria coronária em ratos é amplamente utilizado para estudar o infarto do miocárdio, o remodelamento ventricular e a insuficiência cardíaca congestiva (207), devido a grande similaridade com a fisiopatologia humana (208). A progressão para insuficiência cardíaca nos ratos é semelhante ao que acontece quando um paciente sofre um infarto do miocárdio de grande extensão, sobrevive, desenvolve insuficiência cardíaca, sem a ocorrência de outro evento isquêmico. Tanto em humanos quanto em ratos, o tecido viável após o infarto não consegue compensar a função global para impedir o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Além de ser um bom modelo experimental da fisiopatologia, as respostas às intervenções farmacológicas em ratos tem sido úteis em prever o que vai acontecer em humanos com o mesmo tratamento (207). Por fim, o custo relativamente baixo do modelo de infarto em ratos o torna economicamente atraente.

Após a ligadura da artéria coronária ocorre o adelgaçamento e distensão de todo o miocárdio. Posteriormente, ocorre a hipertrofia da área infartada na proporção do tamanho do infarto, o que envolve até 20% do ventrículo, e conseqüentemente a substituição do tecido por cicatriz. Há um aumento na pressão ventricular diastólica final e um deslocamento para a direita do ventrículo esquerdo na relação pressão/volume (209). A dilatação ventricular progressiva ocorre entre 3 a 4 meses após o infarto e o débito cardíaco começa a diminuir em 6 meses (210). A forma do coração é alterada de elipsoidal para esférica (211).

A taxa de mortalidade esta diretamente ligada a extensão do infarto, uma vez que Pfeffer et al. (1985) verificaram que quanto maior o comprometimento da fração de ejeção maior é a taxa de mortalidade (212).

Em relação ao sistema imune do hospedeiro há evidencias de que o animal imunocompetente é essencial para o efeito benéfico de CTA após isquemia

miocárdica. Tolar et al. (2007) verificaram que a recuperação da função do ventrículo esquerdo após a infusão de CTA em um modelo murino de IAM é altamente dependente da presença de um sistema imunológico intacto. Estes autores foram os primeiros a demonstrar que a competência imune do receptor modula o impacto terapêutico da infusão de CTA na lesão do IAM, mesmo com as células permanecendo por mais tempo nos animais imunossuprimidos (213).

São inúmeros os estudos pré-clínicos desenvolvidos para o modelo experimental do IAM. Alguns dos trabalhos que demonstraram desfecho positivo utilizaram CMO do SP (171), CMO c-Kit<sup>+</sup> (214), CMO da MO (215), CTM da MO (49, 216). Diante deste panorama, vários estudos clínicos já foram realizados para o tratamento do IAM, sendo a fração mononuclear da MO de longe a mais utilizada (33, 38, 217-223). No entanto, os resultados obtidos na melhora da FEVE não foram tão efetivos quanto o obtido nos estudos pré-clínicos, razão pela qual os ensaios pré-clínicos focados na cardiomioplastia celular ainda tem como objetivo entender a fisiopatologia, definir o melhor tipo celular, a janela terapêutica, a melhor via de aplicação, as melhores formas de avaliação e se as metodologias desenvolvidas podem ser transpostas para a prática clínica.

### 1.5.1 Terapia celular em modelos experimentais utilizando CTM e CPE

As CTM e as CPE possuem propriedades diferentes. No entanto o potencial sinérgico da aplicação conjunta destes tipos celulares no tratamento cardíaco ainda não foi extensamente estudado.

Estudos recentes têm demonstrado que a formação de uma rede vascular robusta e funcional requer o co-transplante de CTM e CPE (224-226).

No trabalho de Zhang et al. (2008) ratas foram induzidas a lesão miocárdica pela aplicação de isoproterenol. Após 4 semanas 5 grupos receberam o transplante de salina, meio, CPE, CTM, CPE e CTM, respectivamente. A avaliação dos resultados demonstrou que o grupo que recebeu o transplante da associação de CPE e CTM apresentou uma melhora na função cardíaca, pois aumentou a fração de ejeção e a fração de encurtamento e reduziu a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, quando comparado com os demais grupos. Interessantemente, o transplante das CPE combinado com CTM pode representar uma nova estratégia terapêutica na melhora do fluxo sanguíneo e da função cardíaca no miocárdio (225).

Traktuev et al. (2009) demonstraram pela primeira vez a capacidade de dois tipos celulares não modificados geneticamente, células estromais do TA e CE isoladas do sangue do cordão e da veia umbilical, da placenta e tecido adiposo de adultos, atuando simultaneamente na formação de redes vasculares em matrizes de colágeno (226).

Melero-Martin et al. (2008) mostraram que a associação de CPE e CTM humanas de diferentes fontes, têm uma capacidade vasculogênica inerente que pode ser explorada para criar redes de microvasos funcionais *in vivo*. Usando Matrigel<sup>®</sup> como matriz, as CPE obtidas da fração mononuclear do SCUh e do SP foram co-implantadas com CTM provenientes da fração mononuclear provenientes da MO e do SCUh na região dorsal de ratos imunodeficientes. Após 1 semana o transplante resultou na formação de extensas redes vasculares. A presença de lumens contendo hemácias em toda a região dos implantes indicou não apenas um processo de vasculogênese dos dois tipos celulares, mas também de comunicação funcional com o sistema circulatório do receptor (224).

Suuronen et al., (2007) realizaram um estudo comparando os efeitos do transplante homólogo das CTM, CPE e a combinação dos dois tipos na regeneração do miocárdio infartado e da função cardíaca de ratos *sprague-dawley*. Os animais foram infartados por ligadura da artéria coronária, 14 dias após foram analisados por ecocardiografia, receberam o transplante 21 dias após o infarto do miocárdio e após 28 dias do transplante foi realizada uma nova análise ecocardiográfica. Os resultados demonstraram que o grupo que recebeu o transplante isolado de CPE apresentou aumento da densidade arteriolar na região de transição, resultando em uma melhora na neovascularização e aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e da fração de encurtamento quando comparados com os outros grupos (146).

Diante do exposto se faz necessário definir o tipo celular ideal para cada patologia, possibilitando aplicações mais efetivas na medicina regenerativa.

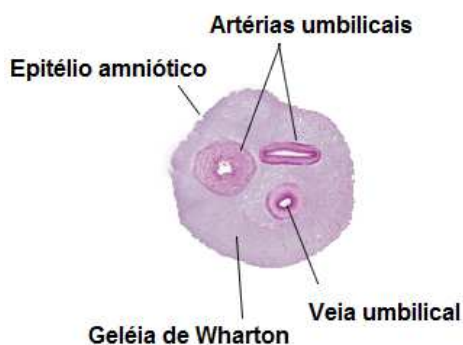
## 1.6 CORDÃO UMBILICAL

O cordão umbilical humano (CUh) é um tecido conectivo de origem extraembrionária, que conecta o feto à placenta. É desenvolvido durante a quinta

semana da embriogênese e, em gestações normais, atinge um comprimento final entre 60 a 65 cm, pesa aproximadamente 40 gramas e tem um diâmetro médio de 1,5 cm. A estrutura do CUh compreende duas artérias e uma veia, imersas em um tecido denominado de geléia de Wharton e fechado por um simples epitélio amniótico (figura 7) (227).

A geléia de Wharton (GW) é um tecido conjuntivo mucóide abundante em proteoglicanos e ácido hialurônico, que isola e protege os vasos umbilicais de torção, compressão ou flexão. Assim, assegura um fluxo sanguíneo constante entre feto e placenta (228). O sangue remanescente da veia umbilical, após o nascimento, é uma fonte rica em células hematopoéticas e células progenitoras, e tem sido uma fonte alternativa bem sucedida na cura de uma variedade de doenças pediátricas, imunológicas, hematológicas e distúrbios oncológicos. Além disso, o sangue do cordão é rico em CT não-hematopoéticas, como células endoteliais e CTM (229).

Figura 7 – Estrutura do cordão umbilical: composto por duas artérias, uma veia cercada pela geléia de Wharton e pelo epitélio amniótico.



Fonte: Adaptado de Ilie et al., (2011)(227).

A obtenção de CTM provenientes da GW é um processo relativamente novo (230-232), por isso, diferentes metodologias são empregadas no isolamento, cultivo e caracterização deste tipo celular (Tabela 2).

Nos últimos anos, vários pesquisadores publicaram protocolos de isolamento das CTM a partir do tecido do cordão umbilical. O primeiro passo para o procedimento de isolamento é representado pela remoção da artéria e veia umbilical seguida pela divisão do cordão em segmentos menores que são posteriormente digeridos por enzimas (233). Outra técnica envolve método de isolamento, sem digestão enzimática ou remoção dos vasos, por explante (234). Outro método foi

descrito para o isolamento das células do tecido perivascular ou subendotélio da veia umbilical (figura 8 e tabela 2) (89).

Tabela 2 – Características das diferentes metodologias de isolamento das CTM provenientes da GW.

<b>Autores</b>	<b>Método</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Nº de células isoladas</b>	<b>Referência</b>
TSAGIAS et al., (2011)	Enzimático	colagenase tipo I	$9,5 \times 10^6$	(235)
		hialuronidase Tripsina		
MEYER et al. (2008)	Enzimático	colagenase tipo I	$7,28 \times 10^5$	(236)
		hialuronidase Tripsina DNase		
		BSA, NaCl		
MONTANUCCI et al. (2011)	Enzimático	hialuronidase Liberase	$1,5-3 \times 10^5$ /cm de cordão	(237)
LU et al. (2006)	Enzimático	colagenase tipo II tripsina	$2,6 \times 10^7$	(238)
KARAHUSEYINOGLU et al. (2007)	Enzimático	colagenase tipo B	$3,6 \times 10^6$	(239)
SALEHINEJAD et al., (2012)	Enzimático	colagenase tripsina	$5 \times 10^3$ / cm de cordão	(240)
		colagenase tripsina hialuronidase	$2,5 \times 10^3$ / cm de cordão	
		Tripsina	$1 \times 10^3$ / cm de cordão	
DE BRUYN et al. (2010)	Explante	N.A.	$2,8 \times 10^6$	(241)

Legenda: N.A. = Não se aplica

Comumente, as células isoladas exibiram grande potencial proliferativo. Por pelo menos 20 passagens, as células podem ser expandidas sem perder a capacidade proliferativa e a viabilidade. Após 50 passagens torna-se comum o processo de senescência replicativa (227).

Figura 8 – Representação esquemática dos protocolos utilizados para a obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical.



Fonte: Adaptado de Ilie et al.. (2011) (227).

O potencial de diferenciação das CTM derivadas do CUh tem sido testado para as linhagens derivadas das três camadas germinativas, como cardiomiócitos (242), células endoteliais (243, 244), células neurais (245), células hepáticas (246), células musculares esqueléticas (247), condrócitos, adipócitos e osteoblastos (248).

### 1.6.1 Terapia Celular com Sangue de Cordão Umbilical

O SCUh pode ser usado como uma fonte de CT hematopoéticas e células progenitoras pluripotentes na aplicação clínica para reconstituir o sistema hematopoético ou para restaurar a função imunológica *in vivo* (249). Tem sido usado com sucesso como uma alternativa ao transplante de MO e de sangue periférico (SP) para o tratamento de pacientes pediátricos e adultos com doenças oncológicas (250), hematológicas (251), imunológicas (252) e hereditárias (253, 254). O primeiro transplante para reconstituição da MO utilizando o SCUh foi realizado em 1988 em uma paciente com anemia de Fanconi que recebeu as células congeladas da irmã (255). Após obter resultados promissores com doadores relacionados, o SCUh passou a ser melhor estudado com doadores não relacionados (252, 256).

O SCUh possui propriedades atrativas em comparação a MO e ao SP, como uma menor probabilidade de induzir a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda e crônica, mesmo quando a tipagem HLA não é totalmente compatível com a do receptor, aparentemente mantém o efeito enxerto versus leucemia e um menor índice de infecções causadas por Vírus Epstein Barr e Citomegalovírus (257, 258).

Um terço de todos os pacientes que precisam de transplantes de MO não encontram doadores com compatibilidade imunológica (259). Diante desta situação,



o SCUh representa uma valiosa alternativa (249) tanto para doadores relacionados (255), como para doadores não relacionados (252, 256).

Amostras de SCUh armazenadas têm sido utilizadas para transplantes em crianças e adultos com doenças malignas ou não-malignas (260). No entanto, o fator limitante para o uso do SCUh é o número limitado de células, o que compromete a pega do enxerto, tornando o transplante mais arriscado com maior necessidade de uso de antibióticos e suporte hemoterápico. Pacientes que têm massa corporal elevada também não encontram unidades disponíveis com facilidade. São realizados transplantes quando o número de antígenos HLA incompatíveis é igual ou menor que dois (261) e o número de células é superior a  $2,5 \times 10^7$  por quilo de peso do receptor (249).

Cada unidade de SCUh contém, em média,  $1 \times 10^9$  células nucleadas totais (262). Geralmente o uso de mais de uma unidade de SCUh é necessária para o transplante em adultos, o que parece levar a um melhor resultado. No entanto, ocorre uma maior incidência de DECH aguda após o transplante de duas unidades de SCUh (263).

Os resultados preliminares em estudos clínicos demonstram avanços significativos no uso de CT do SCUh em humanos e, por isso, esta é uma atrativa fonte celular no campo emergente da medicina regenerativa (249).

## 1.7 FONTES CELULARES ALTERNATIVAS PRESENTES NO SANGUE E NO CORDÃO UMBILICAL

O SCUh como fonte alternativa de CT pode oferecer várias vantagens importantes, incluindo a ausência de riscos para a gestante e o neonato, disponibilidade imediata para uso, manipulação mínima das células e redução nos aspectos éticos (249). O estudo de outros tipos celulares presentes no SCUh se faz necessário para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em diferentes patologias. Além das CT hematopoéticas, o SCUh contém células progenitoras endoteliais, células-tronco mesenquimais, células T-reguladoras, células dendríticas e células *natural killer* (264).

Estudos experimentais demonstram que estes tipos de células podem se tornar uma importante ferramenta da medicina regenerativa, permitindo opções de

tratamento para doenças como lesão cerebral (265), acidentes vasculares cerebrais (266), mal de Parkinson (267), mal de Alzheimer (268), de Huntington (269) e esclerose lateral amiotrófica (268). Outras doenças em estágios iniciais de investigação incluem distúrbios hepáticos (270), diabetes (271), infarto do miocárdio (272), aplicações ortopédicas para reparar a cartilagem e a fusão da coluna vertebral (273, 274). No entanto, pouco é conhecido sobre os mecanismos responsáveis por esta melhora funcional.

Dentre as células presentes no SCUh há uma população com alto potencial proliferativo, que foi denominada por Ingram et al. (2004) de colônias formadoras de células endoteliais (154). O transplante destas colônias em matriz resultou na formação de vasos funcionais em camundongos, quando as células foram protegidas ao estresse oxidativo (275). Senegaglia et al. (2008) demonstraram que aproximadamente 0,64% das células mononucleares presentes no SCUh são CD133<sup>+</sup> e que as CPE podem ser isoladas do SCUh, expandidas em até 70 vezes e diferenciadas *ex vivo* em células endoteliais adultas funcionais. Em contrapartida, os resultados de Pinho-Ribeiro et al. (2010) não demonstraram melhora na função e na prevenção do remodelamento cardíaco de ratos Wistar infartados após o tratamento com células mononucleares, a fresco ou congeladas, provenientes do SCUh (276).

Até o momento, não está definido se a eficácia terapêutica ocorre pela substituição das células comprometidas, ou devido à liberação de fatores de crescimento e citocinas pelas células infundidas, ou devido a estimulação/regeneração das CT do próprio paciente (249).

Outra fonte que tem sido bastante investigada é a GW presente no CUh. Este tecido conjuntivo mucoso derivado do mesoderma extraembrionário foi primeiramente descrito por Thomas Wharton em 1656 (277).

McElreavey et al. (1991) reportaram a existência de células semelhantes a fibroblasto na GW (278). Desde então, vários estudos demonstraram as possibilidades de isolar, proliferar e diferenciar as CTM derivadas do CUh (279-281). Wang et al. (2004) descreveram uma metodologia eficiente para isolamento, cultivo e caracterização de CTM da GW (279).

Estudos demonstram que as CTM presentes na GW apresentam perfil morfológico, imunofenotípico e com potencial de diferenciação semelhantes às CTM da MO (93, 279, 280).

Segundo Sarugaser et al. (2005) as CTM presentes no CUh são positivas em 98% ou mais para os antígenos CD 105, CD 73, CD 90, CD 44, em 75% para MHC I e em 15% para CD 117, e com valores menores ou iguais a 1,5% para os antígenos CD 45, CD 34, CD 106, CD 235a, MHC II, D123 (IL-3) (232).

Em relação ao potencial de diferenciação *in vitro* foi observada capacidade para diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (232).

Para verificar as propriedades imunológicas, Yoo et al. (2009) compararam a capacidade imunomoduladora das CTM da MO com as CTM da GW, TA e SCUh. Neste trabalho os autores verificaram que as fontes analisadas possuem potencial imunossupressor, pois inibiram a proliferação dos linfócitos T quando CMO do SP ativadas com fitoemaglutina foram co-cultivadas com CTM em diferentes concentrações. Essa supressão foi dependente da concentração celular utilizada no co-cultivo e da presença dos agentes imunomodulatórios, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que atuam na ativação da produção da enzima indolamina-2,3-dioxigenase pelas CTM (282).

Secco et al. (2008) demonstraram que o CUh é uma fonte mais rica em CTM do que o SCUh. A frequência de CTM no SCUh é de 1 em 200 milhões, enquanto que no CUh é de 1 em trezentas (281). Sarugaser et al. (2005) demonstraram uma eficiência de 100% no isolamento de CTM da GW (232), enquanto que KOGLER et al. (2004) obtiveram sucesso em 40,3% dos isolamentos de CTM do SCUh (283), corroborando com Rebelatto et al. (2008) onde obtiveram apenas 30% de sucesso no isolamento de CTM do SCUh (284).

Diante do exposto, se faz necessário o desenvolvimento de estudos que abordem os tipos celulares presentes no SCUh e no CUh para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em diferentes patologias uma vez que estas fontes celulares possuem potencial terapêutico e são comumente descartadas após o nascimento.

## 2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que as DCV constituem uma importante causa de morbimortalidade, se faz necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na tentativa de diminuir o imenso impacto social e econômico causados na sociedade moderna.

Neste panorama, surge a terapia celular, que tem como objetivo aumentar o número de células funcionais, sendo de relevante papel na medicina regenerativa. Neste contexto, estudos para a utilização de tecidos adultos como fonte de células são de valor significativo para esse tipo de terapia.

Os recentes trabalhos experimentais e clínicos que demonstram o importante papel das CT na melhora funcional do miocárdio mostram que estas células são um alvo importante para novas terapias a serem desenvolvidas. Além disso, a pesquisa da angiogênese representa um campo de investigação de grande importância clínica, visto a sua efetividade terapêutica em modelos animais de isquemia coronária ou de membros inferiores.

Diversas fontes têm sido pesquisadas para a terapia celular, dentre elas o SCUh, que tem sido amplamente estudado, armazenado e utilizado como fonte alternativa de CT hematopoéticas para o tratamento de doenças hematológicas, oncológicas, hereditárias e imunológicas. Outra fonte com potencial para a terapia celular é o CUh, que demonstrou ser uma rica fonte de CTM.

Neste projeto foram escolhidas as CTM oriundas do CUh pela sua capacidade de diferenciação em vários tecidos e pela capacidade parácrina no estímulo a angiogênese, bem como as CPE oriundas do SCUh pela sua capacidade de diferenciação em CE.

A caracterização morfológica, molecular, fenotípica e funcional destas células tanto *in vitro* quanto *in vivo* é de suma importância para elucidar o seu potencial terapêutico.

A hipótese deste trabalho é que a associação de CTM com CPE aumente a capacidade funcional e pró-angiogênica de corações com miocardiopatia isquêmica. Assim, co-transplantes destes tipos celulares terão um efeito benéfico maior que transplantes de tipos celulares individuais. Neste sentido, estudos pré-clínicos são necessários para comprovar a eficácia e a efetividade terapêutica das células presentes no SCUh e no CUh na miocardiopatia isquêmica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar *in vivo* a capacidade das células-tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais provenientes do cordão e sangue umbilical humano na melhora funcional e pró-angiogênica no tratamento da miocardiopatia isquêmica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar as CTM do cordão umbilical humano e as CPE do sangue de cordão umbilical humano.
- b) Caracterizar as CTM e as CPE por análise morfológica, imunofenotípica e funcional.
- c) Localizar nas CTM e CPE proteínas específicas por imunofluorescência indireta.
- d) Realizar ensaios pré-clínicos em modelo de ratos Wistar infartados com fração de ejeção igual ou menor a 40%, transplantando CTM e CPE isoladamente ou em conjunto.
- e) Analisar por ecocardiografia a fração de ejeção dos ratos Wistar pré e pós-transplante.
- f) Analisar histologicamente o grau de deposição de colágeno no tecido isquêmico.
- g) Verificar se as células humanas estão presentes no tecido cardíaco dos ratos 30 dias após o transplante.
- h) Identificar se há proteínas humanas no sangue periférico dos ratos 30 dias após o transplante.

## **4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

### **4.1 LOCAL DO ESTUDO**

O estudo foi realizado no Laboratório Experimental de Cultivo Celular e no Laboratório de Cirurgia Experimental do Núcleo de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e no Instituto Carlos Chagas/Fiocruz - Paraná. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR com o número de registro 2788/08 e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais com o número de registro 401.

### **4.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

A montagem do termo de consentimento livre e esclarecido atendeu as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas, envolvendo seres humanos, contidas na resolução nº. 196, de 10 de outubro de 1996 (285) e resolução de nº 251, de 07 de agosto de 1997 do Conselho Nacional de Saúde (286).

Os indivíduos receberam informações claras e objetivas dentro de sua compreensão, afim de que fossem esclarecidas as finalidades, os propósitos, bem como os riscos e benefícios diretos da pesquisa com a qual contribuíram.

### **4.3 OBTENÇÃO DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO HUMANO**

O SCUh foi coletado no Hospital e Maternidade Victor Ferreira do Amaral, de parturientes que voluntariamente concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, respeitando-se os seguintes critérios de inclusão e exclusão estabelecidos na RDC Nº 56, de 16 de dezembro de 2010 (287).

#### **4.3.1 Critérios de inclusão**

- Idade materna acima de 18 anos e que tenha se submetido há, no mínimo, duas consultas pré-natais documentadas.
- Idade gestacional igual ou superior a 35 semanas;
- Bolsa rota há menos de 18 horas;

- Trabalho de parto sem anormalidade;
- Ausência de processo infeccioso e ou doença durante a gestação que possa(m) interferir na vitalidade placentária e
- Crianças nascidas a termo, de parto normal ou cesárea, cujas mães não apresentaram patologias gestacionais.

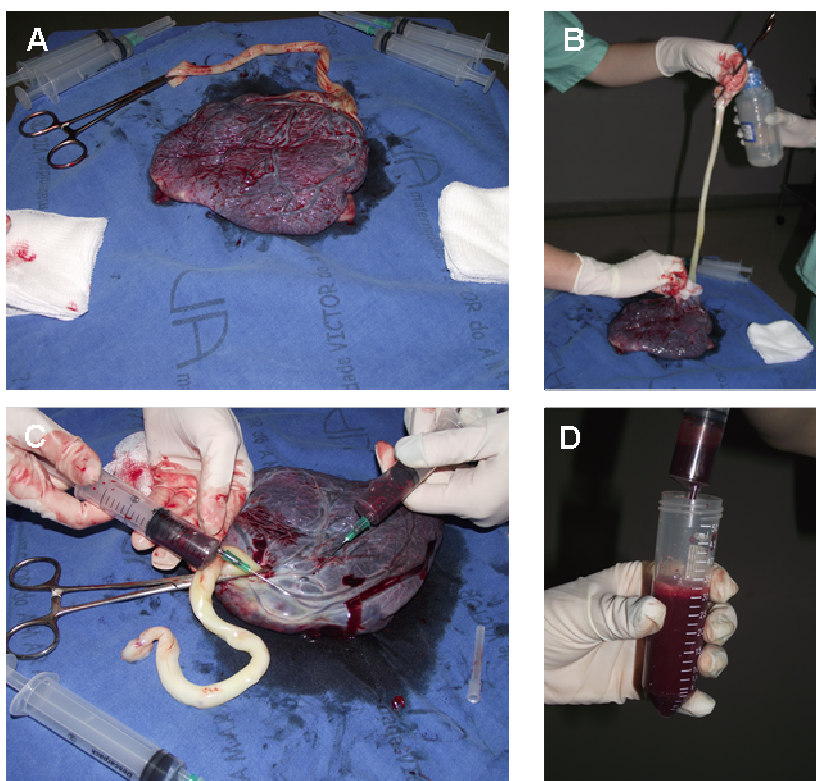
#### 4.3.2 Critérios de exclusão

- Sofrimento fetal grave;
- Feto com anormalidade congênita;
- Temperatura materna igual ou superior a 38°C durante o trabalho de parto;
- Gestante com situação de risco acrescido para infecções transmissíveis pelo sangue;
- Presença de processo infeccioso e doença durante o trabalho de parto, que possam interferir na vitalidade placentária;
- Gestante em uso de hormônios ou drogas que se depositam nos tecidos;
- Gestante com história pessoal de doença sistêmica autoimune ou de neoplasia;
- Gestante e seus familiares, pais biológicos e seus familiares ou irmãos biológicos do recém-nascido com história de doenças hereditárias do sistema hematopoético, tais como, talassemia, deficiências enzimáticas, esferocitose, eliptocitose, anemia de Fanconi, porfiria, plaquetopatias, neutropenia crônica ou outras doenças de neutrófilos, bem como com história de doença granulomatosa crônica, imunodeficiência, doenças metabólicas ou outras doenças genéticas.
- Gestante incluída nos demais critérios de exclusão visando à proteção do receptor, descritos nas normas técnicas vigentes para doação de sangue.

Após o nascimento, o CUh foi clampeado com o auxílio de uma pinça hemostática na porção justafetal o mais próximo possível ao recém-nascido e seccionado pelo obstetra. A placenta foi posicionada sobre a mesa auxiliar com campo estéril. Após realizar a antissepsia com gaze embebida em álcool 70%, a veia umbilical foi puncionada, no terço distal do cordão umbilical, a cerca de 3 a 4 cm da ligadura do cordão. Os vasos sanguíneos do cordão e da placenta foram

puncionados em porção justafetal com auxílio de uma agulha 40x16 (BD) drenando o sangue para uma seringa de 20 mL (BD) com 2,5 mL de solução anticoagulante para aférese (JP indústria farmacêutica S.A, SP, BR) e imediatamente acondicionado em tubo cônico de polipropileno de 50 mL (TPP<sup>®</sup>, Zurique, Suíça), contendo 19 mL de meio de cultura Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM) (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>™</sup>, NY, USA) suplementado com 1 mL de solução anticoagulante para aférese e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>™</sup>, NY, USA) que foi delicadamente homogeneizado por inversão manual (Figura 9). O material foi transportado para o Laboratório Experimental de Cultivo Celular dentro de caixa térmica a temperatura ambiente.

Figura 9 – Principais etapas da coleta de sangue do cordão umbilical e placentário.



Fonte: a autora, 2012.

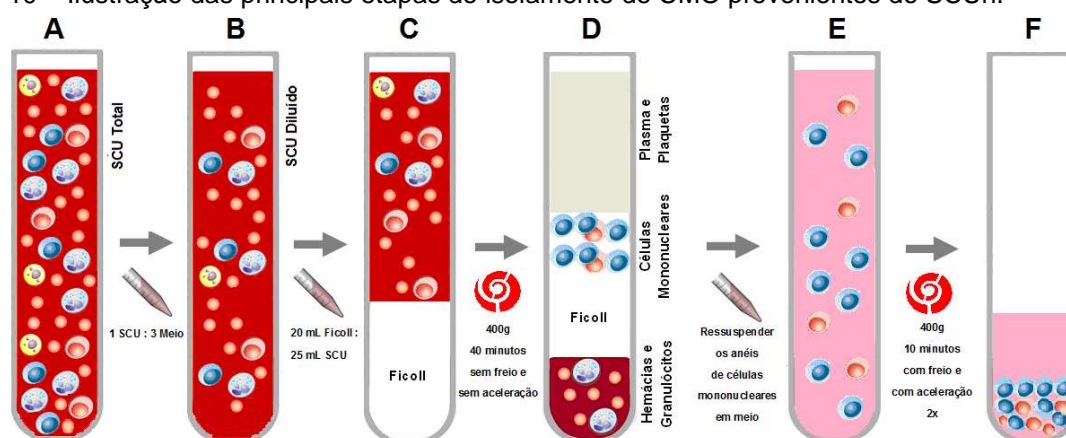
Legenda: (A) Clampeamento do cordão umbilical (B) Antissepsia com gaze embebida em álcool 70% (C) Punção dos vasos sanguíneos do cordão e da placenta (D) Transferência do sangue para o tubo com meio+anticoagulante.



#### 4.4 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO HUMANO

O isolamento das CMO do SCUh foi realizado conforme descrito por Senegaglia et al. (2008) com algumas modificações (174). O SCUh foi diluído na proporção de 1:3 em meio IMDM (Gibco®). O volume de 25 mL de SCUh diluído foi colocado sob 20 mL do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque® (densidade 1.077 g/mL) (Sigma Chemical, St. Louis, USA). As CMO foram isoladas por centrifugação a 400g durante 30 minutos a temperatura ambiente, sem aceleração e sem freio. O anel de CMO formou-se na interfase entre o gradiente de densidade e o plasma e, desta forma, foi possível separar os eritrócitos e granulócitos presentes na amostra. O anel foi coletado com o auxílio de pipeta de 10 mL (Corning inc., NY, USA) e transferido para um tubo cônico de polipropileno de 50 mL. As CMO foram lavadas duas vezes com meio IMDM a 400g por 10 minutos (figura 10). A concentração celular final foi obtida em câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha).

Figura 10 – Ilustração das principais etapas do isolamento de CMO provenientes do SCUh.



Fonte: a autora, 2012.

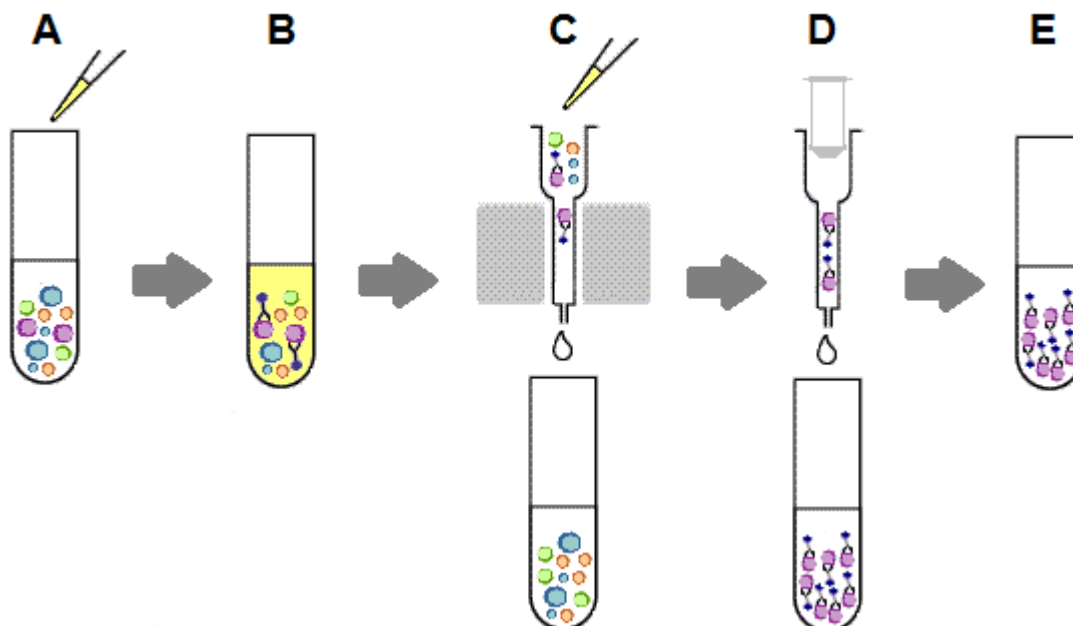
Legenda: (A) Amostra total; (B) Amostra diluída; (C) Amostra sob gradiente de densidade; (D) Composição da amostra após centrifugação; (E) Lavagem por centrifugação; (F) Células mononucleares.

#### 4.5 PURIFICAÇÃO DE CPE OBTIDAS DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO HUMANO

O isolamento das células CD133<sup>+</sup> obtidas das CMO provenientes do SCUh foi realizado conforme metodologia descrita por Senegaglia et al. (2008) (174). A suspensão de CMO foi centrifugada a 438g por 10 minutos e ressuspensa em 10

mL de PBS (Gibco®, Invitrogen™, NY, USA) suplementado com 5% de SBF e 2mM de EDTA. As CMO foram filtradas em *cell strainer* de 40µm (BD Falcon), centrifugadas a 438g por 10 minutos e ressuspensas em 300µL de PBS suplementado. A purificação das CPE foi realizada com o kit de separação células MACS® (Miltenyi Biotec). A separação das células CD133<sup>+</sup> foi feita por meio da ligação com o anticorpo anti-CD133 humano ligado às micropérolas magnéticas. Para isso, foram adicionados 100 µL de solução bloqueadora (Miltenyi Biotec) e 100µL do anticorpo anti-CD133 puro ligado às micropérolas magnéticas (Miltenyi Biotec). O material foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta estéril de 5mL (Corning inc., NY, USA) e incubado a quatro graus centígrados por 30 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com 10mL de PBS suplementado e centrifugadas a 438g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em 1mL de PBS suplementado e foram mantidas em banho de gelo. A coluna de separação foi acoplada ao suporte magnético e umedecida com 3mL de PBS suplementado. Após o esvaziamento da coluna foi colocada a suspensão celular, e foram realizadas quatro lavagens com 3mL com PBS suplementado. Durante esta etapa, as células ligadas as micropérolas magnéticas permaneceram na parede da coluna devido ao campo magnético. Para obter a população purificada de células CD 133<sup>+</sup> a coluna foi removida do suporte magnético e foram adicionados 5mL de PBS suplementado. O êmbolo foi colocado na parte superior da coluna e empurrado até o completo esvaziamento em um tubo cônico de prolipileno de 50mL (figura 11). A concentração celular final foi obtida em câmara de Neubauer.

Figura 11 – Ilustração das principais etapas do isolamento das células CD133<sup>+</sup> provenientes do SCUh.



Fonte: a autora, 2012.

Legenda: (A) Adição do anticorpo anti-CD133 humano (B) Incubação a 4°C por 30 minutos (C) Células passam pela coluna de separação (D) Retirada das células presas à coluna com auxílio do êmbolo (E) População final de células CD 133<sup>+</sup>.

#### 4.5.1 Cultivo de CPE

As células foram plaqueadas em frascos de cultura de 12,5 cm<sup>2</sup> (Falcon<sup>®</sup>, BD, NJ, USA) a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar umidificado. O meio endotelial basal EBM<sup>®</sup>-2 (Clonetics<sup>®</sup>, Lonza, MD, USA) foi suplementado com o kit EGM<sup>®</sup>-2MV (Lonza) composto por hEGF, hidrocortisona, Gentamicina, Anfotericina-B, soro bovino fetal, VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, ácido ascórbico, além de 10% de soro bovino fetal (Gibco<sup>®</sup>).

#### 4.5.2 Manutenção do cultivo de CPE

A primeira troca do meio foi realizada após 7 dias, e as demais foram realizadas a cada 2 dias. Quando o cultivo apresentou confluência acima de 50% foi realizada a dissociação celular.

#### 4.5.3 Dissociação de CPE

Para que as células percam a sua adesão à superfície de crescimento é necessário fazer um tratamento com enzima. O meio foi retirado dos frascos que foram lavados duas vezes com 3 mL de PBS para retirar o SBF, o cálcio e o magnésio e, com isso, afrouxar a ligação célula/célula e permitir o acesso da enzima à superfície celular. Foram adicionados 5 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e os frascos foram colocados por 5 minutos em estufa a 37 °C. Após este período, os frascos foram observados em microscópio para verificar se ocorreu a dissociação celular. Foram adicionados 200 µL de SBF para inativar a ação da tripsina e 1 mL de meio. A suspensão celular foi centrifugada a 438g por 10 minutos, ressuspensa em 5 mL de meio EBM<sup>®</sup>-2 e a concentração celular final foi obtida em câmara de Neubauer. As células foram replaqueadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (TPP<sup>®</sup>) para expansão celular e incubadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar umidificado.

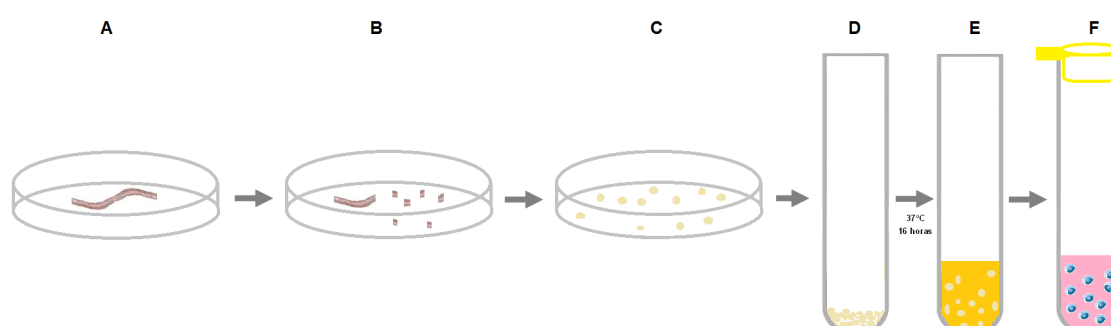
#### 4.6 ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA GELÉIA DE WHARTON PROVENIENTES DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

O isolamento das CTM obtidas da GW provenientes do CUh foi adaptado da metodologia descrita por Young-Jin Kim (2007) (288).

O CUh foi colocado em uma placa de Petri estéril e lavado duas vezes com 10 mL de PBS para retirar o sangue. O comprimento do CUh foi medido com o auxílio de uma régua. Foram realizados cortes transversais de 3 a 5 cm com auxílio de uma lâmina de bisturi. Os segmentos foram cortados longitudinalmente e os vasos sanguíneos removidos. A GW foi separada com auxílio de uma pinça e tesoura estéreis. Os segmentos da GW foram acondicionados em uma placa de Petri com PBS e macerados com auxílio de duas lâminas de bisturi em pedaços de 1 a 3 mm. O material foi colocado em tubo cônico de polipropileno de 50 mL com auxílio de uma espátula estéril. O tubo foi centrifugado a 438g por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e a GW pesada em balança analítica. Foram acrescentados 10 mL da solução enzimática de colagenase tipo I (Gibco<sup>®</sup>) (0,0149g/10 mL de PBS) para cada grama de GW. A amostra foi homogeneizada

manualmente e incubada em estufa a 37°C por 16 horas. Após o período da digestão enzimática foram adicionados 30 mL de PBS e o tubo foi centrifugado a 438g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta estéril de 10 mL e as células foram ressuspendidas em 10 mL de meio IMDM suplementado com 1% de ATB e 15% SBF e, por fim, as células foram filtradas em *cell strainer* de 100 µm para auxiliar na remoção dos detritos celulares. A concentração celular final foi obtida em câmara de Neubauer e as células foram plaqueadas na concentração de 30.000 células/cm<sup>2</sup>.

Figura 12 – Ilustração das principais etapas do isolamento de CTM provenientes da GW.



Fonte: a autora, 2012.

Legenda: A) Cordão umbilical B) Cortes transversais C) Separação da geleia de Wharton D) Geleia de Wharton E) Dissociação enzimática F) Filtragem após dissociação.

#### 4.6.1 Manutenção do cultivo de CTM

A manutenção do cultivo foi realizada com troca de meio de cultura após 5 dias e depois a cada 2 dias até obter 80% de confluência. O meio utilizado foi o IMDM suplementado com 1% de solução de antibiótico e 15% de SBF. Quando o cultivo apresentou confluência acima de 80% foi realizada a dissociação celular com tripsina-EDTA 0,25% (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>™</sup>, NY, USA).

#### 4.6.2 Dissociação de CTM

Para que as células percam à sua adesão a superfície de crescimento é necessário fazer um tratamento com enzima. O meio foi retirado dos frascos que foram lavados duas vezes com 5 mL de PBS para retirar o SBF, o cálcio e o magnésio e, com isso, afrouxar a ligação célula/célula e permitir o acesso da enzima à superfície celular. Foram adicionados 7 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco<sup>™</sup>

Invitrogen, NY, USA) e os frascos foram colocados por 8 minutos em estufa a 37°C. Após este período, os frascos foram observados em microscópio para verificar se ocorreu a dissociação celular. Foram adicionados 1 mL de SBF para inativar a ação da tripsina e 5 mL de meio. A suspensão celular foi centrifugada a 438g por 10 minutos, ressuspensa em 5 mL de meio IMDM e a concentração celular final foi obtida em câmara de Neubauer. As células foram replaqueadas em frascos de 150 cm<sup>2</sup> (TPP®) para expansão celular e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar umidificado.

## 4.7 CARACTERIZAÇÃO CELULAR

### 4.7.1 Análises morfológicas

Análises morfológicas das CTM e CPE em cultura foram realizadas rotineiramente utilizando microscopia de fase em microscópio invertido (DMIL LED, Leica) acoplado a uma câmara digital com programa de captura e processamento de imagens (LAS V3.6, Leica).

### 4.7.2 Imunofenotipagem

A técnica de imunofenotipagem foi utilizada para realizar a caracterização, quantificação e análise da viabilidade das CTM que foram analisadas pelo painel de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo: anti-CD 14 (BD-Pharmingen™), anti-CD 29 (BD-Pharmingen™), anti-CD 31 (BD-Pharmingen™), anti-CD 34 (BD-Pharmingen™), anti-CD 44 (BD-Pharmingen™), anti-CD 45 (BD-Pharmingen™), anti-CD 73 (BD-Pharmingen™), anti-CD 90 (BD-Pharmingen™), anti-CD 105, anti-CD 117 (BD-Pharmingen™), anti-CD 166 (BD-Pharmingen™); e as CPE que foram analisadas pelo seguinte painel: anti-CD 14 (BD-Pharmingen™), anti-CD 31 (BD-Pharmingen™), anti-CD 34 (BD-Pharmingen™) anti-CD 45 (BD-Pharmingen™), anti-CD 105 (eBioscience®) e anti-CD 133 (Miltenyi Biotec®). O corante 7-AAD (BD-Pharmingen™) foi utilizado para determinar a viabilidade celular. Os controles isotípicos y1FITC (BD-Pharmingen™), y2PE (BD-Pharmingen™), y3PerCP (BD-Pharmingen™) e y4APC (BD-Pharmingen™) foram utilizados para ajustar os parâmetros de fluorescência.

As células na terceira passagem foram dissociadas conforme descrito anteriormente. Foram adicionadas 200.000 células por tubo de citometria (BD Falcon™, MA, USA) e 500µL de PBS. As células foram centrifugadas a 438g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 5µL de cada anticorpo, conforme especificado nas tabelas 2 e 3. As amostras foram homogeneizadas por agitação manual e incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz. Após este período, as células foram centrifugadas a 438g por 5 minutos, ressuspendidas em 500µL de PBS+2% de paraformaldeído e armazenadas ao abrigo da luz até o momento da aquisição.

A análise das células foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton e Dickinson®) e a análise dos dados foi realizada utilizando-se o *software* FlowJo (Flowjo®).

Tabela 3 – Anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica das CTM.

	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCP</i>	<i>APC</i>
<b>Tubo 1</b>	y1	y2	y3	y4
<b>Tubo 2</b>	Controle autólogo = células + PBS			
<b>Tubo 3</b>	90	73	106	-
<b>Tubo 4</b>	44	34	45	14
<b>Tubo 5</b>	31	166	7AAD	29
<b>Tubo 6</b>	19	105	HLA-DR	117

Tabela 4 – Anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica das CPE.

	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCP</i>	<i>APC</i>
<b>Tubo 1</b>	y1	y2	y3	y4
<b>Tubo 2</b>	Controle autólogo = células + PBS			
<b>Tubo 3</b>	31	166	309	105
<b>Tubo 4</b>	45	133	7AAD	34
<b>Tubo 5</b>	144	201	106	117
<b>Tubo 6</b>	-	146	-	29

#### 4.7.3 Imunofluorescência indireta

Foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta das CPE e das CTM, para verificar a expressão de alguns antígenos presentes em células endoteliais e mesenquimais. As CPE foram coradas com anticorpo primário anti-von Willebrand humano (Dako®), anti-CD31 humano (BD-Pharmingen™), anti-CD106

humano (BD-Pharmingen™), anti-VEGF humano (eBioscience™) e os núcleos com 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich®). As CTM foram coradas com anticorpo primário anti-vimentina, anti-CD105 humano (BD-Pharmingen™) e os núcleos com DAPI.

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços sob lamínulas circulares de vidro (Glastécnica®) com 13 mm de diâmetro, estéreis, na concentração de 10.000 células por poço e cultivadas durante 48 horas. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com PBS + 2% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para remover o fixador foram realizadas 3 lavagens com 500 µL de PBS. Para reduzir a autofluorescência provocada pela exposição ao paraformaldeído foram adicionados 500 µL de PBS + 0,1M de glicina e incubado por 10 minutos. Para permeabilizar as células foram adicionados 500 µL de PBS + 0,2% de triton X-100 e incubado por 10 minutos. Para bloquear ligações inespecíficas foi adicionado PBS + 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 20 minutos. Foram adicionados os anticorpos primários diluídos em PBS + 0,2% de BSA e incubados por 3 horas a temperatura ambiente. A concentração de cada anticorpo está especificada na tabela 4. Após este período foram realizadas 5 lavagens com 1 mL de PBS para retirar o anticorpo não ligante excedente. A reação foi bloqueada com PBS + BSA 0,2% por 20 minutos. Foram adicionados os anticorpos secundários diluídos em PBS + 0,2% de BSA e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após este período foram realizadas 5 lavagens com PBS. Para evidenciar os núcleos foi adicionado 150µL de DAPI (Sigma-Aldrich®) e incubado por 5 minutos. Após esta etapa, com o auxílio de uma pinça, as lamínulas foram mergulhadas em um béquer contendo água MilliQ. As lâminas (Erie Scientific Company) foram montadas com meio de montagem (Dako®) e após 24 horas seladas com esmalte.

O controle desta reação foi realizado com a incubação de apenas o anticorpo secundário, sem a incubação com o anticorpo primário. Desta maneira foi possível verificar se a reação do anticorpo secundário não foi inespecífica.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM4000) acoplado a uma câmera digital (Leica DFC 345FX) com programa de captura e processamento de imagens (Leica LAS AF).



Tabela 5 – Relação dos anticorpos utilizados em ensaios de imunofluorescência indireta das CPE e CTM.

<b>Anticorpos Primários</b>	<b>[ ]</b>	<b>Diluição</b>	<b>Anticorpos Secundários</b>	<b>[ ]</b>	<b>Diluição</b>
Mouse anti humano CD 31	62,5 µg/mL	1:100	Texas red X goat anti mouse	2 mg/mL	1:1500
Monoclonal mouse anti-humano Von Willebrand	240 mg/L	1:200	Texas red X goat anti mouse	2 mg/mL	1:1500
Policlonal rabbit anti-human Von Willebrand	3,1g/L	1:200	FITC anti-rabbit IgG	1.1 mg/mL	1:80
Mouse anti humano CD 105	0,5 mg/ml	1:100	Texas red X goat anti mouse	2 mg/mL	1:1500
Mouse anti humano CD 106	0,5 mg/ml	1:100	Texas red X goat anti mouse	2 mg/mL	1:1500
Cabra anti Vimentina puro	200 ug/mL	1:50	Alexa Fluor 488 rabbit anti goat	2 mg/mL	1:1500
Mouse anti humano VEGF	200 ug/mL	1:50	Texas red X goat anti mouse	2 mg/mL	1:1500

#### 4.7.4 Dupla marcação fluorescente direta de CPE com UEA-1-FITC e DIL-AC-LDL

Foi avaliado o potencial das CPE incorporarem Lipoproteína de baixa densidade acetilada marcada com 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (Dil-acLDL) e se ligarem a lectina de *Ulex europaeus* (UEA-1-FITC).

As CPE foram dissociadas, conforme descrito anteriormente, na segunda passagem e plaqueadas em placas de 24 poços sob lamínulas circulares de vidro com 13 mm de diâmetro e mantidas em cultura a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até obter confluência de aproximadamente 80%. Após, as células foram lavadas 1 vez com 1000 µL de PBS, foi adicionado 2µg de Dil-acLDL (Molecular Probes, Invitrogen) diluído em 1000 µL de meio IMDM e foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas 1 vez com 1000 µL de PBS. A fixação foi realizada com 1000 µL de PBS + 4% de paraformaldeído por 10 minutos. As células foram lavadas 1 vez com 1000 µL

de PBS e foi adicionado 10µg de UEA-1-FITC (Sigma) diluído em 500µL de PBS. As células foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após esta etapa, foi realizada a lavagem com 1000 µL de PBS e adicionado 500 µL de DAPI por 5 minutos.

A lamínula foi montada sobre lâmina de vidro com meio de montagem (Dako) e após 24 horas selada com esmalte incolor. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM4000) acoplado a uma câmera digital com programa de captura e processamento de imagens (Leica LAS AF).

## 4.8 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

### 4.8.1 Ensaios de diferenciação adipogênica e osteogênica

As CTM foram dissociadas na segunda passagem e plaqueadas em triplicata em placas de 24 poços (TPP<sup>®</sup>) com área de 1,91cm<sup>2</sup>, contendo lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro, com uma densidade 2x10<sup>3</sup> células/poço. As células foram cultivadas em meio IMDM suplementado com 1% de ATB e 15% de SBF em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar umidificado. A indução à diferenciação foi iniciada quando as células atingiram 80% de confluência utilizando-se meios comerciais enriquecidos com indutores celulares específicos (StemPro, Gibco<sup>®</sup>) durante 21 dias. A troca do meio foi realizada três vezes na semana.

A diferenciação osteogênica das CTM foi detectada pela observação de depósitos de cálcio nas culturas, através da coloração com Alizarina Red S (Fluka). A detecção da diferenciação adipogênica das CTM foi evidenciada pelos vacúolos de gordura corados por Oil Red O (Sigma-Aldrich).

O controle negativo foi realizado com as CTM da GW cultivadas com meio IMDM + 15% SBF + 1% ATB pelo mesmo período e o controle positivo foi realizado com CTM da medula óssea cultivadas com os mesmos meios de indução pelo mesmo período.

### 4.8.2 Ensaio de diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica foram formadas micromassas de 500.000 células através de centrifugação a 438g durante 10 minutos em tubos cônico de polipropileno de 15mL (TPP<sup>®</sup>). A troca do meio foi realizada a cada três dias. Após

21 dias de indução com meio de diferenciação condrogênico (StemPro, Gibco®), as micromassas foram coradas em Azul de Toluidina e emblocadas em parafina para confecção de lâminas permanentes. O controle negativo foi realizado com as CTM da GW cultivadas com meio IMDM + 15% SBF + 1% ATB pelo mesmo período.

Os condroblastos secretam uma matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos sulfatados, que serão corados com Azul de Toluidina. Foram confeccionadas lâminas permanentes para possibilitar a captura das imagens em microscópio óptico. As lâminas foram analisadas em microscópio (Leica DM2000) acoplado a uma câmera digital (Leica DFC 295) com programa de captura e processamento de imagens (Leica LAS V3.6).

#### **4.8.3 Ensaio de formação de túbulos capilares *in vitro***

O Matrigel™ (BD-Biosciences®) é um composto comercial rico em proteínas de matriz extracelular que permite a formação de uma estrutura tridimensional. O potencial vasculogênico das CPE foi avaliado pelo ensaio de formação de túbulos capilares *in vitro*.

Foram adicionados em uma placa de 24 poços 250µL de Matrigel por poço que foi acondicionada em estufa a 37°C por 30 minutos para polimerizar. As células foram dissociadas e plaqueadas na concentração de 20.000 células/poço. A placa foi acondicionada em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar umidificado. Os ensaios foram realizados em triplicata. O controle positivo foi realizado com células endoteliais provenientes da veia safena humana e o controle negativo com fibroblastos da linhagem L929.

As observações foram realizadas nos tempos de 1, 3 e 24 horas em microscópio invertido (DMIL LED, Leica) acoplado a uma câmera digital com programa de captura e processamento de imagens (LAS V3.6, Leica).

### **4.9 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS**

#### **4.9.1 Aspectos éticos nos cuidados com animais**

Todos os procedimentos seguiram, rigorosamente, a regulamentação existente sobre experimentação com animais do Comitê de Ética no Uso de Animais

(CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e obedecendo às disposições postuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### 4.9.2 Desenho experimental

Foram utilizados 440 ratos machos (*Rattus Norvegicus*), da linhagem Wistar, adultos, com 4 meses de idade, pesando entre 350 a 400 gramas provenientes do biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

A manipulação dos animais seguiu as diretrizes de Waynforth e Flecknell (1992) e, também, de Wolfensohn e Lloyd (1995), obedecendo às disposições postuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA,1991) quanto à criação e ao uso de animais para atividade de ensino e pesquisa.

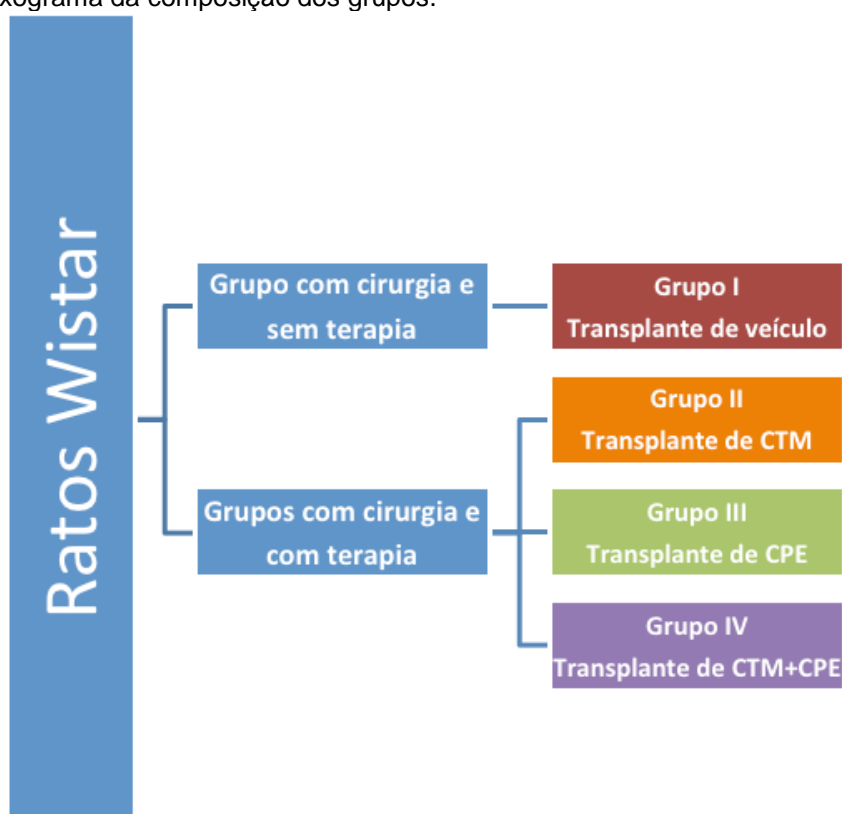
Os animais foram alocados em gaiolas plásticas em grupos de cinco e mantidos em condição padrão de laboratório climatizado e com períodos claro/escuro de 12/12 horas durante toda a duração do experimento. Foi fornecida água *ad libitum* e ração padronizada para a espécie Nuvilab CR-1 (Nuvital).

Os animais foram divididos em quatro grupos. O controle foi composto pelo grupo transplante de meio. Os grupos de tratamento foram compostos por três grupos: transplante de CTM; transplante de CPE e transplante de CTM + CPE.

O grupo transplante de meio foi submetido a ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda, os animais com FE igual ou abaixo de 40% foram selecionados e receberam o transplante de 200 $\mu$ L de meio.

Três tipos diferentes de tratamento foram testados e os grupos foram compostos da seguinte maneira: o grupo CTM foi submetido à ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda e os animais com FE igual ou abaixo de 40% receberam o transplante de  $2 \times 10^6$  CTM; o grupo CPE foi submetido à ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda e os animais com FE igual ou abaixo de 40% receberam o transplante de  $2 \times 10^6$  CPE; o grupo CTM+CPE foi submetido à ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda e os animais com FE igual ou abaixo de 40% receberam o transplante de  $1 \times 10^6$  CTM +  $1 \times 10^6$  CPE.

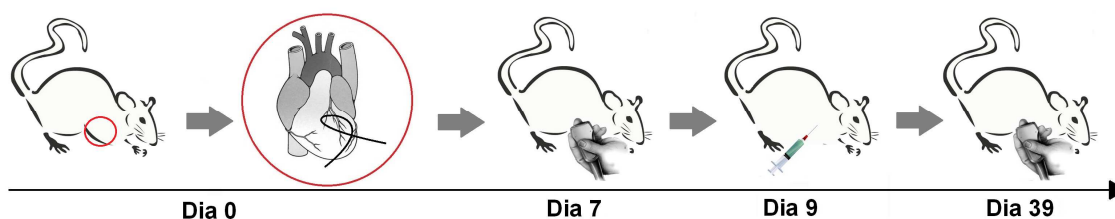
Figura 13 – Fluxograma da composição dos grupos.



Fonte: a autora, 2012.

Legenda: Grupo I (controle): Animais infartados tratados com meio; Grupo II (tratamento): Animais infartados tratados com CTM; Grupo III (tratamento): Animais infartados tratados com CPE e Grupo IV (tratamento): Animais infartados tratados com CTM+CPE.

Figura 14 – Fluxograma dos ensaios pré-clínicos.



Fonte: a autora, 2012.

Legenda: Dia 0: Indução da miocardiopatia isquêmica; Dia 7: Avaliação ecocardiográfica pré-transplante; Dia 9: Transplante e Dia 39: Avaliação ecocardiográfica pós-transplante.

#### 4.9.3 Indução da miocardiopatia isquêmica

No pré-operatório foi fornecida ração padronizada e água *ad libitum*, até 2 horas antes da anestesia. Os animais foram pesados antes de serem submetidos ao procedimento cirúrgico para calcular a dose da medicação anestésica. Os animais foram numerados e marcados na cauda com auxílio de caneta.

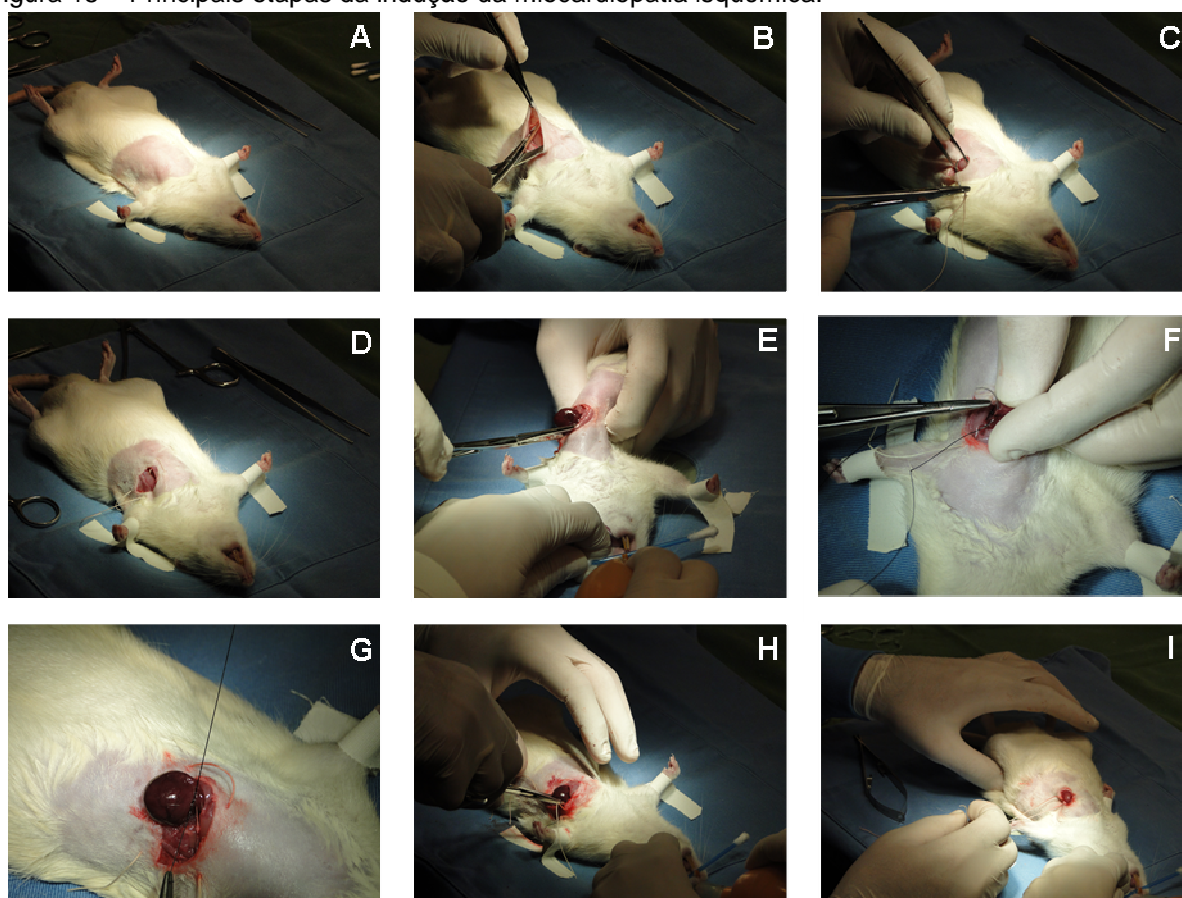
Os animais foram pré-medicados com analgésico opióide meperidina 20mg/kg associada a sulfato de atropina 40 µg/kg administrados por via intramuscular (IM) 10 minutos antes da cirurgia. A indução anestésica foi feita por inalação de vapor de halotano em campânula de vidro fechada. O monitoramento foi realizado através da frequência respiratória, frequência cardíaca e presença de reflexos protetores (reflexo palpebral, reflexo fotooculomotor, reflexo podal e reflexo de deglutição).

Os animais foram tricotomizados com o auxílio do aparelho de tricotomia (Andis AGI) com lâmina nº 40 na região dorsal. A cirurgia foi iniciada quando os animais ficaram em plano anestésico cirúrgico.

Os animais foram posicionados sobre prancha rígida de madeira revestida por fórmica, forrada com campo cirúrgico, em decúbito dorsal, com os membros superiores estendidos fixados por esparadrapo e a cabeça alinhada ao tronco. Em seguida, foi realizada antissepsia da região dorsal com gaze embebida em solução alcoólica de glucanato de cloroxidina a 2%.

A metodologia de indução à miocardiopatia isquêmica (MI) foi realizada conforme Johns e Olson (1954) (289) e Capriglione et al. (2012) (290). Foi realizada uma pequena toracotomia lateral esquerda entre o quinto e sexto espaço intercostal. Neste momento o animal recebeu ventilação pulmonar manual por meio de um respirador adaptado na narina. A anestesia foi mantida com o halotano administrado por meio de um tubo facial. Foi feita uma sutura em bolsa da pele e dos músculos da região, deixando o nó aberto até o término da cirurgia. Após a abertura, o coração foi exteriorizado manualmente e foi feita a ligadura da artéria descendente anterior com um fio de seda 4.0 por meio de um nó duplo entre a via de saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. Em seguida, o coração foi reposicionado, a bolsa de sutura foi fechada e quando os animais apresentassem movimentos respiratórios espontâneos foi cessada a ventilação pulmonar manual (Figura 15).

Figura 15 – Principais etapas da indução da miocardiopatia isquêmica.



Fonte: a autora, 2012.

Legenda: (A) Posicionamento do animal em decúbito dorsal (B) Toracotomia lateral esquerda (C) Sutura em bolsa da pele e dos músculos (D) Sutura em bolsa (E) Exteriorização manual do coração (F) Passagem da agulha por trás da artéria coronária descendente anterior (G) Oclusão da artéria coronária descendente anterior (H) Reposicionamento do coração (I) Fechamento da sutura em bolsa.

Após o período operatório, os animais foram acondicionados em mesa aquecida com máscara de oxigênio posicionada na face e foram observados pela condição clínica pós-cirúrgica e pós-anestésica. Após a completa recuperação, foram recolocados em suas caixas, alojados no biotério e mantidos com água e ração *ad libitum*.

Durante todo o período pós-operatório foi realizada avaliação clínica diária dos animais, a fim de monitorar a evolução, bem como reforçar a numeração na cauda. A ferida cirúrgica foi limpa diariamente com auxílio de gaze e solução fisiológica 0,9% até completa cicatrização. Os animais receberam para controle da dor analgésico opióide morfina 2mg/kg duas vezes ao dia no pós-operatório imediato (24 horas), anti-inflamatório não esteroidal flunexim meglumine 2,5mg/kg duas vezes

ao dia durante 4 dias e antibiótico terapia com enrofloxacin 10mg/kg uma vez ao dia durante 4 dias via IM.

#### **4.9.4 Avaliação por ecocardiografia da função cardíaca após a indução da miocardiopatia isquêmica**

No sétimo dia após a indução da MI por ligadura da artéria descendente anterior foi realizada a avaliação ecocardiográfica pelo equipamento de ecocardiografia (SONOS 55, Agilent Technologies, Inc. Massachusetts, USA), com o uso de transdutores de alta frequência e alta resolução.

Os animais foram anestesiados via injeção intramuscular entre o músculo semitendinoso e semimembranoso no membro pélvico com cloridrato de ketamina (König) 50 mg/kg e cloridrato de xylazina 5 mg/kg. Foram recolocados nas caixas e acompanhado o estado anestésico sem que se observe qualquer reação do animal.

Após os animais foram tricotomizados com o auxílio do aparelho de tricotomia na região ventral do abdômen e do tórax e foram acondicionados na mesa.

Foi realizado o monitoramento dos animais nas derivações periféricas com três eletrodos pediátricos, obtendo-se a frequência cardíaca com visibilização cardioscópica.

O transdutor foi colocado na porção ântero-lateral esquerda da parede torácica, as imagens foram vistas em duas dimensões, e as câmaras ventriculares observadas em dois cortes, o transversal e o longitudinal.

Foram analisados os parâmetros: fração de ejeção (FE), volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDVE), volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSVE), área diastólica final do ventrículo esquerdo (ADVE) e área sistólica final do ventrículo esquerdo (ASVE) e o tipo de contratilidade nas paredes do ventrículo esquerdo (normal, hipocinesia, acinesia ou discinesia) em três ciclos cardíacos consecutivos. A imagem foi visualizada no monitor e registrada em fita videocassete (Figura 16).

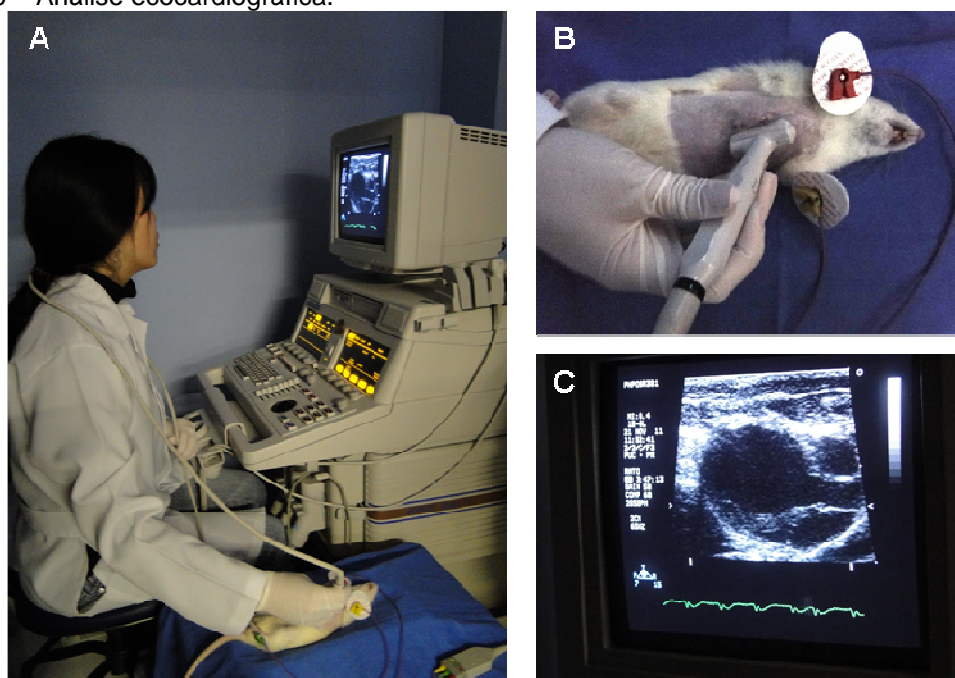
A área do ventrículo esquerdo, o comprimento e o volume foram medidos pelo método de Simpson, utilizando o *software* do computador, tanto na sístole como na diástole, o comprimento sempre em seu maior eixo (da base para o ápex) e a área por delimitação das paredes do ventrículo esquerdo.



Somente foram incluídos no estudo os animais que apresentaram FE menor que 40%, justamente para caracterizar disfunção ventricular.

Todas as medidas foram feitas no mesmo aparelho e foram realizadas três vezes pelo mesmo profissional, que desconhecia a procedência dos animais e os grupos experimentais aos quais eles pertenciam, sendo considerada a média como resultado final.

Figura 16 – Análise ecocardiográfica.



Fonte: a autora, 2012

Legenda: (A) Visão geral do procedimento. (B) Animal no momento do exame (C) Imagem gerada.

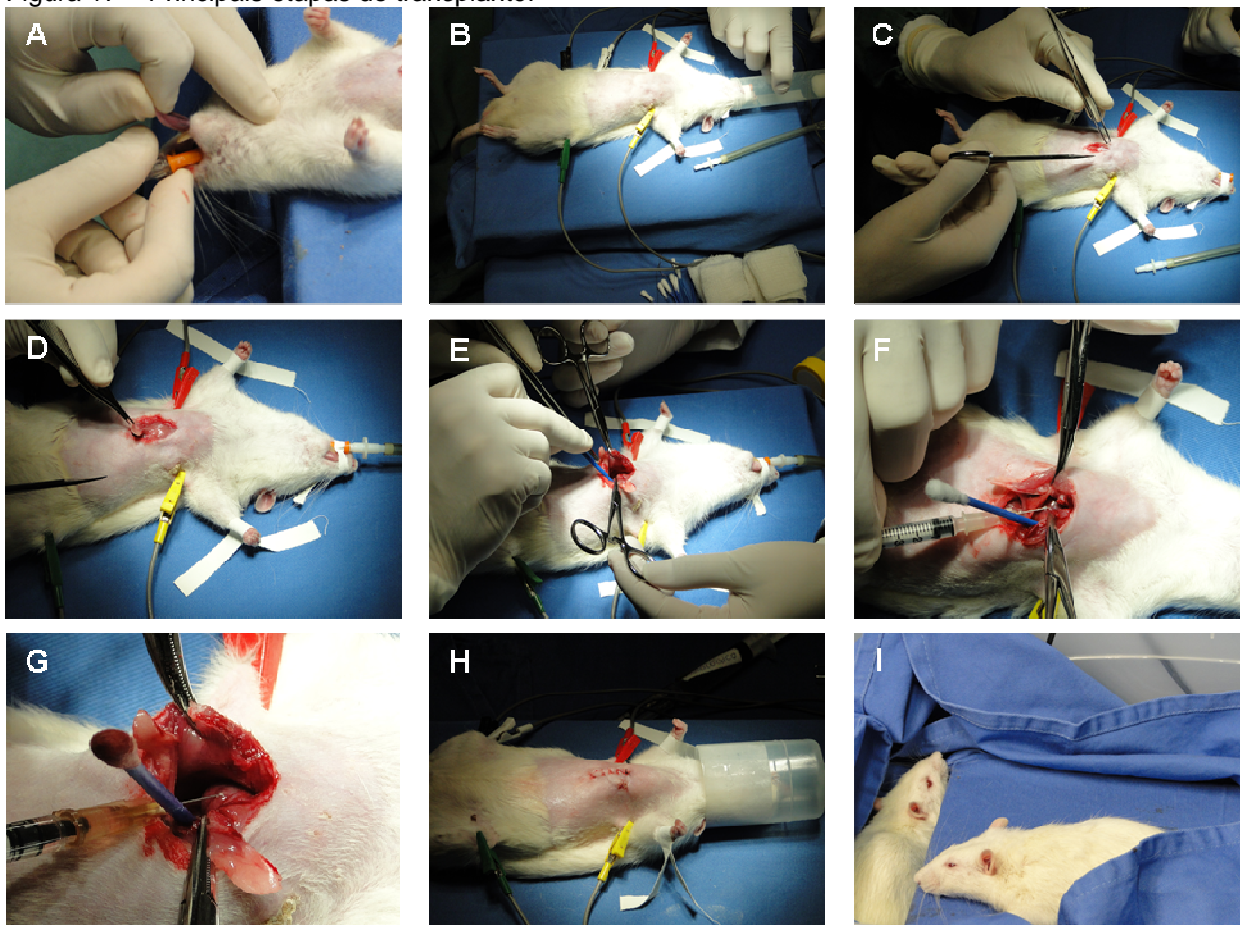
#### 4.9.5 Transplante de células

A indução anestésica foi feita por inalação de vapor de halotano, conforme descrito anteriormente. O animal foi posicionado para receber a medicação pré-anestésica via injeção intramuscular na face interna da pata direita de sulfato de atropina 40 $\mu$ g/kg, cloridrato de Petidina 10 mg/kg, cloridrato de cetamina 12,9 mg/kg e Diazepam 1,25 mg/kg.

A intubação endotraqueal foi realizada sob visão direta com auxílio de cateter de látex. A partir dessa etapa, a ventilação do animal foi por via endotraqueal controlada em sistema de ventilação circular fechado (Harvard<sup>®</sup> Inc., Massachusetts, USA) com volume minuto de 150 mL/min e frequência respiratória de 60 a 80 ciclos por minuto.

Foi realizada uma nova incisão da pele, seguida do divulsionamento dos músculos da região e toracotomia ântero-lateral no 3º espaço intercostal esquerdo. Após a colocação do afastador autostático, o coração foi exposto e foi visualizada a área infartada pela diferença na coloração, na contratilidade e com aspecto cicatricial. No centro desta área, foi realizada uma injeção de  $2 \times 10^6$  células diluídas em 200  $\mu$ L de meio de cultura IMDM, através de uma seringa de 1mL e agulha 13x0,38. Em seguida, foi realizada a sutura da musculatura intercostal com fio cirúrgico de prolipopileno 5-0 e a pele com fio cirúrgico de Nylon 4-0 e o animal foi extubado (Figura 17). Os cuidados pós-cirúrgicos e pós-anestésicos foram os mesmos descritos para a miocardiopatia isquêmica, além da aplicação intramuscular de antibiótico.

Figura 17 – Principais etapas do transplante.



Fonte: a autora, 2012

Legenda: (A) intubação endotraqueal (B) manutenção anestésica (C) incisão da pele (D) divulsionamento dos músculos da região (E) toracotomia ântero-lateral no 3º espaço intercostal esquerdo (F) exposição do coração (G) transplante (H) sutura (I) mesa aquecida.

#### 4.9.6 Avaliação por ecocardiografia da função cardíaca após o transplante

Após 30 dias da realização do transplante a função cardíaca foi avaliada por ecocardiografia, onde foram analisados os mesmos parâmetros para o procedimento ecocardiográfico descrito anteriormente.

#### 4.9.7 Eutanásia

No trigésimo dia pós-transplante, após a realização da avaliação ecocardiográfica, os animais foram submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca, onde os corações foram fixados e retirados para análise histopatológica.

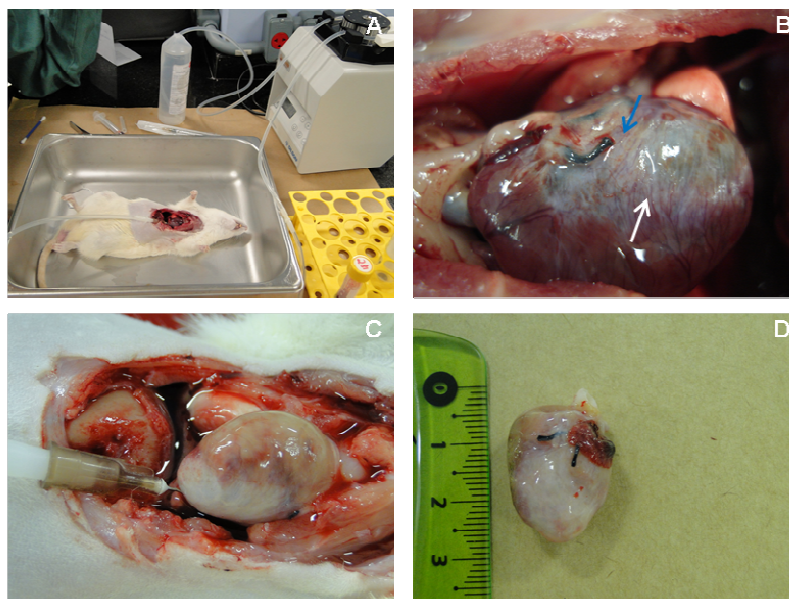
Os animais foram sedados via injeção intramuscular entre o músculo semitendinoso e semimembranoso no membro pélvico de cloridrato de ketamina 300 mg/Kg e cloridrato de xylazina 30 mg/kg.

O sistema de perfusão foi constituído por um banho de gelo no intuito de manter as soluções de perfusão refrigeradas, uma bomba peristáltica de 3 canais (Minipuls 3, Gilson Medical Electronics, França) e tubo peristáltico de PVC.

O animal foi colocado em uma bandeja de inox, foi realizada uma nova incisão da pele, seguida do divulsionamento dos músculos da região e toracotomia ântero-lateral. O coração foi exposto e uma agulha de 13mm x 0,45mm foi inserida no ventrículo esquerdo.

Primeiramente foi feita a infusão de 300 mL de solução isotônica de cloreto de sódio 0,9% por 10 minutos para remover o sangue, preservando ao máximo a estrutura dos vasos sanguíneos. O fluxo foi ajustado para 30 mL por minuto com rotação de 35 RPM. Em seguida foi realizada perfusão de 300 mL da solução de paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato por 15 minutos que proporcionou a fixação dos tecidos. O fluxo foi ajustado para 20 mL por minuto com rotação de 32 RPM. Após a finalização do procedimento o coração foi cuidadosamente removido do tórax com auxílio de tesoura e pinça e foi acondicionado em tubo com solução de formol a 10% (Figura 18).

Figura 18 – Eutanásia por perfusão transcardíaca.



Fonte: a autora, 2012.

Legenda: (A) Visão geral do procedimento (B) Aspecto do coração antes da perfusão. Seta azul: nó cirúrgico da oclusão; seta branca: área infartada. (C) Aspecto do coração durante a perfusão (D) Aspecto do coração após o procedimento de perfusão.

Tabela 6 – Relação da medicação utilizada nos procedimentos de indução da miocardiopatia isquêmica, ecocardiografia pré e pós-transplante, transplante e eutanásia.

Procedimento	Etapa	Medicamento	Função	Dose/via	Tempo	
<b>Indução do Infarto do Miocárdio</b>	Medicação pré-anestésica	Meperidina	Analgésico opióide	10 mg/kg/IM	-	
	Medicação pré-anestésica	Sulfato de atropina	Inibir estimulação vagal e bradicardia, reduzir secreções traqueobrônquica, broncodilatação	40 µg/kg/IM	-	
	Indução e manutenção anestésica	Halotano	Anestésico Geral Inalatória	Conforme necessidade para obter plano anestésico-cirúrgico	-	
	Analgesia pós-operatória	Morfina	Analgésico opióide	3 mg/kg/SC	8 horas por 48 horas	
	Analgesia pós-operatória	Flunexim meglumine	Anti-inflamatório, analgesia	2,5 mg/kg/SC	12 horas por 48 horas	
	Antibióticoterapia	Enrofloxacina	Antibiótico	10 mg/kg/IM	uma vez ao dia por 4 dias	
<b>Ecocardiografia Pré e Pós-Transplante</b>	Sedação	Cloridrato de ketamina	Contenção química	50 mg/kg/IM	-	
	Sedação	Cloridrato de xylazina	Contenção química	5 mg/kg/IM	-	
<b>Transplante</b>	Medicação pré-anestésica	Sulfato de atropina	Inibir estimulação vagal e bradicardia, reduzir secreções traqueobrônquica, broncodilatação	40 µg/kg/IM	-	
	Medicação pré-anestésica	Meperidina	Analgésico opióide	10 mg/kg/IM	-	
	Medicação pré-anestésica	Cloridrato de cetamina	Anestesia dissociativa, analgesia;	12,5 mg/kg/IP	-	
	Medicação pré-anestésica	Diazepam	Ansiolítico, tranquilizante, miorelaxante, amnésia	1,25 mg/kg/IP	-	
	Indução e manutenção anestésica	Halotano	Anestésico Geral Inalatória	Conforme necessidade para obter plano anestésico-cirúrgico	-	
	Analgesia pós-operatória	Flunexim meglumine	Anti-inflamatório, analgesia	2,5 mg/kg	a cada 12 horas por 48 horas	
	Morfina	Analgésico opióide	Analgesia pós-operatória	3 mg/kg/SC	a cada 8 horas por 48 horas	
	Antibióticoterapia	Enrofloxacina	Antibiótico	10 mg/kg/IM	uma vez ao dia por 4 dias	
	<b>Eutanásia</b>	Anestesia	Cloridrato de ketamina	Plano anestésico profundo	300 mg/kg/IM	-
		Anestesia	Cloridrato de xylazina	Plano anestésico profundo	30 mg/kg/IM	-
Promover total inconsciência		Halotano	Plano anestésico profundo	Administração até assistole	-	
Assitole		Cloridrato de Potássio	Inibi a despolarização celular	2 mL/IP	-	

#### 4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a realização da fixação por perfusão de paraformaldeído, os corações foram clivados com o auxílio de uma navalha de aço em quatro partes por cortes paralelos da base ao ápice. Os cortes foram acondicionados em cassetes para histologia.

O processamento histológico foi realizado pelo Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. O processamento foi realizado no equipamento histotécnico (Leica TP1020) onde foi realizada a desidratação dos tecidos em banho de álcool 70°, álcool 80° e álcool 90°. Em seguida foi realizado o processo de diafanização em três banhos de xilol. Em seguida foram realizadas três trocas de parafina líquida aquecida a 65°C. Para confeccionar o bloco de parafina utilizou-se o equipamento Inclusor (Leica EG1160). Após a inclusão foi realizada a microtomia dos blocos no micrótomo (Leica RM2145). Os cortes histológicos foram seccionados com espessura entre 4 e 5 micras, colocados em banho histológico a 50°C, posicionados na lâmina, que foram secadas em estufa a 60°C por uma hora.

Figura 19 – Blocos de parafina contendo os fragmentos do coração.



Fonte: a autora, 2012

As lâminas foram usadas para verificar, comprovar a extensão do infarto e comparar os resultados obtidos na área infartada dos grupos quanto a deposição de colágeno no tecido isquêmico.

##### 4.10.1 Hematoxilina-Eosina

Os cortes corados pelo hematoxilina-eosina foram usados para identificação da área afetada com ou sem afinamento de suas paredes ou até mesmo hipertrofia

compensatória. Os núcleos foram corados em azul e o citoplasma, as fibras colágenas e elásticas em rosa.

#### 4.10.2 Tricrômio de Masson

Os cortes corados com Tricrômio de Masson foram utilizados para identificação da região infartada por sua especificidade para observação do colágeno. A área do infarto nos diferentes grupos experimentais foi calculada em cortes submetidos à coloração de tricrômio de masson e definida como porcentagem do ventrículo esquerdo positivo para marcação de colágeno, indicando a presença e a extensão de zona cicatricial em relação à área total do ventrículo esquerdo. A coloração das lâminas em tricrômio de Masson foi feita conforme metodologia do fabricante (EasyPath®). Resumidamente, as lâminas foram desparafinizadas em xilol, em seguida foram hidratadas em álcool e lavadas com água destilada. O corte foi coberto com hematoxilina de Weigert por 10 minutos, a lâmina foi lavada e foi adicionado ácido pícrico por 6 minutos. A lâmina foi lavada e foi adicionado Fucsina por 4 minutos. A lâmina foi novamente lavada e foi adicionado ácido fosfomolibdica por 5 minutos, seguida da solução de azul de anilina. Após, as lâminas foram lavadas, desidratadas em série de álcool ascendente até o xilol e montadas com meio de montagem e lamínula. As fibras colágenas foram coradas em azul e o restante do tecido em vermelho.

#### 4.10.3 Picrosírius red

Para a quantificação dos diferentes tipos de colágeno foi utilizado a coloração de Picrosirius Red, um composto aniônico que distingue a espessura e densidade das fibras de colágeno pela coloração emitida sob a luz polarizada. Enquanto as fibras finas dissociadas típicas do colágeno tipo III são esverdeadas, as fibras mais grossas fortemente associadas do colágeno tipo I emitem cores com comprimento de ondas maiores, como vermelho e amarelo (291, 292).

A coloração das lâminas em picrosírius red foi feita conforme metodologia do fabricante (EasyPath®). Resumidamente, as lâminas foram posicionadas em berço de coloração e submetidas aos processos de desparafinização em xilol, em seguida foram hidratadas em álcool e lavadas com água destilada. O corte foi coberto com a

coloração de picosírius por 1 hora. Em seguida as lâminas foram lavadas e foi adicionado hematoxilina de Carrazzi por 4 minutos. Após, as lâminas foram lavadas, desidratadas em série de álcool ascendente até o xilol e montadas com meio de montagem e lamínula.

As lâminas foram avaliadas sob microscopia de luz normal e luz polarizada em microscópio óptico com objetiva de 20 vezes (Olympus®). Após a observação do campo na área da lâmina corada pelo Picosirius red foi realizada a polarização para quantificação de colágeno, assim como sua classificação quanto à maturação. Realizou-se a análise das imagens por morfometria mediante o aplicativo Image Pro-Plus versão 4.5 para Windows (RGB), em computador da linha Pentium III 733MHz. Nesse programa foi possível identificar o tipo de colágeno baseado em cores. Vermelho e amarelo correspondem a colágeno tipo I (maduro), enquanto o verde corresponde ao colágeno tipo III (imaturo). De cada lâmina corada em Picosirius Red foram obtidas 10 imagens digitalizadas em microscópio de luz com objetiva planacromática de 20x, utilizando-se de filtros de luz polarizada e em campo claro. A quantidade de fibras avermelhadas, amareladas e esverdeadas presentes nos cortes histológicos permitiu a realização do cálculo do percentual da área do campo examinado ocupada por estas fibras. O valor de colágeno total correspondeu à soma dos valores das áreas vermelhas, amarelas e verdes. A análise das imagens obtidas em campo claro possibilitou o cálculo da quantidade total de colágeno presente no tecido cardíaco.

#### 4.11 LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRANSPLANTADAS POR HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA

A localização das células transplantadas foi realizada por meio da técnica de FISH (do inglês *fluorescence in situ hybridization*) que detecta sequências específicas de ácidos nucleicos em cromossomos, células e tecidos morfológicamente preservados, utilizando sonda de DNA marcada com fluorescência. A sonda de DNA reconhecerá e se hibridizará com sua sequência complementar no cromossomo das células humanas.



O protocolo para realização do FISH foi realizado com adaptações ao preconizado pelo fabricante da sonda, bem como pelo proposto por Henegariu (293, 294).

Foram realizados cortes de 3 a 5  $\mu\text{m}$  em lâminas silanizadas. As lâminas ficaram 2 horas na estufa a 60°C para ajudar a fixar o corte. Foi realizada a desparafinização em banho com xilol por 15 minutos, seguido por banho em solução de xilol / álcool absoluto por 10 minutos e por último banho com álcool absoluto por 10 minutos a temperatura ambiente. A digestão enzimática do tecido foi realizada em banho com a solução de proteinase K a 50°C por 25 minutos. Após a lâmina foi lavada em PBS por 3 minutos e foi desidratada com álcool 70% por 5 minutos e com álcool absoluto por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 10 $\mu\text{L}$  da sonda pan-centromérica humana em vermelho (Kreatech KBI-20000R) na área de interesse e a co-desnaturação foi realizada em banho-maria a 90°C por 10 minutos. As lâminas foram acondicionadas em hibridizador a 37°C *overnight*. Durante esse período, a sonda ligou-se à região alvo do cromossomo e ocorreu a hibridização. Após a hibridização a lâmina foi colocada em banho-maria a 73°C por 2 minutos em solução de 2xSSC + 0,3 de igepal. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em solução 2xSSC + 0,1 de igepal a temperatura ambiente para retirar o excesso de sonda. A contra coloração foi feita com DAPI por 10 minutos. Após, as lâminas foram lavadas com 2x água destilada, centrifugadas a 438g por 10 minutos e a montagem foi feita com meio de montagem e uma lamínula retangular.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM4000) acoplado a uma câmera digital com programa de captura e processamento de imagens (Leica LAS AF).

#### 4.12 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS ANGIOGÊNICAS NO SANGUE PERIFÉRICO POR ARRANJOS DE ANTICORPOS

A presença de fatores de crescimento e citocinas angiogênicas humanas no sangue periférico dos animais transplantados foi analisada por meio de arranjo de anticorpos (RayBio™Raybiotech). O controle negativo foi feito com o sangue periférico de animais sadios e o controle positivo com o sangue periférico humano.

Resumidamente, as membranas foram bloqueadas por 30 min em uma solução contendo 5% de BSA, 0,01 M de Tris com 0,15M NaCl (pH7,6). Em seguida foram incubadas por 2h com 1mL do soro em temperatura ambiente. Após lavagem, as membranas foram incubadas por 15h com anticorpos anti-citocinas e anti-fatores de crescimento conjugados a biotina à 4°C. As membranas foram novamente lavadas e incubadas por 2h com estreptavidina conjugada com peroxidase em temperatura ambiente. Mais uma vez foram repetidas as etapas de lavagem e em seguida as membranas foram incubadas com 1mL de reagente de detecção (preparado com volumes iguais de buffer de detecção A e B) por 5-10 min. Em seguida, as membranas foram expostas ao filme Kodak x-omat (Kodak®) para revelação dos *spots* (Figura 20).

As análises da expressão foi realizada pelo programa de análise de Imagem ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

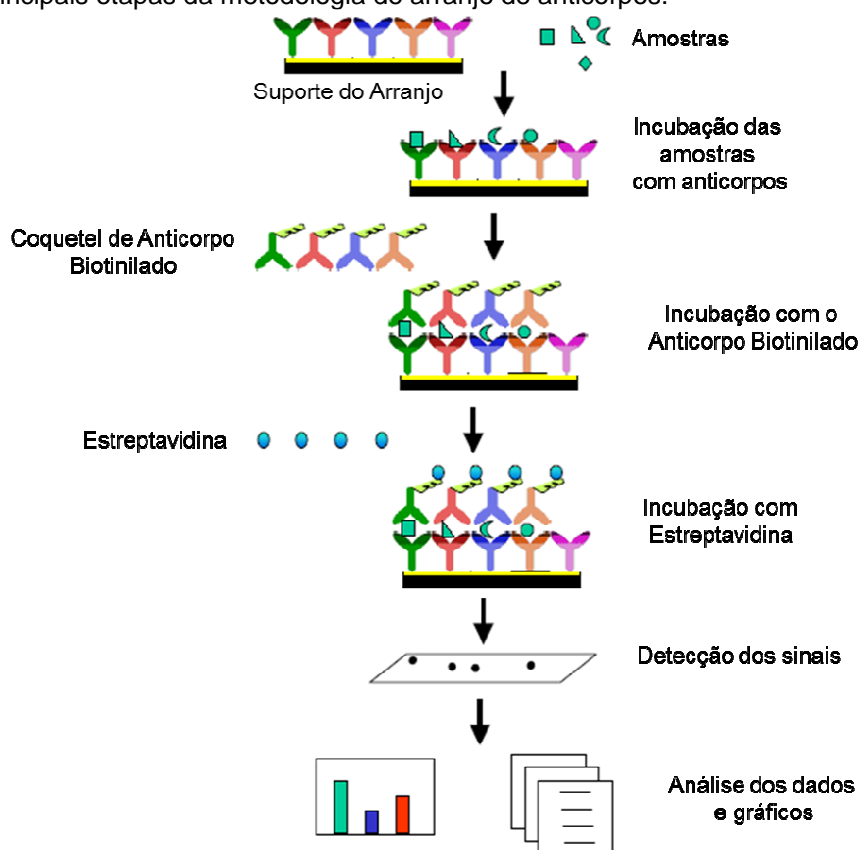
Para a análise e normalização dos resultados, as membranas possuem *spots* correspondentes a controles positivos, controles negativos e *spots* “vazios” para determinar os valores de *background*.

Os filmes foram escaneados e as imagens em TIFF foram copiadas para um *software* (ScanAlyze versão 2,5- [www.graphics.stanford.edu/software/scanalyze](http://www.graphics.stanford.edu/software/scanalyze)) que mede a intensidade dos *spots*.

Os valores das intensidades dos *spots* foram importados do ScanAnalyze para o software de análise fornecido pelo próprio fabricante dos arranjos (Raybio® Analyzis Tool Software).

Os dados foram alinhados de acordo com o mapa, e os cálculos realizados pelo *software* consistem em subtrair os valores de *backgrounds* e calcular em relação à média do controle positivo.

Figura 20 – Principais etapas da metodologia de arranjo de anticorpos.



Fonte: RayBiotech™. Adaptado de: <http://www.raybiotech.com/manual/antibody%20array/AAH-ANG-G.pdf>

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas avaliadas no momento pré, foi considerado o modelo de análise de variância com um fator (ANOVA). Para as comparações dos grupos em relação às avaliações pós e em relação às diferenças ocorridas entre pré e pós, foi usado o modelo de análise de covariância (ANCOVA) incluindo a avaliação pré como covariável. Para a comparação dos momentos de avaliação pré e pós, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 COLETA DE SANGUE E CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Foram coletados 37 cordões umbilicais. Para estabelecer o protocolo do isolamento de CPE e CTM foram utilizados 12 cordões. Dois cordões foram descartados por baixo volume, totalizando 23 utilizados para a realização dos experimentos.

O comprimento dos segmentos coletados foi, em média,  $21,10 \pm 4,52$  centímetros. A idade média das doadoras foi de  $31 \pm 7,01$  anos. O SCUh foi coletado no volume médio de  $94,4 \pm 42,30$  mL.

Tabela 7 – Dados da coleta de CUh e SCUh.

<b>Nº Cordão</b>	<b>Doadora</b>	<b>Tamanho (cm)</b>	<b>Volume (mL)</b>
13	MGPB	17	45
14	MGPB	16	40
15	BCS	21	120
17	DSL	19	90
18	KRL	19	90
19	RMD	17	90
20	RSA	21	150
21	ACFP	22	170
22	PFS	27	142,5
24	VGS	21	165
25	DRD	20	82
26	RA	27	177
27	DM	25	75
28	MASM	15	116
29	AGP	18	60
30	GAR	31	69
31	APA	11,5	44
32	SAO	21	41
33	ACEC	20	81
34	MTSC	24	116
35	SR	26	90
36	DFS	26	92,5
37	EAM	21	119

Legenda: cm = centímetro; mL = mililitro.

## 5.2 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES PROVENIENTES DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

O processamento foi iniciado em, no máximo, 12 horas após a coleta. As células mononucleares foram obtidas do SCUh. Foram realizados 23 isolamentos que resultaram em média  $26,74 \times 10^6 \pm 19$  células mononucleares.

Tabela 8 – Dados dos isolamentos de células mononucleares provenientes do SCUh.

<b>Nº Cordão</b>	<b>Nº de Células <math>\times 10^6</math></b>
13	3,4
14	1,8
15	64
17	41
18	18,5
19	70
20	21
21	25
22	10,5
24	17,7
25	44,5
26	6,5
27	48
28	12,25
29	35,25
30	12,5
31	28
32	25,5
33	48,5
34	28
35	13,5
36	34,25
37	13

### 5.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS PROVENIENTES DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Após obter a fração de células mononucleares foi iniciado o isolamento de células 133<sup>+</sup> que resultou em média  $17,26 \times 10^5 \pm 19,67$ .

Tabela 9 – Dados dos isolamentos de células 133<sup>+</sup> provenientes do SCUh.

<b>Nº Cordão</b>	<b>Nº de Células 133<sup>+</sup> x10<sup>5</sup></b>
13	2,3
14	2,2
15	62,5
17	32,5
18	5
19	37,5
20	7,6
21	15
22	5
24	6,5
25	27,5
26	2
27	20
28	7
29	10
30	5
31	12,5
32	14
33	16,5
34	8
35	6
36	80
37	12,5

Testou-se a hipótese nula de que não existe correlação entre as duas variáveis avaliadas, versus a hipótese alternativa de que existe correlação. Os resultados são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 10 – Análise da correlação das variáveis do isolamento das células provenientes do SCUh.

	<i>n</i>	<i>Coefficiente de correlação de Spearman</i>	<i>Valor de p</i>
Volume (mL) X Nº de Células mononucleares (x10 <sup>6</sup> )	23	-0,07	0,761
Volume (mL) X Nº de Células 133 <sup>+</sup> (x10 <sup>5</sup> )	23	0,00	0,998

#### 5.4 ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA GELÉIA DE WHARTON PROVENIENTES DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Foram obtidas, em média, 2,9 gramas da GW e foram isoladas, em média,  $5,26 \times 10^6$  células. Para cada grama de GW foram obtidas, em média,  $1,8 \times 10^6$  células.

Tabela 11 – Dados dos isolamentos de CTM provenientes do CUh.

<b>Nº Cordão</b>	<b>Peso da GW (g)</b>	<b>Nº de Células <math>\times 10^6</math></b>
13	3,99	1,35
14	2,62	0,9
15	2,187	0,7
17	18	2,0
18	2,764	1,7
19	1,679	1,9
20	2,262	2,1
21	0,825	0,5
22	2,626	1,5
24	0,98	0,82
25	2,339	4,5
26	3,961	6,0
27	1,45	1,7
28	2,1	3,7
29	1,877	3,5
30	1,569	10
31	0,68	7,2
32	2,064	16
33	4,494	4,0
34	1,913	11
35	2,682	7,5
36	1,184	27,25
37	1,648	5,75

Legenda: g = grama

Testou-se a hipótese nula de que não existe correlação entre as duas variáveis avaliadas, versus a hipótese alternativa de que existe correlação. Os resultados são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 12 – Análise da correlação das variáveis do isolamento das células provenientes do CUh.

	<i>n</i>	<i>Coeficiente de correlação de Spearman</i>	<i>Valor de p</i>
Tamanho (cm) x Peso da GW (g)	23	-0,11	0,621
Tamanho (cm) x Nº de Células ( $\times 10^6$ )	23	0,27	0,217

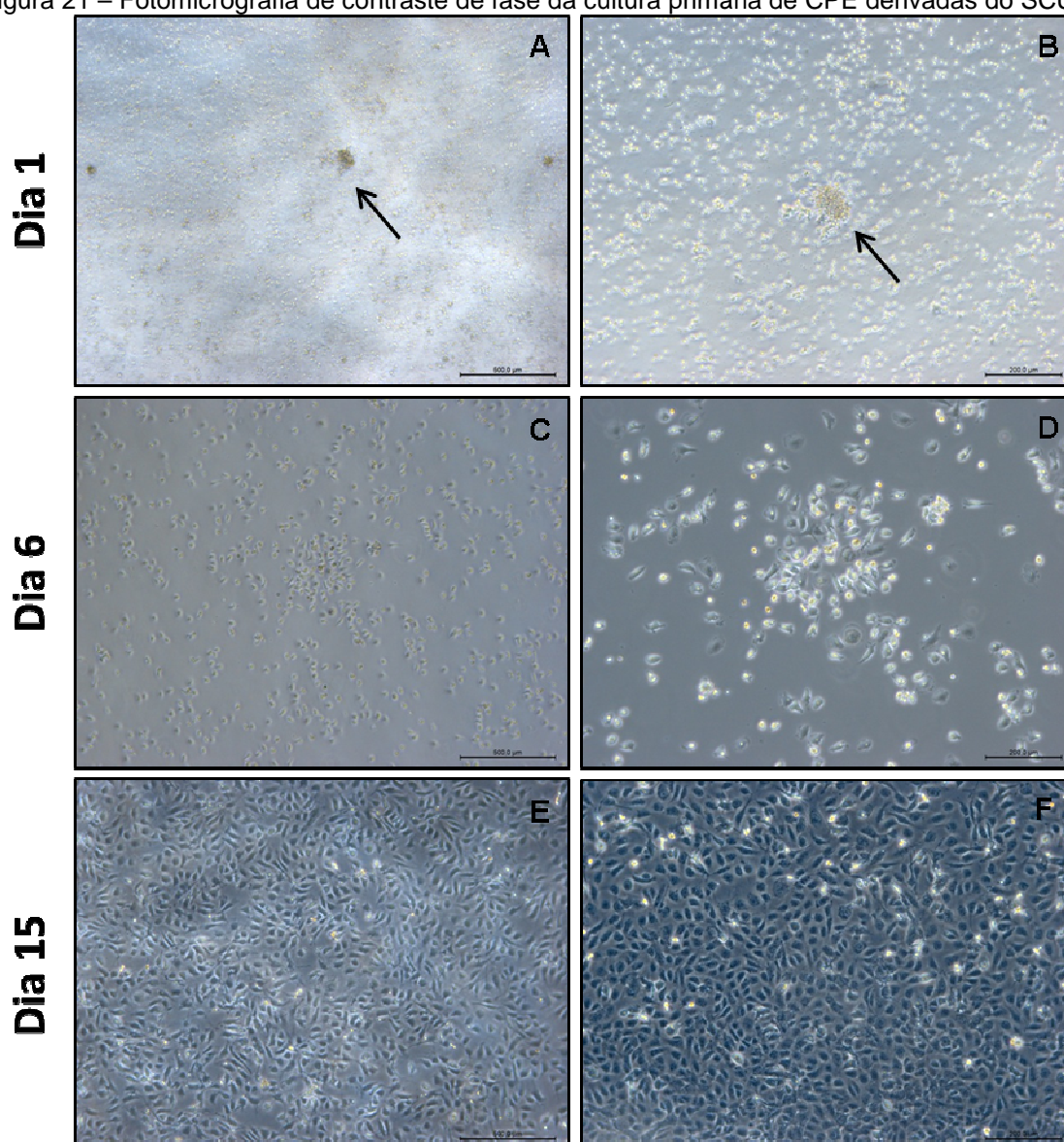
Legenda: g = grama; cm = centímetro

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO CELULAR

### 5.5.1 Análise morfológica das células progenitoras endoteliais

Após 24 horas do plaqueamento foram visualizadas pequenas colônias aderidas ao fundo do frasco de cultura (Figura 21A e 21B). No sexto dia já foi possível identificar colônias com características de células endoteliais (Figura 21C e 21D). No 15º dia, quando as células estavam confluentes, apresentaram morfologia poligonal característica de *cobblestone* ou “calçada de petit-pavé” em passagem 0 (P0) (Figura 21E e 21F).

Figura 21 – Fotomicrografia de contraste de fase da cultura primária de CPE derivadas do SCUh.



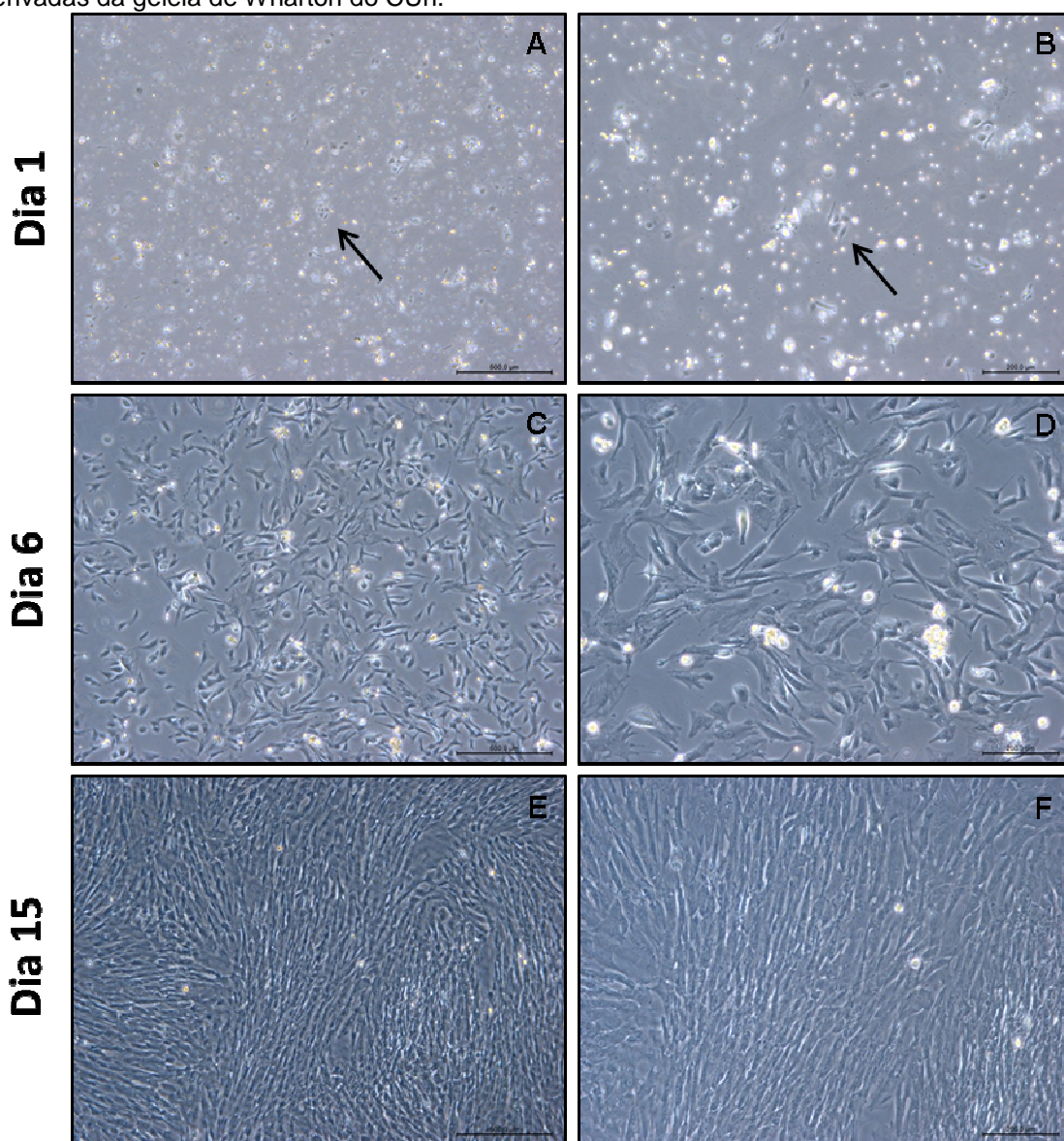
Legenda: Morfologia celular das células aderentes após o isolamento no 1º dia (A e B), no 6º dia (C e D) e no 15º dia (E e F). As setas indicam as colônias formadas no início do cultivo. As fotomicrografias são de uma área representativa dos frascos de cultivo. Barra da escala (A, C e E) = 500µm; Barra da escala (B, D e F) = 200µm.



### 5.5.2 Análise morfológica das células-tronco mesenquimais

Após 24 horas do plaqueamento poucas células estavam aderidas e havia presença de debris celulares devido ao processo de isolamento (Figura 22 A e B), no 6º dia o cultivo apresentou um aspecto homogêneo (Figura 22 C e D), e no 15º dia o cultivo atingiu 90% de confluência (Figura 22 E e F). As células aderentes apresentaram morfologia fibroblastoide, semelhantes as CTM de MO em passagem 0 (P0).

Figura 22 – Fotomicrografia de contraste de fase da cultura primária de células-tronco mesenquimais derivadas da geleia de Wharton do CUh.



Legenda: Morfologia celular das células aderentes após o isolamento no 1º dia (A e B), no 6º dia (C e D) e no 15º dia (E e F). As fotomicrografias são de uma área representativa dos frascos de cultivo. Barra da escala (A, C e E) = 500µm; Barra da escala (B, D e F) = 200µm.

### 5.5.3 Imunofenotipagem de CPE e CTM

As CPE e as CTM cultivadas foram analisadas por citometria de fluxo para quantificar a expressão de antígenos de superfície. Foram realizados 5 experimentos independentes na P3 para as CTM e 3 experimentos independentes na P3 para as CPE. Para cada análise foram adquiridos 100.000 eventos.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo estão expressos em percentual da média de células positivas para cada anticorpo (Tabela 13 e 14). A viabilidade das células analisadas pelo corante vital 7AAD foi de 94,95% para as CTM e 91,7% para as CPE.

O padrão de expressão das células obtidas do SCUh e do CUh sugere a presença de células com imunofenótipos de populações CE e CTM.

Tabela 13 – Perfil imunofenotípico das CTM da GW analisado por citometria de fluxo.

<b>Marcador</b>	<b>Cordão 19</b>	<b>Cordão 27</b>	<b>Cordão 25</b>	<b>Cordão 15</b>	<b>Cordão 11</b>	<b>Média</b>
CD 14	0,013	1,08	2,46	0,057	0,052	0,7324
CD 34	1,32	0,15	0,19	2,67	5,66	1,998
CD 44	87	96,4	73,9	95,2	94,5	89,4
CD 45	0,049	5	13,7	0,13	2,53	4,2818
CD 73	98,8	99	98,5	98	99,1	98,68
CD 90	99,6	96,8	91,4	99,5	99,9	97,44
CD 106	30,6	0,2	11,2	4,9	56,9	20,76
CD 19	2,46	0,24	0,1	4,13	0,59	1,504
CD 105	99,7	-	-	98,3	95,7	97,9
CD 117	65,6	99,8	99,9	0,66	1,06	53,404
HLADR	0,58	0,073	0,19	0,66	1,38	0,5766
7AAD	2,62	3,6	8,6	5,47	4,94	5,046
CD 29	97,5	98,7	97,3	98	98	97,9
CD 31	0,49	0,37	0,049	0,39	1,26	0,5118
CD 166	99,1	89,4	87,6	95	96,7	93,56

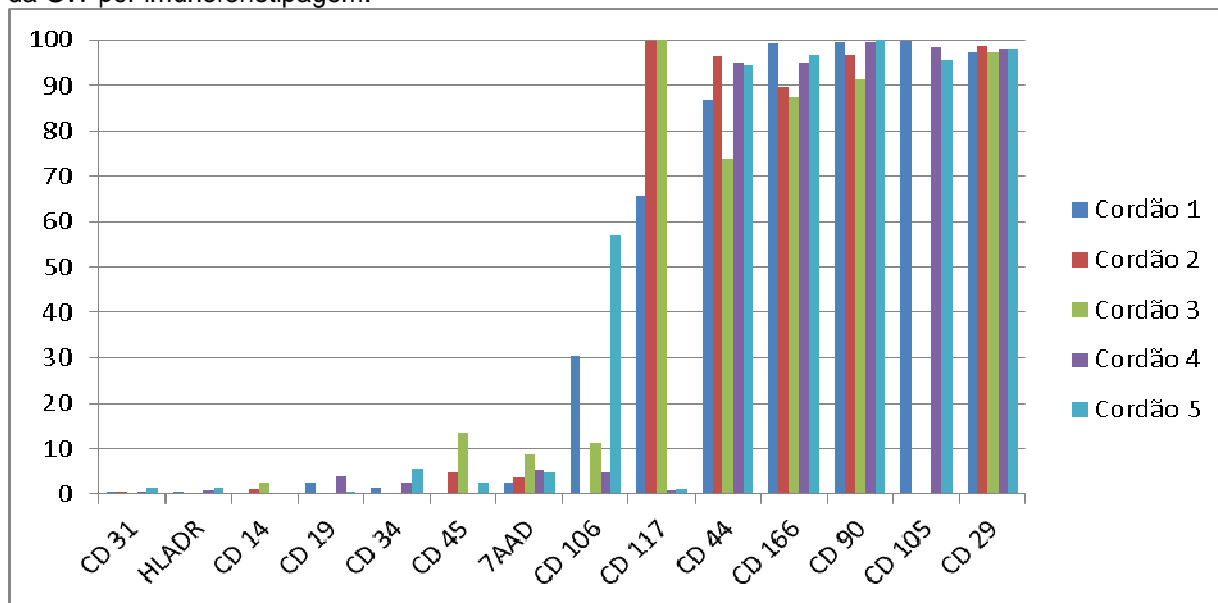
Legenda: Valores expressos em percentual.

Tabela 14 – Perfil imunofenotípico das CPE do SCUh analisado por citometria de fluxo.

<b>Marcador</b>	<b>Cordão 19</b>	<b>Cordão 27</b>	<b>Cordão 25</b>	<b>Média</b>
CD 106	6,97	19,7	12,3	12,99
CD 117	4,43	11,9	5,32	7,21
CD 144	5,34	4,55	5,6	5,16
CD 201	10,9	44,8	75,4	43,7
CD 31	70,2	55,4	61,2	62,26
CD 105	97,6	99,8	99,2	98,86
CD 166	62,8	62,9	75,3	67
CD 309	1,33	1,48	4,38	2,39
CD 29	87,3	97	98,5	94,26
CD 146	71,3	88,6	92,4	84,1
7AAD	10,7	9,73	4,49	8,30
CD 34	0,27	7,4	24,8	10,82
CD 45	1,17	-	0,56	0,865
CD 133	1,70	8,41	6,51	5,54
CD 44	-	0,41	-	0,41

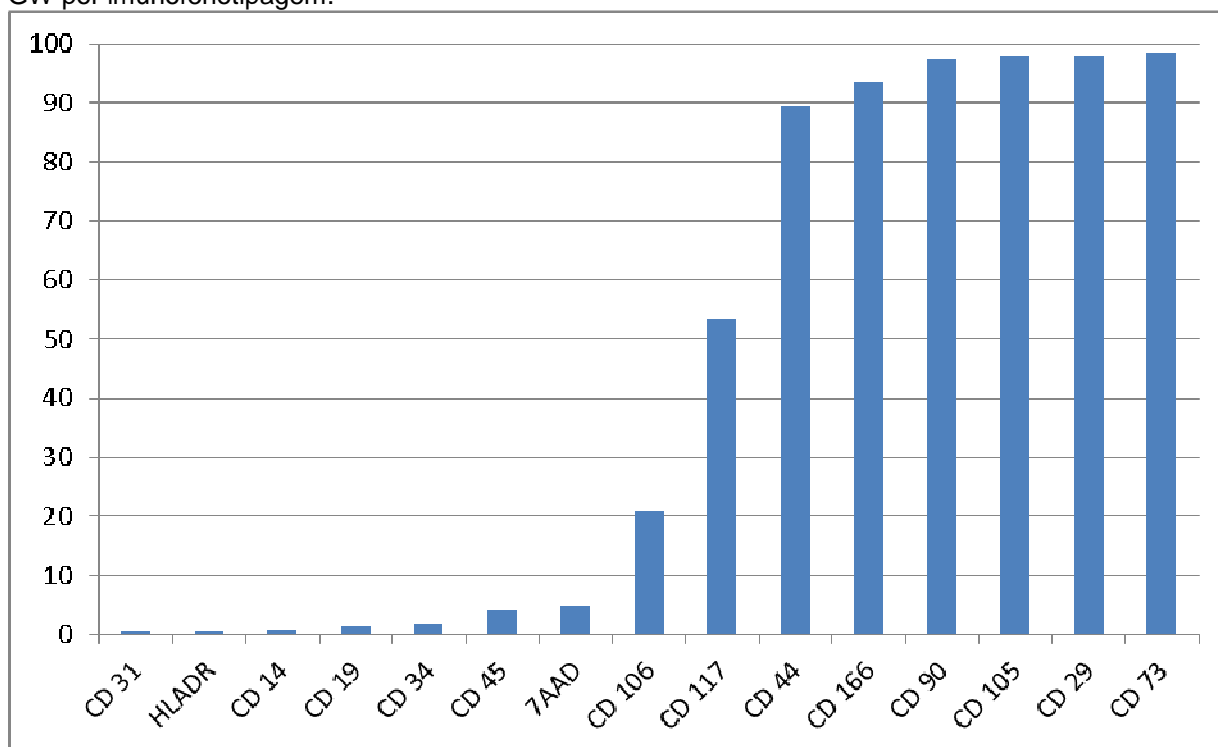
Legenda: Valores expressos em percentual.

Gráfico 1 – Quantificação por amostra da expressão em percentual de moléculas presentes nas CTM da GW por imunofenotipagem.



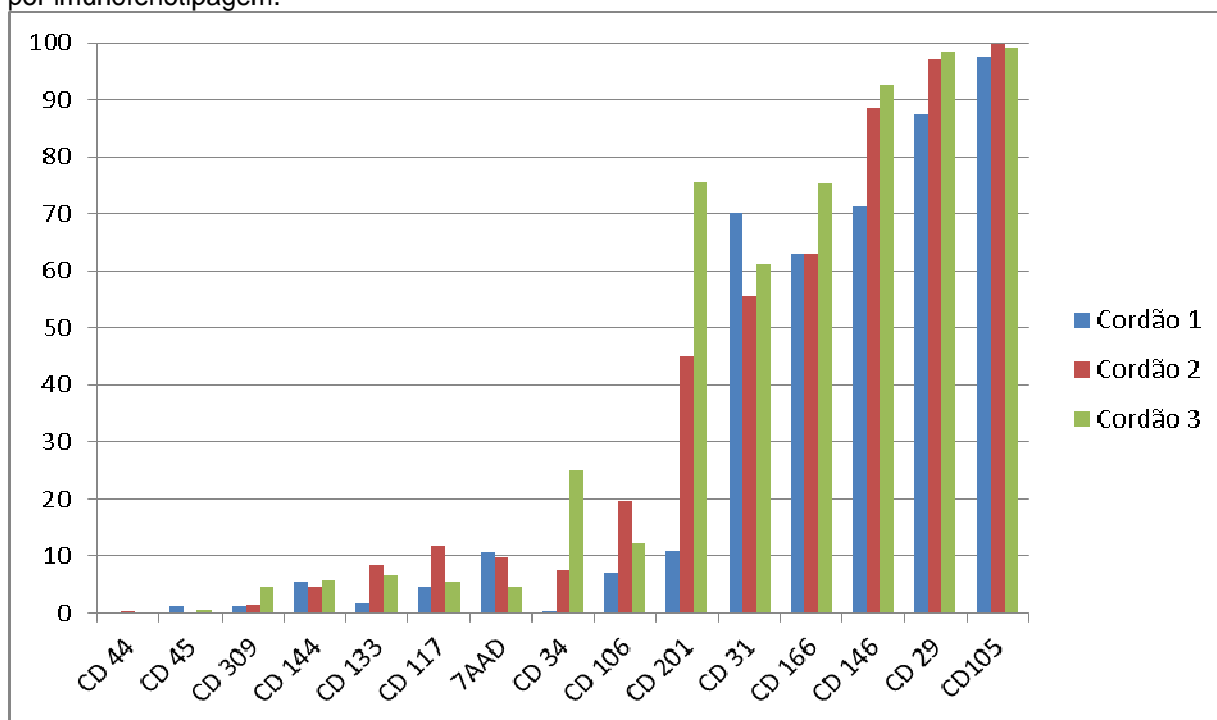
Legenda: Valores expressos em percentual

Gráfico 2 – Quantificação média da expressão em percentual de moléculas presentes nas CTM da GW por imunofenotipagem.



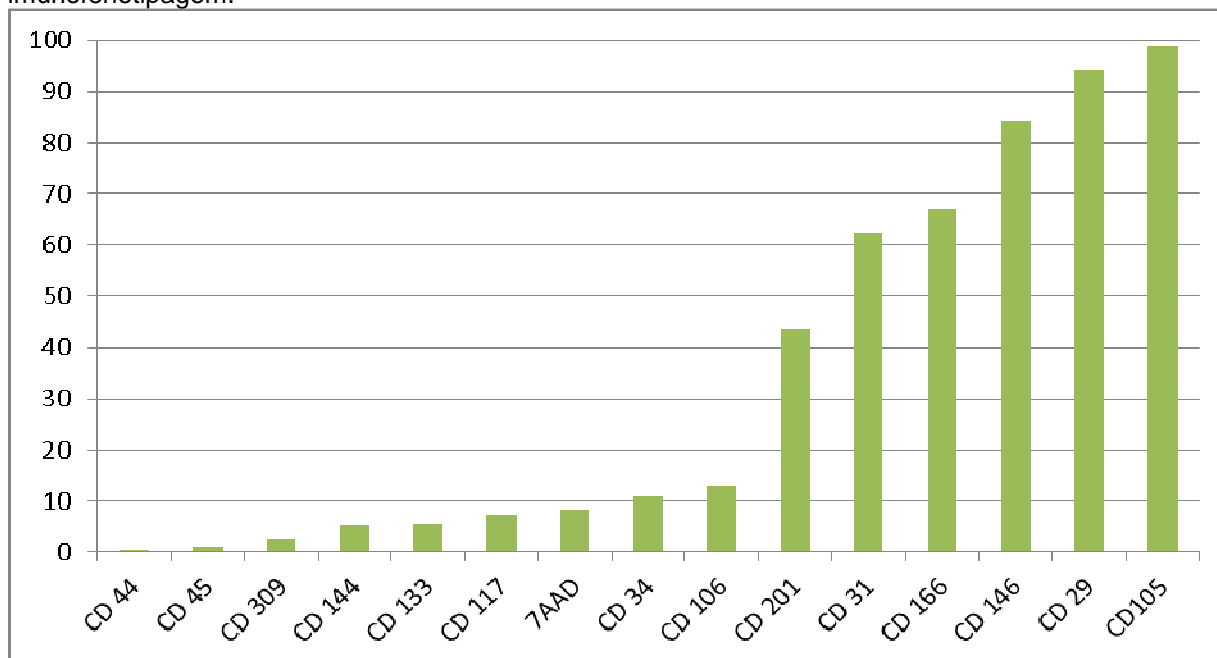
Legenda: Valores expressos em percentual

Gráfico 3 – Quantificação por amostra da expressão em percentual de moléculas presentes nas CPE por imunofenotipagem.



Legenda: Valores expressos em percentual

Gráfico 4 – Quantificação média da expressão em percentual de moléculas presentes nas CPE por imunofenotipagem.

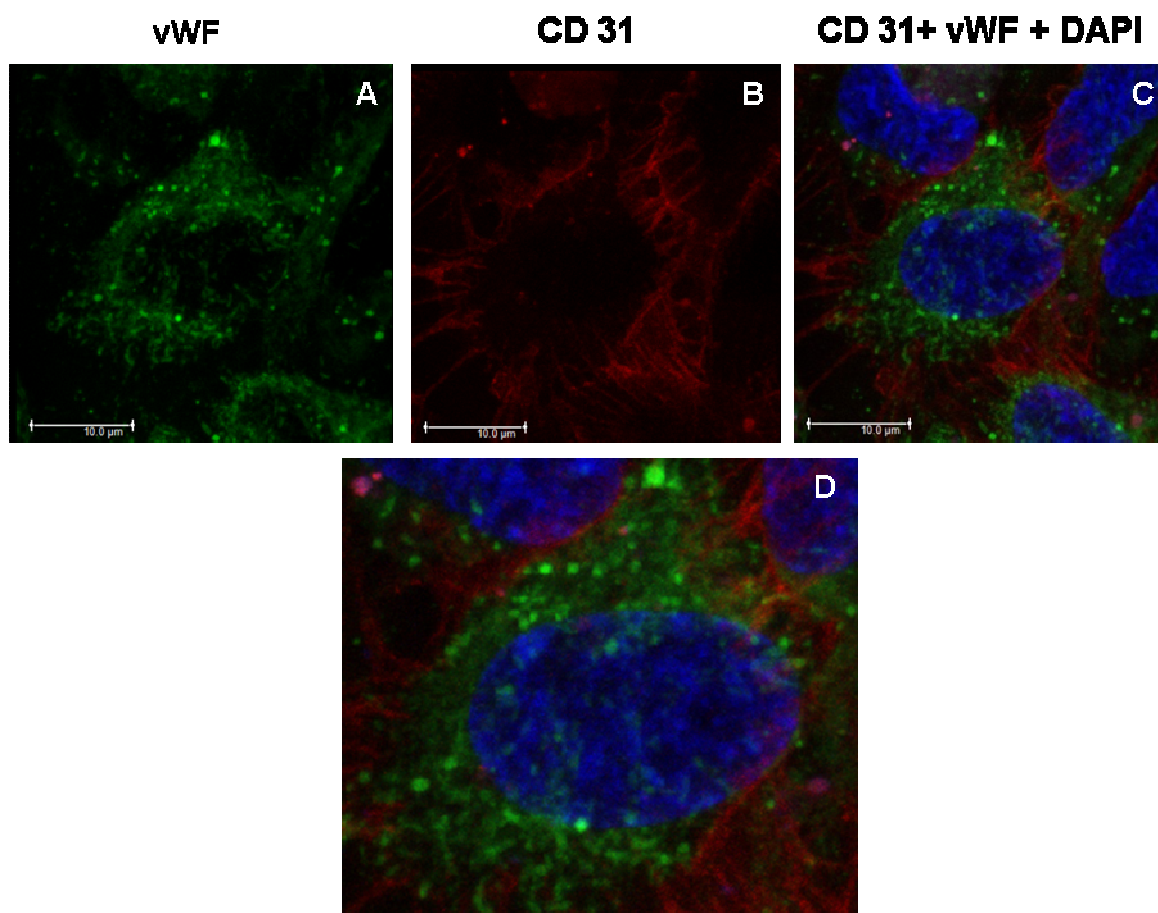


Legenda: Valores expressos em percentual

#### 5.5.4 Imunofluorescência indireta de CPE

A imunofluorescência indireta com dupla marcação demonstrou que as CPE obtidas do SCUh apresentam o fator de Von Willebrand e a molécula de adesão das células endoteliais e plaquetárias (CD31). A reação com o anticorpo primário monoclonal de coelho anti-Von Willebrand humano foi evidenciada por meio do anticorpo secundário ligado à molécula fluorescente FITC. A reação com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-CD31 humano foi evidenciada por meio do anticorpo secundário Texas Red X. Os núcleos foram corados com DAPI. O controle negativo desta reação foi realizado com a incubação de apenas o anticorpo secundário, sem a incubação com o anticorpo primário. Desta maneira verificou-se que a reação do anticorpo secundário não é inespecífica, pois apenas os núcleos foram corados.

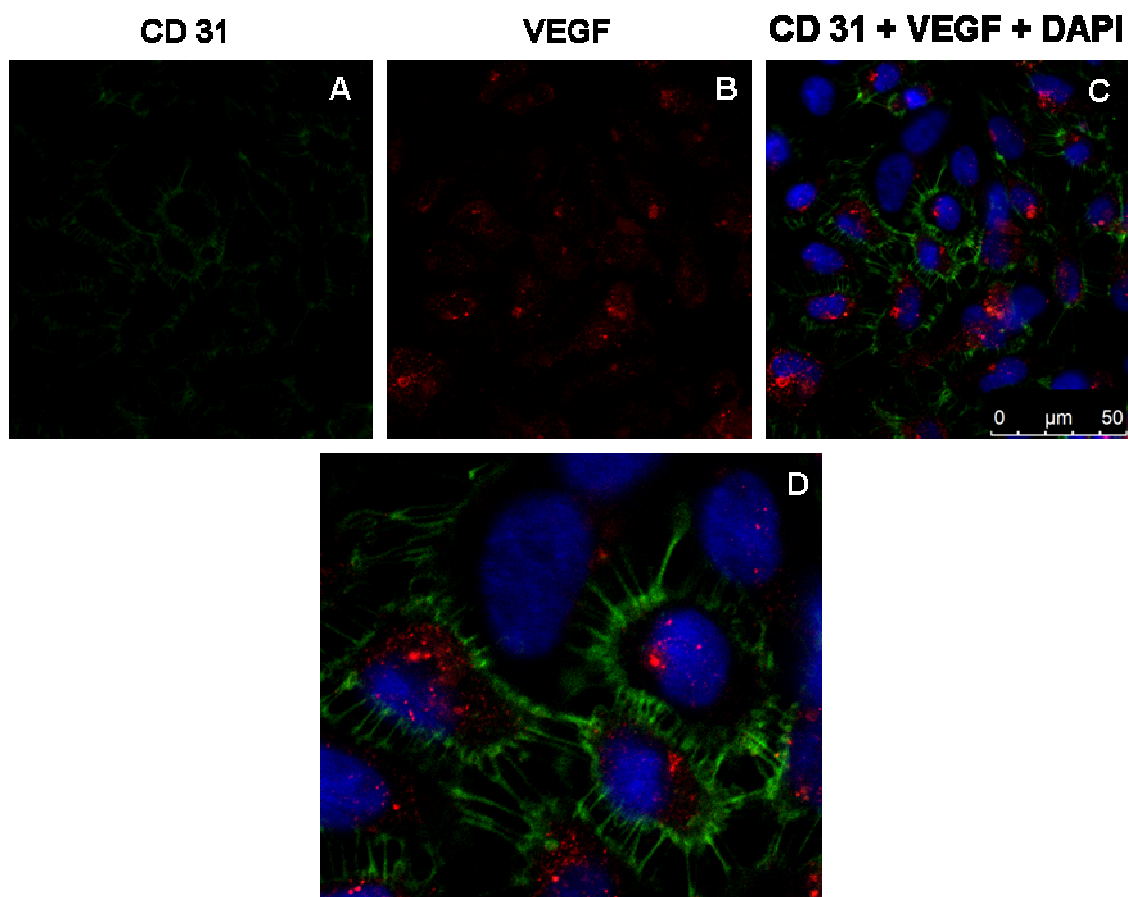
Figura 23 – Imunofluorescência indireta com dupla marcação para vWF e CD31 de células progenitoras endoteliais de sangue de cordão umbilical humano em cultura.



Legenda: (A) vWF FITC (B) CD31 Texas Red (C) vWF+CD31+DAPI (D) Detalhe. Barra da escala= 10µm.

A imunofluorescência indireta com dupla marcação demonstrou que as CPE obtidas do SCUh apresentam a molécula de adesão das células endoteliais e plaquetárias (CD31). A reação com o anticorpo primário monoclonal de coelho anti-CD 31 humano foi evidenciada por meio do anticorpo secundário ligado a molécula fluorescente FITC. A reação com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-VEGF humano foi evidenciada por meio do anticorpo secundário Texas Red X. Os núcleos foram corados com DAPI. O controle negativo desta reação foi realizado com a incubação de apenas o anticorpo secundário, sem a incubação com o anticorpo primário. Desta maneira verificou-se que a reação do anticorpo secundário não é inespecífica, pois apenas os núcleos foram corados.

Figura 24 – Imunofluorescência indireta com dupla marcação de células progenitoras endoteliais de sangue de cordão umbilical humano em cultura.

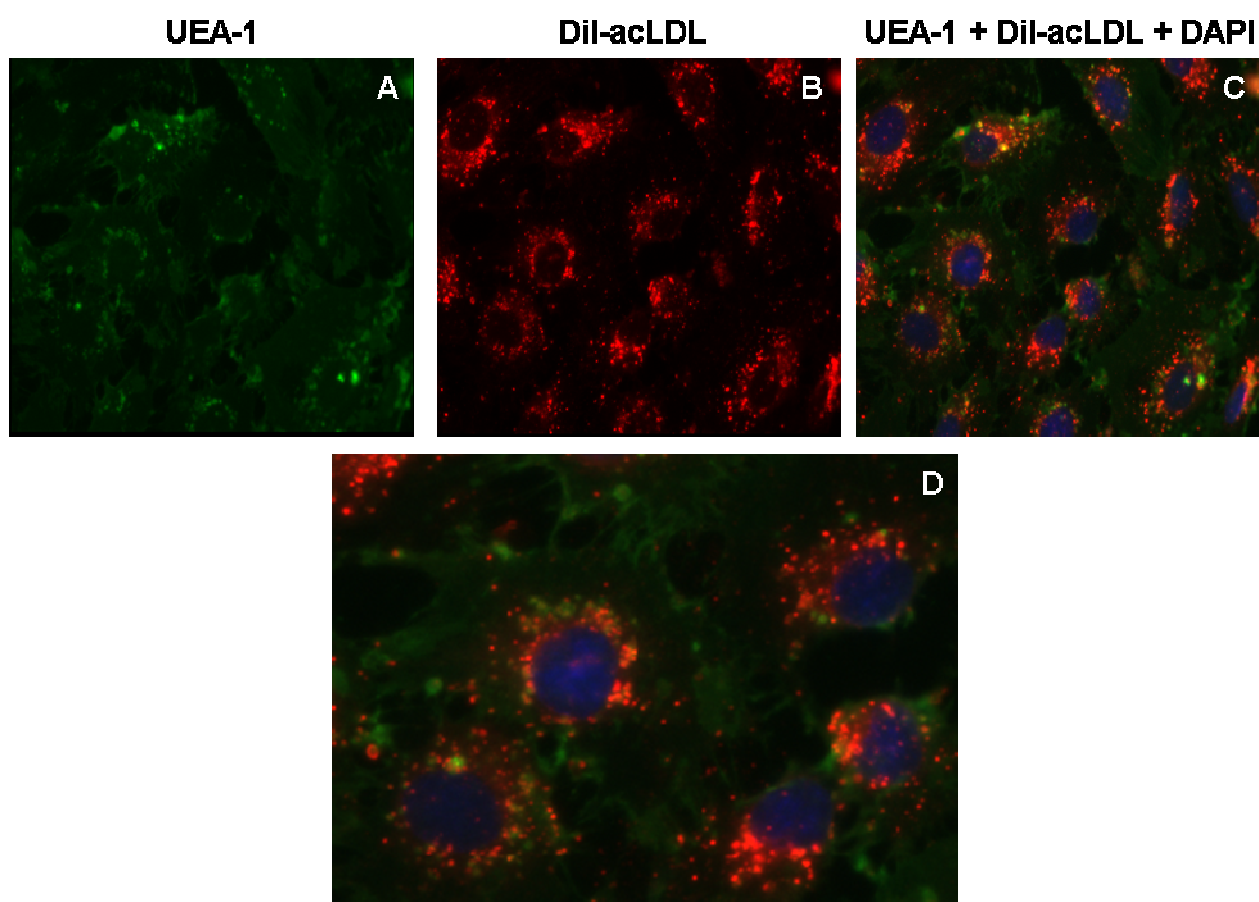


Legenda: (A) CD31; (B) VEGF e (C) CD31 + VEGF + DAPI (D) Detalhe. Barra da escala = 50μm.

### 5.5.5 Dupla marcação fluorescente direta de CPE com UEA-1-FITC e DiI-ACL<sub>2</sub>LDL

As CPE foram avaliadas funcionalmente pela capacidade de internalização de DiI-acLDL e ligação a UEA-1-FITC. Todas as células aderentes foram positivas para dupla marcação pela absorção de DiI-acLDL e pela ligação a UEA-1-FITC. Os núcleos foram corados com DAPI.

Figura 25 – Dupla marcação positiva CPE para UEA-1-FITC e DiI-acLDL.

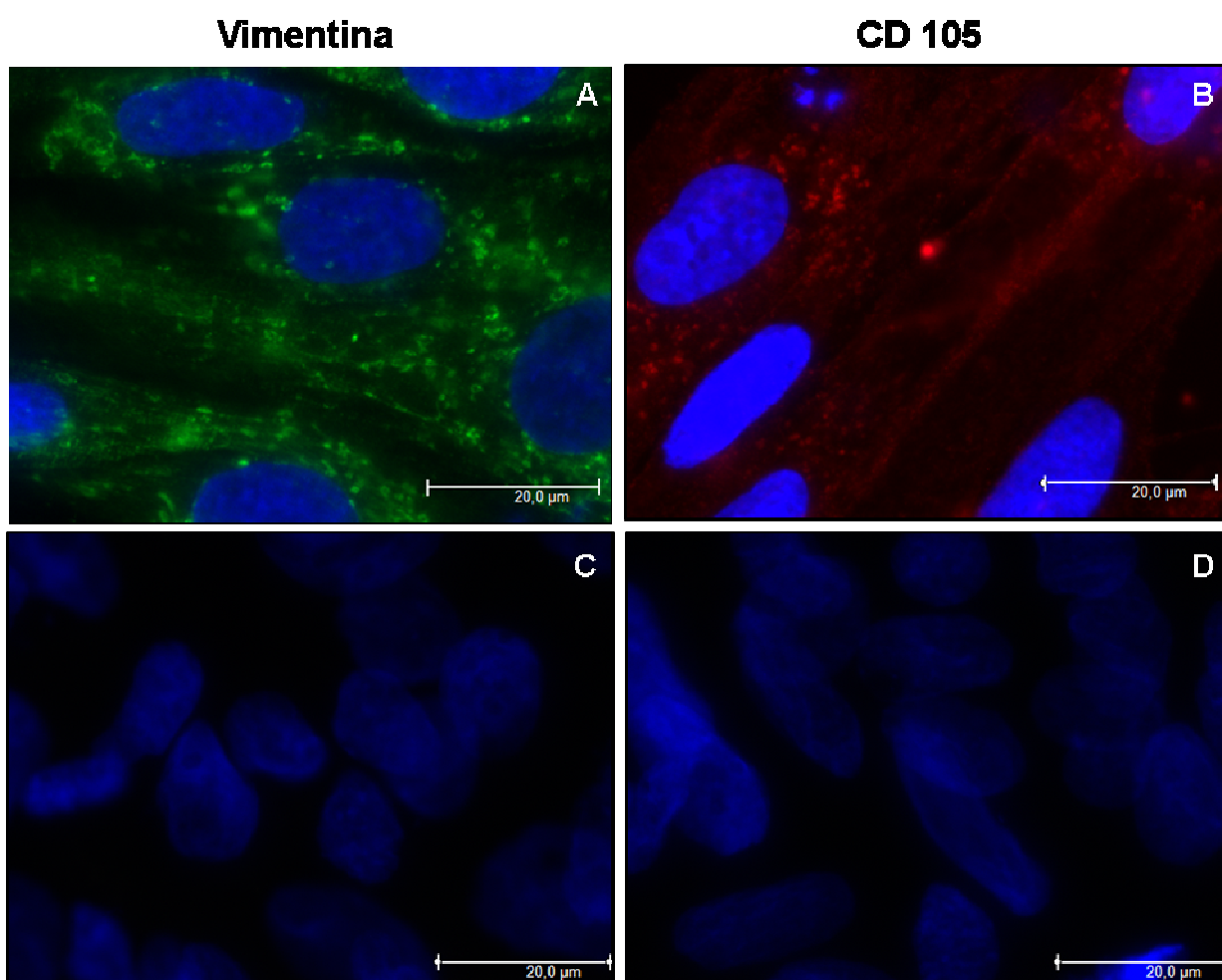


Legenda: (A) UEA-1 FITC; (B) DiI-acLDL TRITC e (C) UEA-1 + DiI-acLDL + DAPI (D) Detalhe.

### 5.5.6 Imunofluorescência indireta de CTM

A imunofluorescência indireta demonstrou que as CTM obtidas de CUh são positivas para vimentina e CD105. Os núcleos foram corados com DAPI. O controle negativo desta reação foi realizado com a incubação de apenas o anticorpo secundário, sem a incubação com o anticorpo primário. Desta maneira verificou-se que a reação do anticorpo secundário não é inespecífica, pois apenas os núcleos foram corados.

Figura 26 – Imunofluorescência indireta para vimentina e CD105 de CTM em cultura.



Legenda: (A) Vimentina (B) CD105 (C e D) controle negativo. Barra da escala = 20µm.

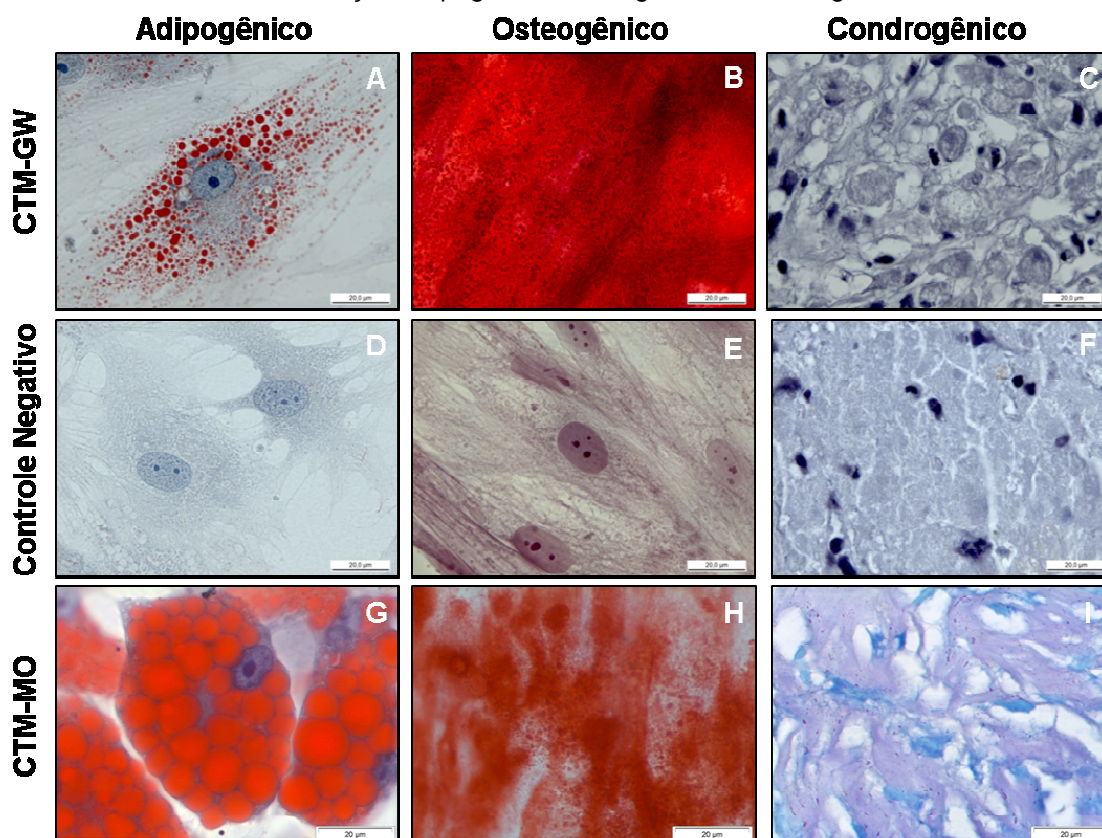


## 5.6 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

### 5.6.1 Ensaios de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica

As CTM provenientes da GW apresentaram potencial de diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos com características morfológicas típicas de células especializadas quando tratadas por 21 dias com meio indutor na 3ª passagem. O controle positivo destes ensaios foi feito com CTM provenientes da MO humana. Foi detectada a diferenciação adipogênica das CTM pela coloração Oil Red O que evidencia os vacúolos de gordura. A diferenciação osteogênica das CTM foi detectada pela observação de depósitos de cálcio nas culturas, através da coloração com Alizarina Red S. Os condroblastos secretam uma matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos sulfatados, que foram corados com Azul de Toluidina.

Figura 27 – Ensaios de Diferenciação Adipogênica, Osteogênica e Condrogênica.



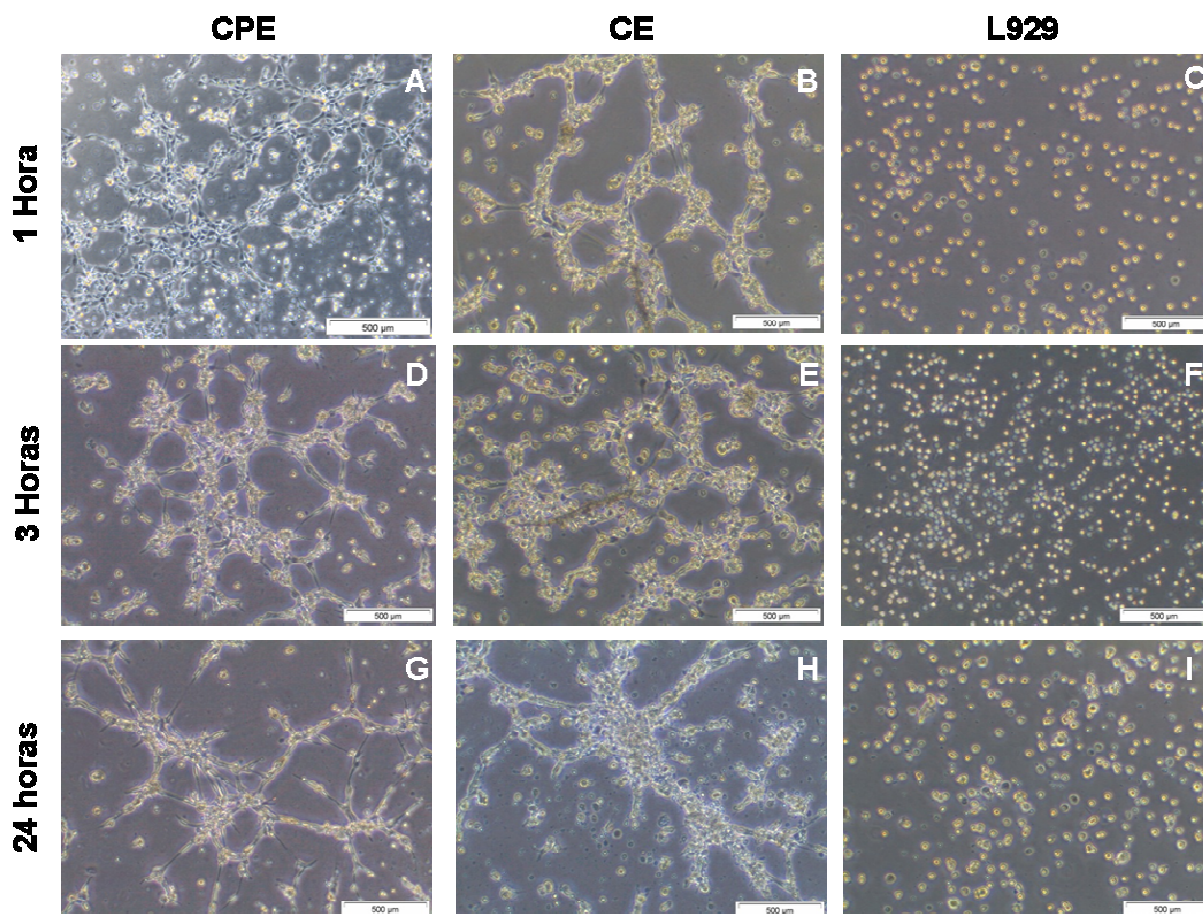
Legenda: (A) CTM coradas em corante Oil Red O, (B) CTM coradas em Alizarina Red S, (C) CTM coradas em Azul de Toluidina, (D, E, F) Controles negativos, (G, H, I) Controles positivos. Barra da escala = 20µm.

### 5.6.2 Ensaio de formação de túbulos capilares *in vitro*

O ensaio de formação de túbulos capilares permitiu verificar a habilidade das células progenitoras endoteliais provenientes do SCUh formarem estruturas com características de vasos sanguíneos em matriz tridimensional.

Foram realizados intervalos de observação de 1, 3 e 24 horas. Com 1 hora foi possível verificar estruturas com características de túbulos capilares. Com 3 horas de observação os túbulos capilares foram formados e permaneceram até as 24 horas de observação. Nos 3 experimentos realizados foram obtidos os mesmos resultados. As células endoteliais (CE) obtidas de veia safena humana foram utilizadas como controle positivo e a linhagem de fibroblastos L929 foi utilizada como controle negativo.

Figura 28 – Ensaio de formação de túbulos capilares. Barra da escala= 500µm.



Legenda: (A) CPE em 1 hora, (B) CE em 1 hora, (C) L929 em 1 hora, (D) CPE em 3 horas, (E) CE em 3 horas, (F) L929 em 3 horas, (G) CPE em 24 horas, (H) CE em 24 horas, (I) L929 em 24 horas. Barra da escala = 500µm.

## 5.7 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS

### 5.7.1 Indução da miocardiopatia isquêmica

Foram utilizados 440 animais para o procedimento de indução da MI. O peso médio dos animais foi de  $361,21 \pm 8,03$  gramas. A duração do procedimento foi de  $4,16 \pm 0,42$  minutos. A isquemia foi confirmada pela rápida mudança de coloração e acinesia na região. O tempo de recuperação no pós-operatório imediato foi  $10,37 \pm 4,34$  minutos. A taxa de mortalidade durante o procedimento foi de 30%, no pós-cirúrgico 15,90% e após 24 horas 3,64%, totalizando 218 óbitos.

### 5.7.2 Avaliação por ecocardiografia da função cardíaca após a indução da miocardiopatia isquêmica

Foi realizada a avaliação ecocardiográfica em 222 animais, destes 62 apresentaram FE igual ou abaixo de 40% e foram randomizados entre os seguintes grupos:

- Transplante Meio: N = 18
- CTM: N = 17
- CPE: N = 13
- CTM+CPE: N = 14

A taxa de efetividade da indução da MI com fração de ejeção igual ou abaixo de 40% foi de 27,93%.

Tabela 15 – Média das variáveis ecocardiográficas no 7º dia após indução da MI.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>ADF1</b>	<b>VDF1</b>	<b>ASF1</b>	<b>VSF1</b>	<b>FEVE1</b>
<b>Transplante Meio</b>	18	1,27978	0,78800	1,05002	0,56387	27,95333
<b>CTM</b>	17	1,3227	0,8675	1,0887	0,6509	26,2100
<b>CPE</b>	13	1,2403	0,7672	0,9590	0,5133	32,4167
<b>CTM+CPE</b>	14	1,2427	0,7757	0,9661	0,5361	32,8633

Legenda: ADF1: área diastólica final; VDF1: volume diastólico final; ASF1: área sistólica final; VSF1: volume sistólico final; FEVE1: fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

### 5.7.3 Transplante de células

O transplante de células foi realizado no nono dia após a indução da MI em 62 animais, sendo 18 para o grupo transplante de meio, 17 para o grupo CTM, 13 animais para o grupo CPE e 14 animais para o grupo CTM+CPE. A duração do procedimento foi de  $19,8 \pm 1,71$  minutos e o tempo de recuperação no pós-operatório imediato foi  $3,85 \pm 3,75$  minutos. A taxa de mortalidade durante ou após o transplante foi de 27,41%, sendo 7 animais para o grupo CTM, 3 animais para o grupo CPE, 4 animais para o grupo CTM+CPE e 3 animais para o grupo transplante de meio. Os grupos finalizaram o estudo com os seguintes números de animais:

- Transplante Meio: N = 15
- CTM: N = 10
- CPE: N = 10
- CTM+CPE: N = 10

### 5.7.4 Avaliação por ecocardiografia da função cardíaca após 30 dias do transplante

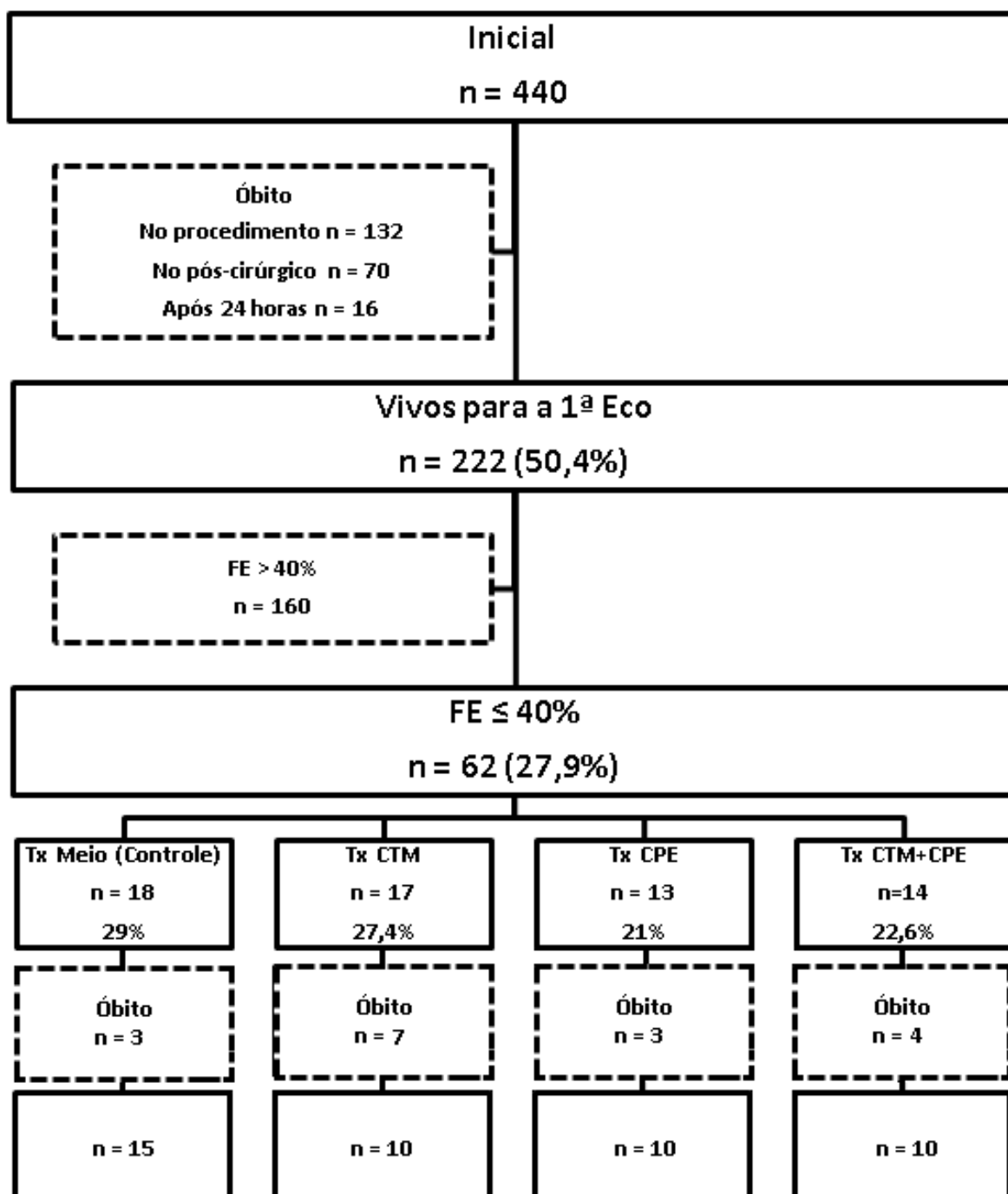
Foi realizada a segunda avaliação ecocardiográfica em 45 animais após 30 dias do transplante.

Tabela 16 – Média das variáveis ecocardiográficas no 30º dia após o transplante.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>ADF2</b>	<b>VDF2</b>	<b>ASF2</b>	<b>VSF2</b>	<b>FEVE2</b>
<b>Transplante Meio</b>	15	1,45422	1,02113	1,19371	0,74927	27,71556
<b>CTM</b>	10	1,3640	0,9249	1,0065	0,5910	37,9833
<b>CPE</b>	10	1,3530	0,9018	0,9673	0,5408	40,3267
<b>CTM+CPE</b>	10	1,3510	0,9220	0,9737	0,5712	40,0567

Legenda: ADF2: área diastólica final; VDF2: volume diastólico final; ASF2: área sistólica final; VSF2: volume sistólico final; FEVE2: fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Figura 29 – Organograma do comportamento dos animais no estudo.



Os grupos foram comparados dois a dois testando-se a hipótese nula de que a probabilidade de óbito é igual para os dois grupos sob comparação, versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes. Na tabela 17 são apresentadas frequências e percentuais de acordo com os grupos e o desfecho de óbito. Também são apresentados os valores de p dos testes estatísticos na tabela 18.

Tabela 17 – Taxa de mortalidade nos diferentes grupos após o transplante.

<i>Óbito</i>	<i>Tx meio</i>	<i>CTM</i>	<i>CPE</i>	<i>CTM+CPE</i>
Não	15 (83,3%)	10 (58,8%)	10 (76,9%)	10 (71,4%)
Sim	3 (16,7%)	7 (41,2%)	3 (23,1%)	4 (28,6%)
Total	18	17	13	14

Tabela 18 – Estudo de correlações feito entre os grupos.

<i>Grupos sob comparação</i>	<i>Valor de p</i>
Tx meio x CTM	0,146
Tx meio x CPE	0,676
Tx meio x CTM+CPE	0,669
CTM x CPE	0,440
CTM x CTM+CPE	0,707
CPE x CTM+CPE	1

Na tabela 19 são apresentadas frequências e percentuais para o grupo Tx meio e o grupo de CTM, CPE, CTM+CPE (tratados) e o desfecho de óbito.

Tabela 19 – Comparação do percentual de mortalidade do grupo controle com os grupos que receberam o transplante celular.

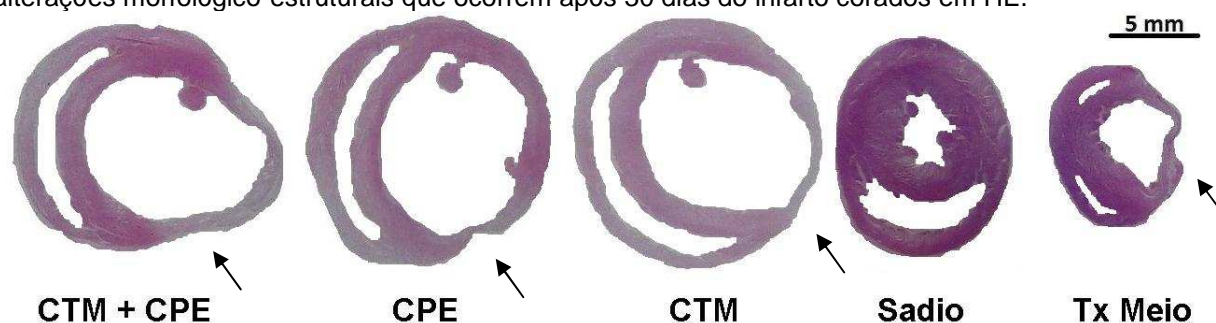
<i>Óbito</i>	<i>Tx meio</i>	<i>Tratados (CTM, CPE, CTM+CPE)</i>
Não	15 (83,3%)	30 (68,2%)
Sim	3 (16,7%)	14 (31,8%)
Total	18	44

Valor de p = 0,348

## 5.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Primeiramente foi realizada uma análise macroscópica dos corações onde ficou demonstrado que os animais que passaram pela indução da miocardiopatia isquêmica apresentam o mesmo padrão anátomo-patológico: morfologia oval, presença de extensa área de cicatriz na região ântero-lateral, e ventrículo esquerdo dilatado. O controle sadio apresentou padrão anatômico normal: morfologia elíptica, sem aumento das cavidades. Observa-se que a espessura do ventrículo esquerdo dos animais tratados com células é maior em relação ao controle. O adelgaçamento da parede infartada durante o processo de formação da cicatriz é também observado no remodelamento ventricular (figura 30).

Figura 30 – Demonstração histológica da espessura da cicatriz do ventrículo esquerdo após alterações morfológico-estruturais que ocorrem após 30 dias do infarto coronário em HE.



Legenda: seta = região isquêmica ântero-apical do ventrículo esquerdo.

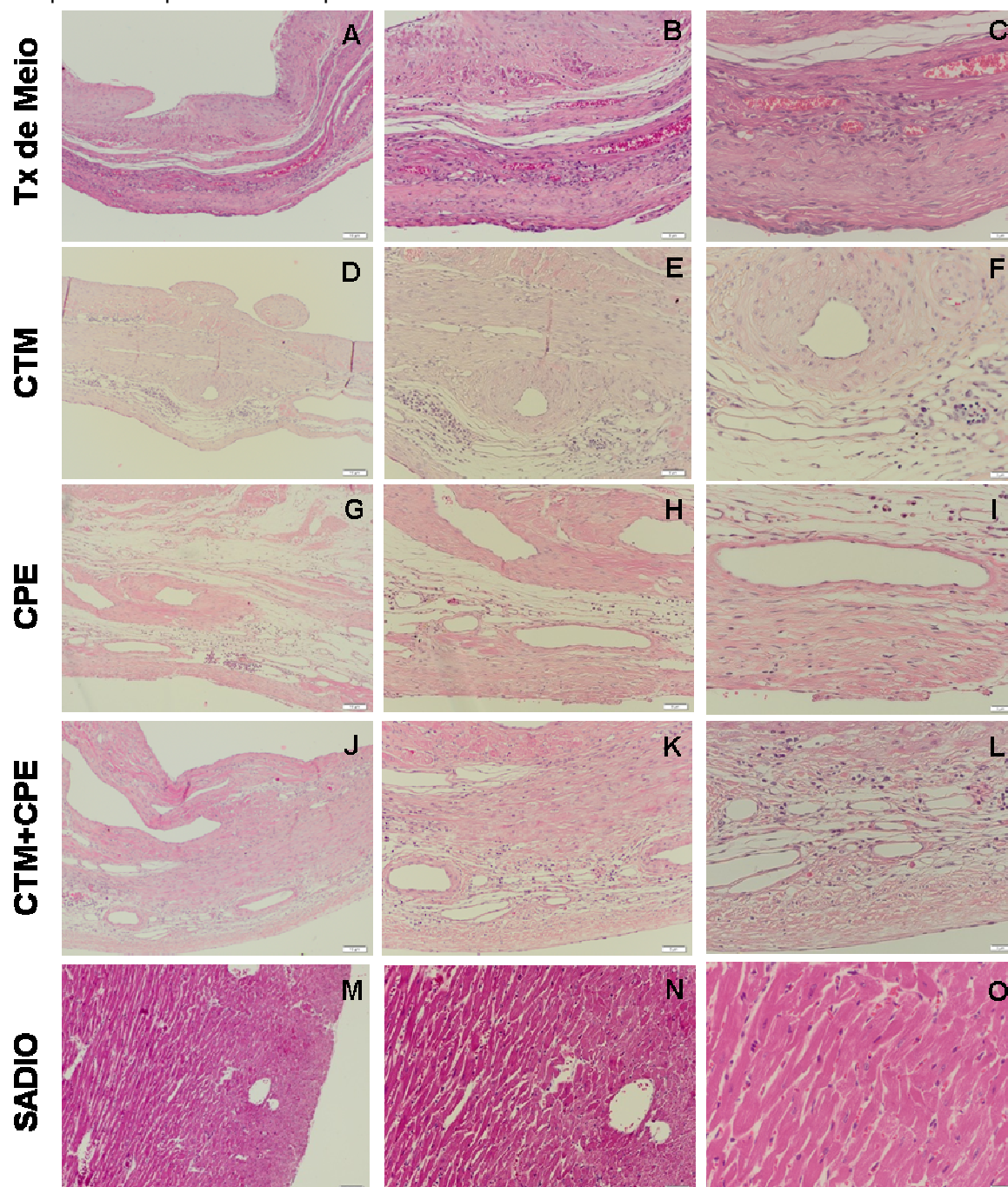
### 5.8.1 Hematoxilina-Eosina

A avaliação microscópica do tecido cardíaco foi realizada em cortes corados com hematoxilina-eosina (HE) com o intuito de evidenciar a área infartada do ventrículo esquerdo, bem como observar a organização geral do tecido. Nesta coloração os núcleos foram corados em azul e o citoplasma, as fibras colágenas e elásticas em tons de rosa. As amostras fixadas com formalina 10% e embebidas em parafina foram seccionadas em cortes de 4  $\mu$ m para exames histológicos com a coloração HE.

Observa-se pela coloração em HE que o tecido miocárdico sofreu modificações anátomo-patológicas pela extensão da lesão e processo cicatricial, pela hipertrofia da parede do ventrículo esquerdo e aumento da cavidade ventricular.

Ocorreram degeneração e morte das fibras musculares cardíacas, evidenciada pela perda das estriações e dos núcleos. As imagens são de um animal representativo de cada grupo.

Figura 31 – Secções histológicas da região do ventrículo esquerdo de corações de ratos obtidas 30 dias após o transplante coradas por HE.



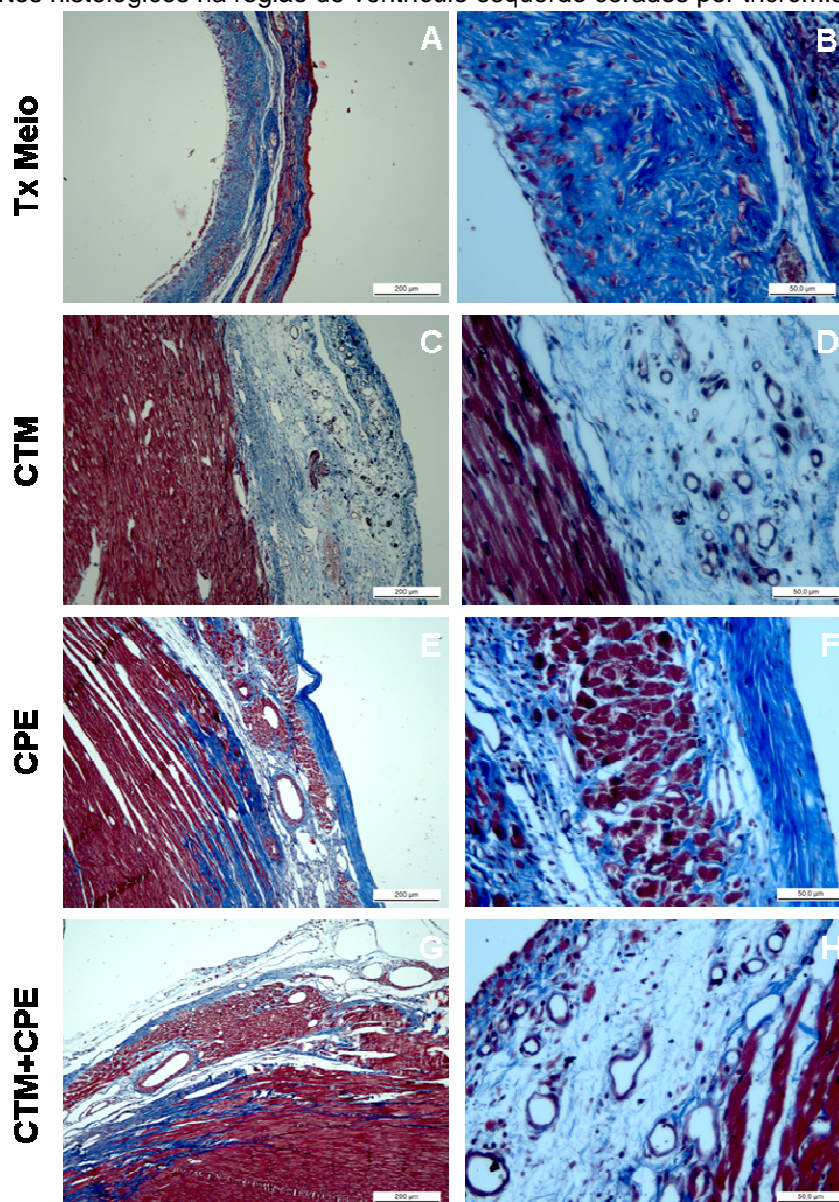
Legenda: Visualização das secções histológicas com magnitude de 100x (A, D, G, J, M) 200x (B, E, H, K, N) e 400x (C, F, I, L, O).



### 5.8.2 Tricrômio de Masson

A coloração com tricrômio de Masson revelou a presença de fibrose intersticial em todos os grupos. A área cicatricial dos diferentes grupos foi definida como porcentagem do ventrículo esquerdo positivo para marcação de colágeno (azul), indicando a presença e a extensão de zona cicatricial. A avaliação da relação ventrículo esquerdo / cicatriz foi feita a partir da área total do ventrículo esquerdo e da área relativa à cicatriz. Os núcleos foram corados em azul escuro, o músculo, os eritrócitos e o citoplasma das células em vermelho e o colágeno em azul.

Figura 32 – Cortes histológicos na região do ventrículo esquerdo corados por tricrômio de Masson.



Legenda: Visualização das seções histológicas com magnitude de 100x (A, C, E, G) Barra da escala = 200µm e 400x (B, D, F, H) Barra da escala = 50µm.

Para % total de colágeno e % total de tecido sadio, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos 3 grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem resultados diferentes dos demais. Na tabela 20 são apresentados os resultados obtidos. Considerando-se que a soma dos dois percentuais é igual a 100%, o valor de p é o mesmo para os dois testes estatísticos.

Tabela 20 – Valores medianos do percentual de colágeno e de tecido sadio nos diferentes grupos corado por Tricrômio de Masson.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
% Total de Colágeno	CTM	46	28,6	14,1	0,1	98,2	32,9	
	CPE	51	18,6	4,6	0,1	92,3	27,6	
	CTM+CPE	51	33,6	20,6	0,1	98,8	37,2	
	Tx meio	91	52,7	50,8	40,2	69,2	6,1	<b>&lt;0,001</b>
% Total de Tecido Sadio	CTM	46	71,4	85,9	1,8	99,9	32,9	
	CPE	51	81,4	95,4	7,7	99,9	27,6	
	CTM+CPE	51	66,4	79,4	1,2	99,9	37,2	
	Tx meio	91	47,3	49,2	30,8	59,8	6,1	<b>&lt;0,001</b>

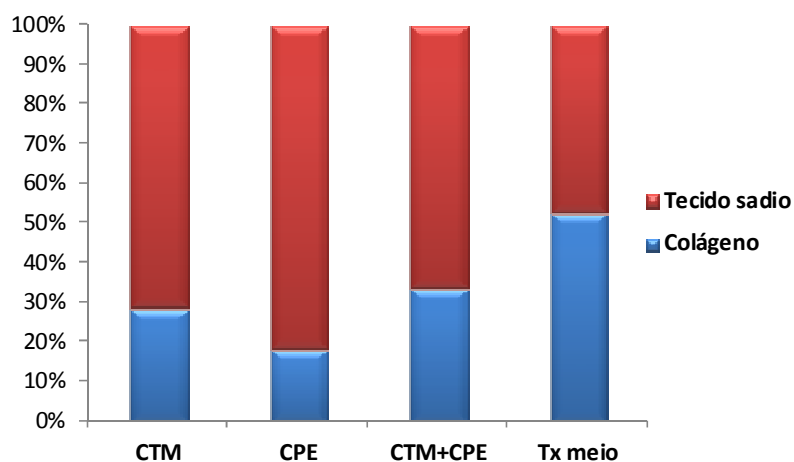
Legenda: \*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$

Considerando-se que houve diferença significativa entre os 4 grupos, estes foram comparados dois a dois. Na tabela abaixo são apresentados os valores de p dessas comparações.

Tabela 21 – Valores de p da comparação dois a dois entre os quatro grupos experimentais

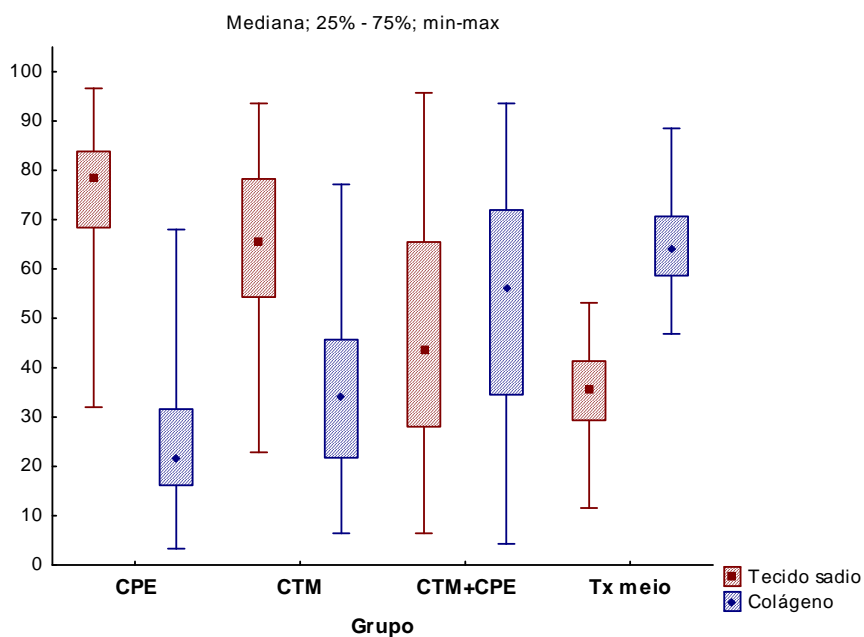
Grupos comparados	Valor de p
CTM x CPE	0,117
CTM x CTM+CPE	0,229
CTM x Tx meio	<b>&lt;0,001</b>
CPE x CTM+CPE	0,005
CPE x Tx meio	<b>&lt;0,001</b>
CTM+CPE x Tx meio	<b>&lt;0,001</b>

Gráfico 5 – Percentual de colágeno e de tecido sadio nos diferentes grupos corado em tricrômio de Masson.



Legenda: Vermelho = percentual de tecido sadio; Azul = percentual de colágeno total.

Gráfico 6 – Valores expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos nos diferentes grupos.



Legenda: Vermelho = percentual de colágeno total; Azul = percentual de tecido sadio.

### 5.8.3 Picrossírius red

A avaliação morfométrica pela coloração de Picrossírius red possibilitou a quantificação de colágeno tipo I e tipo III na área infartada. Quando um tecido é lesado os fibroblastos proliferam, migram para a ferida e produzem grandes quantidades de matriz rica em colágeno que ajuda a isolar e reparar o tecido. A hipótese testada para esta análise é que os animais que receberam o transplante celular apresentem uma quantidade menor de colágeno quando comparados com os animais que receberam apenas o transplante de meio.

Para cada uma das variáveis de colágeno detectado pela coloração Picrossírius red, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos 3 grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem resultados diferentes dos demais.

Na tabela abaixo são apresentados os resultados obtidos para campo claro. Considerando-se que a soma dos dois percentuais é igual a 100%, o valor de p é o mesmo para os dois testes estatísticos.

Tabela 22 – Valores medianos do percentual de colágeno e de tecido sadio por Picrossírius red em campo claro.

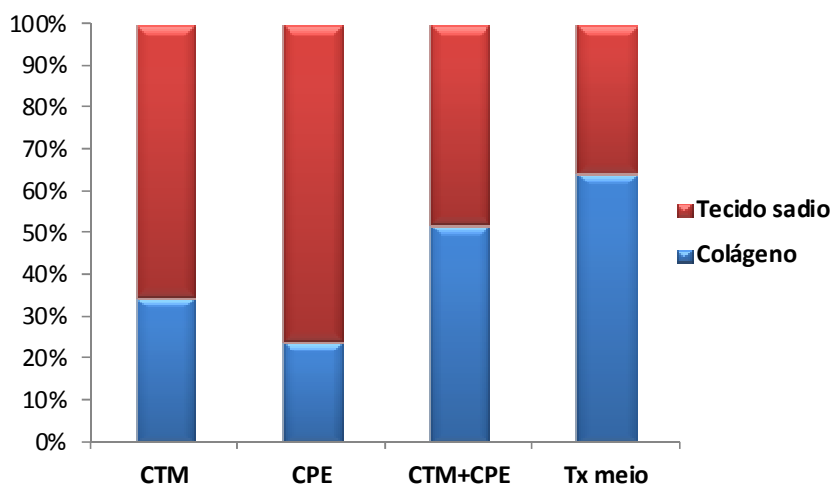
Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
% total de Tecido Sadio - Campo claro	CTM	70	65,1	65,7	22,8	93,6	16,7	
	CPE	80	75,6	78,5	32,0	96,7	12,1	
	CTM+CPE	51	47,7	43,8	6,4	95,7	22,1	
	Tx meio	93	35,5	35,8	11,5	53,2	10,0	<b>&lt;0,001</b>
% Total de Colágeno - Campo claro	CTM	70	34,9	34,3	6,4	77,2	16,7	
	CPE	80	24,4	21,5	3,3	68,0	12,1	
	CTM+CPE	51	52,3	56,2	4,3	93,6	22,1	
	Tx meio	93	64,5	64,2	46,8	88,5	10,0	<b>&lt;0,001</b>

Considerando-se que houve diferença significativa entre os grupos, estes foram comparados dois a dois. Na tabela abaixo são apresentados os valores de p dessas comparações.

Tabela 23 – Comparação entre os grupos dos valores de p para o percentual de colágeno e tecido sadio por Picrossírius red em campo claro.

Grupos comparados	% total de Tecido Sadio	% Total de Colágeno
	Campo claro	Campo claro
CTM x CPE	<0,001	<0,001
CTM x CTM+CPE	<0,001	<0,001
CTM x Tx meio	<0,001	<0,001
CPE x CTM+CPE	<0,001	<0,001
CPE x Tx meio	<0,001	<0,001
CTM+CPE x Tx meio	<0,001	<0,001

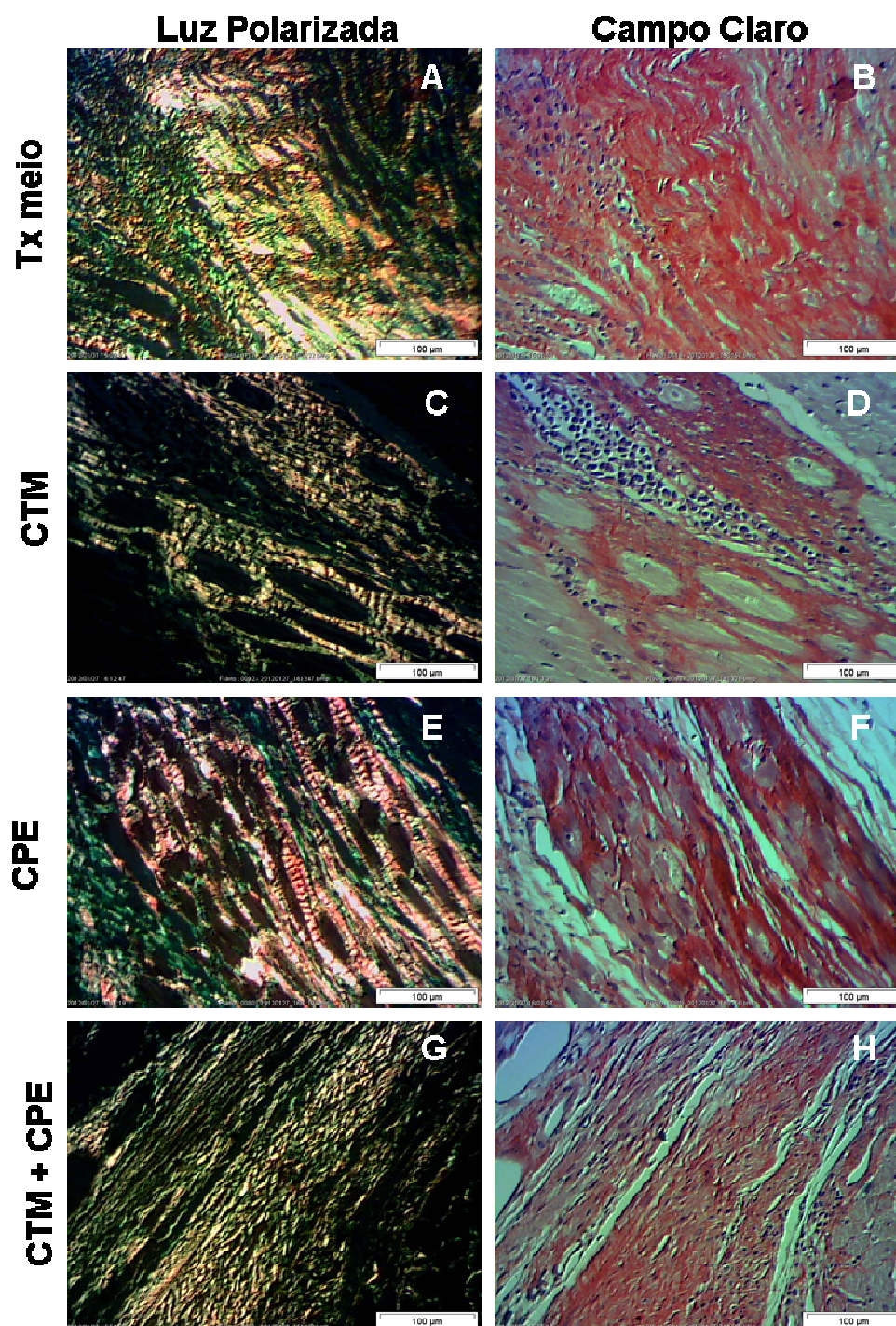
Gráfico 7 – Percentual de colágeno e de tecido sadio nos diferentes grupos corado em Picrossírius red analisado em campo claro



Legenda: Vermelho = percentual de tecido sadio; Azul = percentual de colágeno total.

Identificação de colágeno tipo I e colágeno tipo III após polarização demonstrando área de fibrose intersticial devido a substituição das fibras musculares cardíacas por tecido conjuntivo (Figura 33).

Figura 33 – Fotomicrografias de corte histológico do ventrículo esquerdo corado por Picrossírius red.



Legenda: (A) Tx de meio em luz polarizada, (B) Tx de meio em campo claro, (C) CTM em luz polarizada, (D) CTM em campo claro, (E) CPE em luz polarizada, (F) CPE em campo claro, (G) CTM+CPE em luz polarizada, (H) CTM+CPE em campo claro. Barra da escala = 100µm.

Nas tabelas abaixo são apresentados os resultados obtidos para luz polarizada.

Tabela 24 – Valores do percentual de colágeno vermelho, amarelo e verde por Picrossírius red analisado em luz polarizada.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
% de Colágeno Vermelho Luz polarizada	CTM	70	6,7	2,5	0,0	72,4	11,7	
	CPE	80	6,9	3,6	0,0	80,0	12,2	
	CTM+CPE	51	18,4	7,1	0,2	90,2	23,8	
	Tx meio	93	38,0	38,5	20,3	54,2	5,6	<0,001
% de Colágeno Verde Luz polarizada	CTM	70	85,8	88,3	24,0	99,0	13,3	
	CPE	80	82,4	86,0	19,7	99,4	15,4	
	CTM+CPE	51	67,1	71,5	5,7	98,3	24,7	
	Tx meio	93	41,9	41,9	28,2	52,5	4,4	<0,001
% de Colágeno Amarelo Luz polarizada	CTM	70	7,5	4,7	0,2	32,8	6,8	
	CPE	80	10,8	8,4	0,3	52,8	9,5	
	CTM+CPE	51	14,5	12,0	0,4	42,2	11,0	
	Tx meio	93	20,1	20,2	-0,4	40,5	6,7	<0,001

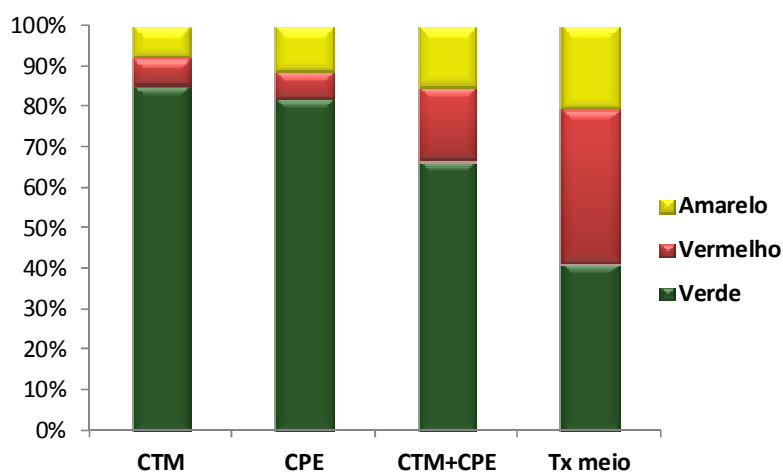
Legenda: \*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Amarelo = percentual de colágeno tipo I (maduro); Vermelho = percentual de colágeno tipo I (maduro); Verde = percentual de colágeno tipo III (imaturo).

Considerando-se que houve diferença significativa entre os grupos, estes foram comparados dois a dois. Na tabela abaixo são apresentados os valores de p dessas comparações.

Tabela 25 – Comparação dos valores de p do percentual de colágeno vermelho, amarelo e verde por Picrossírius red analisado em luz polarizada.

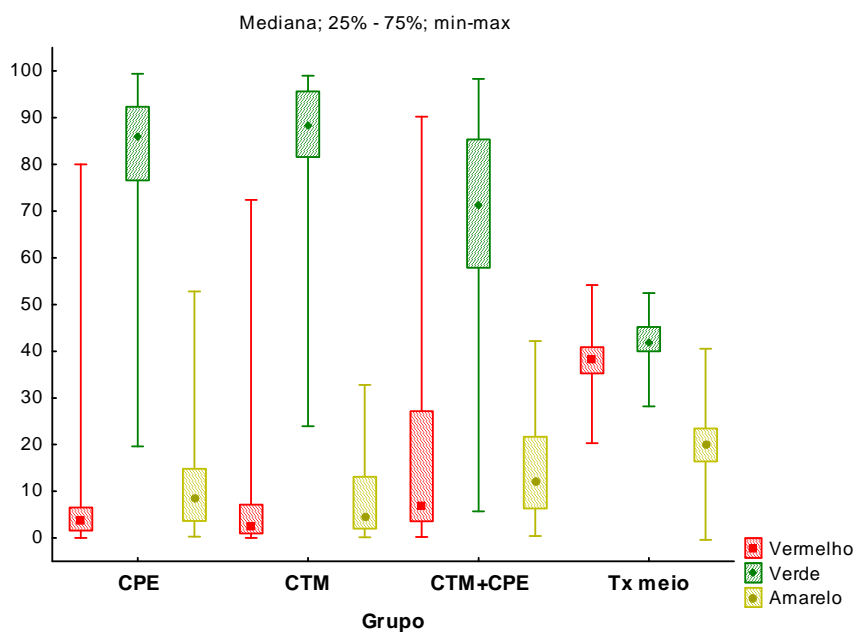
Grupos comparados	% de Colágeno Vermelho – Luz polarizada	% de Colágeno Verde – Luz polarizada	% de Colágeno Amarelo – Luz polarizada
	CTM x CPE	0,513	0,101
CTM x CTM+CPE	<0,001	<0,001	0,011
CTM x Tx meio	<0,001	<0,001	<0,001
CPE x CTM+CPE	<0,001	<0,001	<0,001
CPE x Tx meio	<0,001	<0,001	<0,001
CTM+CPE x Tx meio	<0,001	<0,001	<0,001

Gráfico 8 – Percentual dos diferentes tipos de colágeno nos diferentes grupos corado em Picrossírius red analisado em luz polarizada.



Legenda: Amarelo = percentual de colágeno tipo I (maduro); Vermelho = percentual de colágeno tipo I (maduro); Verde = percentual de colágeno tipo III (imaturo).

Gráfico 9 - Valores expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos nos diferentes grupos.



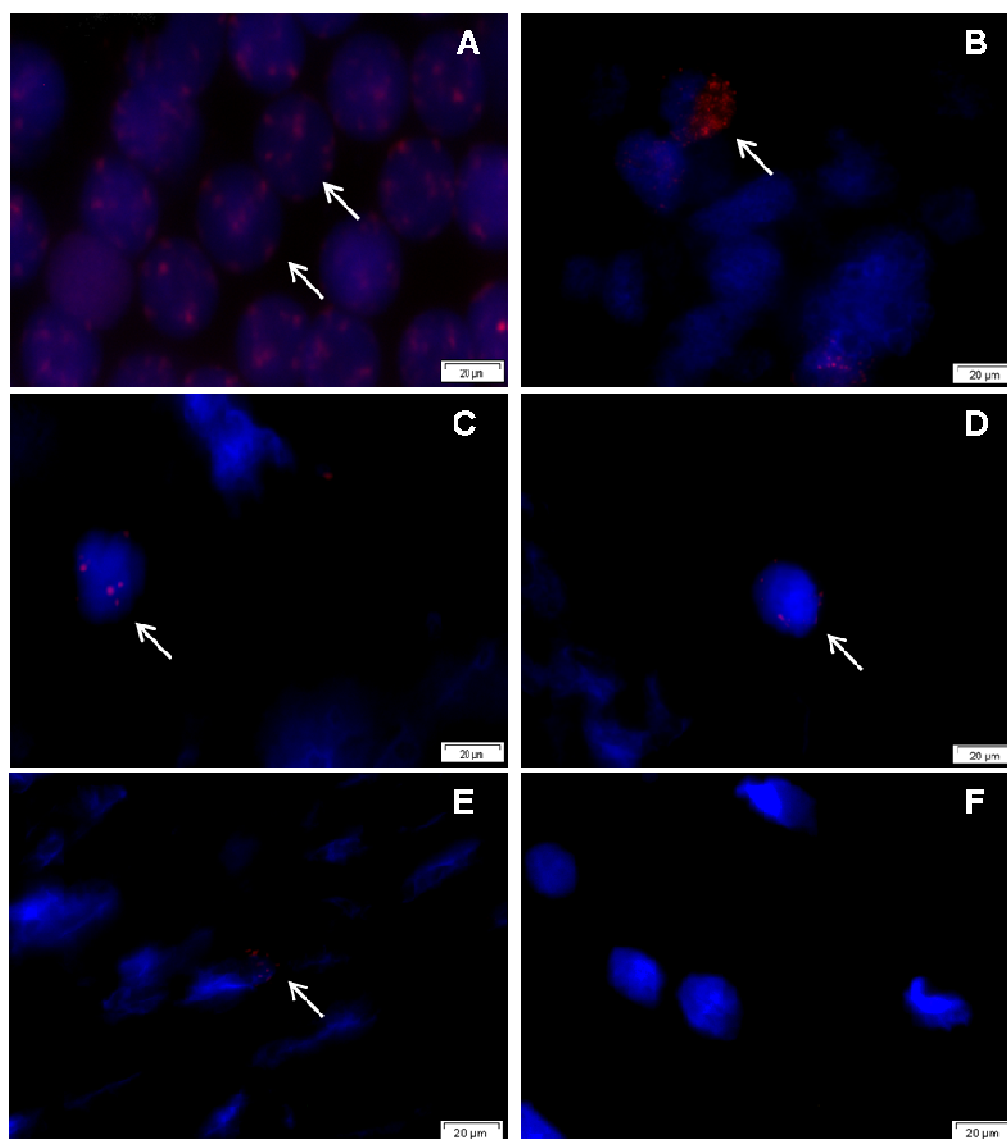
Legenda: Amarelo = colágeno tipo I (maduro); Vermelho = colágeno tipo I (maduro); Verde = colágeno tipo III (imaturo).



### 5.9 LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRANSPLANTADAS POR HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

Por meio da técnica de hibridação *in situ* por fluorescência foi possível localizar as células 30 dias após o transplante por meio da sonda de DNA que reconheceu e se hibridizou com sua sequência complementar no cromossomo das células humanas. Na figura A e B mostra o controle positivo em uma lâmina de medula óssea e células-tronco mesenquimais derivadas da MO, respectivamente. Com estes controles foi possível identificar o padrão de expressão. Não foi possível quantificar o número de células humanas presentes no tecido cardíaco dos animais, pois foram raramente visualizadas.

Figura 34 – Localização das células transplantadas por hibridização *in situ* por fluorescência.

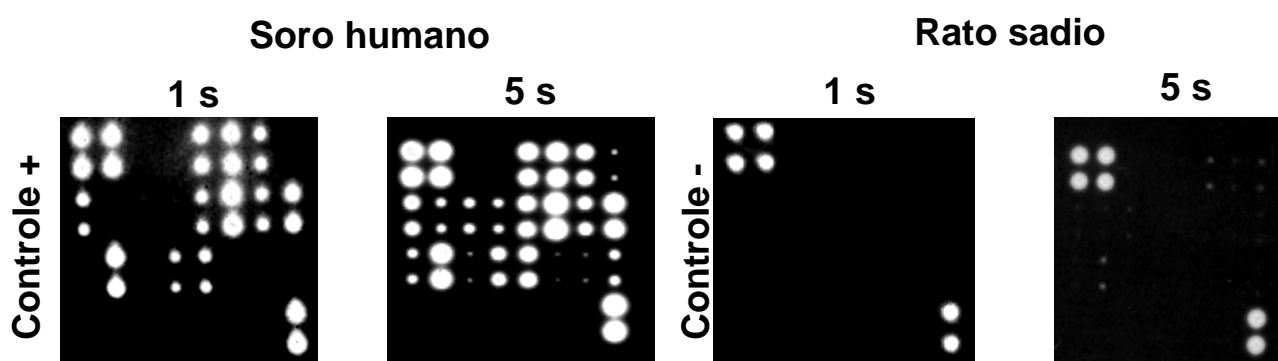


Legenda: (A) Controle positivo – Medula óssea; (B) Controle positivo – CTM-MO; (C) CTM+CPE; (D) CTM; (E) CPE; (F) Controle negativo. Barra da escala = 20µm.

## 5.10 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS ANGIOGÊNICAS NO SANGUE PERIFÉRICO POR ARRANJOS DE ANTICORPOS

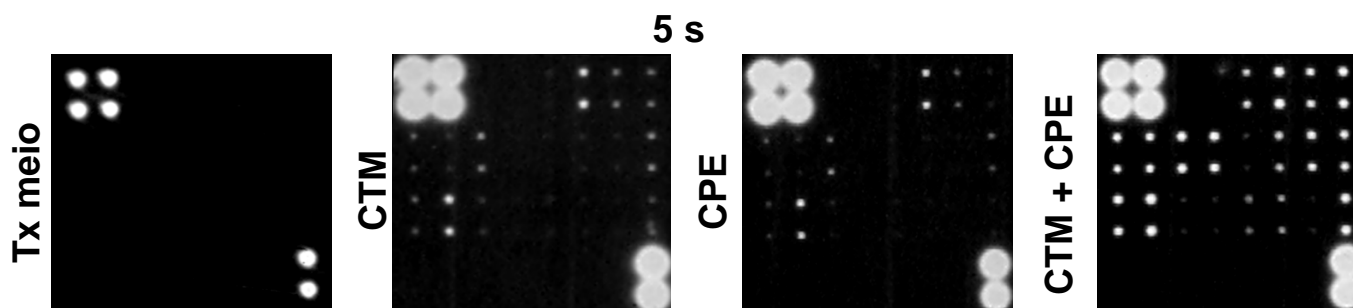
Para verificar a especificidade da membrana foi utilizado como controle positivo o soro humano e como controle negativo o soro de rato sadio.

Figura 35 – Citocinas e fatores de crescimento presentes no sangue periférico humano e de rato sadio.



Após verificar a especificidade da membrana foi feita a análise em triplicata do soro dos animais nos 4 grupos experimentais.

Figura 36 – Citocinas e fatores de crescimento presentes no sangue periférico dos animais transplantados



Ao analisar a intensidade dos *spots*, nas imagens das membranas dos arranjos, entre o controle positivo (soro humano), controle negativo (soro de animal sadio) (Figura 35) com os grupos que receberam o transplante (Figura 36) foi observado que de fato existia na circulação dos ratos fatores parácrinos humanos relacionados à angiogênese.

Figura 37 – Mapa da membrana de arranjo de anticorpos das citocinas e fatores de crescimento.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	POS	POS	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78	b FGF
2	POS	POS	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78	b FGF
3	GRO	IFN- $\gamma$	IGF-I	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
4	GRO	IFN- $\gamma$	IGF-I	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
5	PIGF	RANTES	TGF- $\beta$ 1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
6	PIGF	RANTES	TGF- $\beta$ 1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
7	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS
8	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS

Legenda: POS: controle positivo; NEG: controle negativo; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; bFGF: Fator de crescimento básico de fibroblastos; PDGF: Fator de crescimento derivado de plaqueta; TIMP1: Inibidor da metaloproteinase 1; TIMP2: Inibidor da metaloproteinase 2; PIGF: Fator de crescimento placentário; EGF: Fator de crescimento epidermal; GRO: Regulador do crescimento de oncogene; INF $\gamma$ : interferon gama; IGF-I: fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1; IL-6 Interleucina-6; IL-8: Interleucina-8; LEPTIN: Leptina; MCP-1: proteína 1 quimioatrativas de monócitos; RANTES: Citocina expressa e secretada por linfócitos T; Angiogenin: Angiogenina; ENA78: ativador neutrofílico derivado do epitélio; Thrombopoietin: Trombopoietina; VEGF-D: Fator de crescimento endotelial vascular-D; TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformador- $\beta$  e BLANK: em branco.

Tabela 26 – Valores da média de expressão das citocinas e fatores de crescimento humanos presentes no sangue periférico dos animais nos diferentes grupos experimentais.

	<i>Meio</i>	<i>CTM</i>	<i>CPE</i>	<i>CTM+CPE</i>
	<b>Média</b>			
<b>POS</b>	841,7	841,7	841,7	841,7
<b>NEG</b>	13,4	6,1	4,7	19,7
<b>Angiogenina</b>	18,7	8,7	7,9	88,1
<b>EGF</b>	145,9	108,2	127,0	186,3
<b>ENA-78</b>	79,0	59,6	40,9	227,1
<b>bFGF</b>	109,1	49,7	9,1	187,2
<b>GRO</b>	24,3	40,6	45,1	162,1
<b>IFN-gama</b>	11,4	29,1	32,6	158,5
<b>IGF-I</b>	48,7	75,9	81,9	239,2
<b>IL-6</b>	1,0	5,0	8,1	235,0
<b>IL-8</b>	7,4	16,3	15,4	24,6
<b>Leptina</b>	12,6	18,0	18,1	120,6
<b>MCP-1</b>	23,3	15,9	10,7	156,8
<b>PDGF-BB</b>	70,7	57,5	54,5	182,8
<b>PIGF</b>	29,9	39,8	40,9	189,5
<b>RANTES</b>	111,8	140,4	154,6	325,0
<b>TGF-beta 1</b>	22,7	26,8	24,9	41,0
<b>TIMP-1</b>	6,7	17,8	10,1	39,2
<b>TIMP-2</b>	13,1	23,8	23,6	60,9
<b>Trombopoietina</b>	5,6	19,5	14,9	94,0
<b>VEGF</b>	11,3	17,7	12,8	46,4
<b>VEGF-D</b>	50,7	47,4	36,7	217,2

Para os fins de análises, foram considerados somente aqueles fatores que estivessem aumentados por um fator igual ou maior que dois nos grupos que receberam o transplante celular em relação aos controles negativos. Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Coeficiente} = \frac{\text{Média Grupo Tratamento}}{\text{Média Grupo Controle}}$$

Das 20 citocinas e fatores de crescimento possíveis de serem detectados pelo arranjo de anticorpos o interferon gama, a interleucina-6, a interleucina-8 e a trombopoietina, cumpriram com estes critérios nos três grupos experimentais.

Tabela 27 – Coeficiente da expressão das citocinas e fatores de crescimento humanos presentes no sangue periférico dos animais nos diferentes grupos.

	<i>CTM</i>	<i>CPE</i>	<i>CTM+CPE</i>
<b>Angiogenina</b>	0,5	0,4	4,7
<b>EGF</b>	0,7	0,9	1,3
<b>ENA-78</b>	0,8	0,5	2,9
<b>bFGF</b>	0,5	0,1	1,7
<b>GRO</b>	1,7	1,9	6,7
<b>IFN-gama</b>	<b>2,5</b>	<b>2,9</b>	<b>13,9</b>
<b>IGF-I</b>	1,6	1,7	4,9
<b>IL-6</b>	<b>5,0</b>	<b>8,1</b>	<b>235,0</b>
<b>IL-8</b>	<b>2,2</b>	<b>2,1</b>	<b>3,3</b>
<b>Leptina</b>	1,4	1,4	9,6
<b>MCP-1</b>	0,7	0,5	6,7
<b>PDGF-BB</b>	0,8	0,8	2,6
<b>PIGF</b>	1,3	1,4	6,3
<b>RANTES</b>	1,3	1,4	2,9
<b>TGF-beta 1</b>	1,2	1,1	1,8
<b>TIMP-1</b>	2,7	1,5	5,9
<b>TIMP-2</b>	1,8	1,8	4,6
<b>Trombopoietina</b>	<b>3,5</b>	<b>2,6</b>	<b>16,7</b>
<b>VEGF</b>	1,6	1,1	4,1
<b>VEGF-D</b>	0,9	0,7	4,3

Legenda: Vermelho: Índice maior que 2 nos três grupos

## 5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 5.11.1 Comparação entre os grupos CPE+CTM, CTM, CPE e TX MEIO

Para cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de que a média é igual nos grupos comparados, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um grupo tem média diferente dos demais. No caso de rejeição da hipótese nula, ou seja, de diferença significativa entre os grupos, estes foram comparados dois a dois. Na tabela abaixo são apresentadas estatísticas descritivas das avaliações pré, pós e da diferença entre pré e pós. Também são apresentados os valores de p dos testes estatísticos.

Tabela 28 – Análise estatística dos parâmetros ecocardiográficos dos grupos CPE+CTM, CTM, CPE e Tx Meio.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
ADF1	CPE+CTM	10	1,24	1,26	0,92	1,37	0,13	0,415
	CTM	10	1,32	1,31	1,14	1,70	0,16	
	CPE	10	1,24	1,19	1,07	1,58	0,15	
	Tx meio	15	1,28	1,28	1,19	1,39	0,06	
ADF2	CPE+CTM	10	1,35	1,32	1,12	1,71	0,17	0,242
	CTM	10	1,36	1,33	1,07	1,63	0,16	
	CPE	10	1,35	1,34	1,19	1,53	0,12	
	Tx meio	15	1,45	1,44	1,22	1,72	0,14	
Dif ADF	CPE+CTM	10	0,11	0,15	-0,17	0,49	0,20	0,242
	CTM	10	0,04	0,05	-0,40	0,49	0,25	
	CPE	10	0,11	0,11	-0,22	0,41	0,18	
	Tx meio	15	0,17	0,16	0,03	0,36	0,11	
VDF1	CPE+CTM	10	0,78	0,81	0,48	0,89	0,12	0,300
	CTM	10	0,87	0,84	0,69	1,29	0,17	
	CPE	10	0,77	0,74	0,62	1,09	0,15	
	Tx meio	15	0,79	0,78	0,66	0,91	0,08	
VDF2	CPE+CTM	10	0,92	0,88	0,66	1,42	0,23	0,339
	CTM	10	0,92	0,90	0,64	1,22	0,18	
	CPE	10	0,90	0,88	0,75	1,09	0,13	
	Tx meio	15	1,02	1,01	0,65	1,29	0,18	
Dif VDF	CPE+CTM	10	0,15	0,18	-0,22	0,71	0,25	0,339
	CTM	10	0,06	0,06	-0,43	0,54	0,28	
	CPE	10	0,13	0,11	-0,18	0,44	0,17	
	Tx meio	15	0,23	0,21	-0,01	0,53	0,16	
ASF1	CPE+CTM	10	0,97	0,98	0,68	1,16	0,14	
	CTM	10	1,09	1,05	0,87	1,51	0,19	
	CPE	10	0,96	0,93	0,84	1,23	0,12	

	Tx meio	15	1,05	1,02	0,92	1,30	0,10	0,102
ASF2	CPE+CTM	10	0,97	0,96	0,68	1,43	0,21	
	CTM	10	1,01	1,00	0,65	1,49	0,24	
	CPE	10	0,97	1,01	0,80	1,15	0,12	
	Tx meio	15	1,19	1,18	0,90	1,59	0,20	<b>0,029</b>
Dif ASF	CPE+CTM	10	0,01	0,02	-0,44	0,43	0,24	
	CTM	10	-0,08	-0,05	-0,62	0,61	0,34	
	CPE	10	0,01	0,04	-0,28	0,18	0,14	
	Tx meio	15	0,14	0,18	-0,17	0,33	0,16	<b>0,029</b>
VSF1	CPE+CTM	10	0,54	0,54	0,31	0,71	0,12	
	CTM	10	0,65	0,59	0,48	1,05	0,17	
	CPE	10	0,51	0,49	0,38	0,75	0,10	
	Tx meio	15	0,56	0,57	0,43	0,78	0,09	0,075
VSF2	CPE+CTM	10	0,57	0,56	0,29	1,06	0,22	
	CTM	10	0,59	0,57	0,29	1,07	0,23	
	CPE	10	0,54	0,57	0,41	0,67	0,10	
	Tx meio	15	0,75	0,73	0,43	1,08	0,20	<b>0,041</b>
Dif VSF	CPE+CTM	10	0,04	-0,02	-0,34	0,55	0,24	
	CTM	10	-0,06	-0,04	-0,58	0,57	0,32	
	CPE	10	0,03	0,05	-0,16	0,19	0,11	
	Tx meio	15	0,19	0,23	-0,09	0,43	0,15	<b>0,041</b>
FE1	CPE+CTM	10	32,86	33,18	25,63	39,70	4,67	
	CTM	10	26,21	27,45	18,33	32,00	5,35	
	CPE	10	32,42	32,03	25,00	38,53	5,20	
	Tx meio	15	27,95	30,03	11,37	35,90	7,56	<b>0,036</b>
FE2	CPE+CTM	10	40,06	39,25	25,27	56,67	9,59	
	CTM	10	37,98	37,90	12,50	53,57	12,66	
	CPE	10	40,33	39,67	34,00	47,27	4,43	
	Tx meio	15	27,72	27,20	15,77	43,00	8,15	<b>0,006</b>
Dif FE	CPE+CTM	10	7,19	7,38	-9,57	27,27	9,86	
	CTM	10	11,77	13,68	-15,07	27,80	14,05	
	CPE	10	7,91	7,67	0,73	14,90	4,52	
	Tx meio	15	-0,24	0,50	-12,80	20,47	8,18	<b>0,006</b>

Legenda: \*ANOVA para as avaliações pré e ANCOVA para as avaliações pós e diferenças (avaliação pré como covariável),  $p < 0,05$ ; ADF1: área diastólica final no 7º dia após indução da MI; ADF2: área diastólica final no 30º dia após transplante; Dif ADF: Diferença da ADF2-ADF1; VDF1: volume diastólico final no 7º dia após indução da MI; VDF2: volume diastólico final no 30º dia após transplante; Dif VDF: Diferença do VDF2-VDF1; ASF1: área sistólica final no 7º dia após indução da MI; ASF2: área sistólica final no 30º dia após transplante; Dif ASF: Diferença da ASF2-ASF1; VSF1: volume sistólico final no 7º dia após indução da MI; VSF2: volume sistólico final no 30º dia após transplante; Dif VSF: Diferença do VSF2-VSF1; FE1: fração de ejeção do ventrículo esquerdo no 7º dia após indução da MI; FE2: fração de ejeção do ventrículo esquerdo no 30º dia após transplante; Dif FE: Diferença da FE2-FE1.

Na comparação dos grupos dois a dois foi encontrada diferença significativa entre os valores de FE nos três grupos de tratamento versus o grupo controle (transplante de meio). No entanto, não foi encontrada diferença significativa na comparação dos grupos de tratamento entre si.

Tabela 29 – Comparação das variáveis ecocardiográficas que apresentaram valor de  $p < 0,05$

Grupos comparados	Valor de $p$						
	ASF2	Dif ASF	VSF2	Dif VSF	FE1	FE2	Dif FE
CPE+CTM x CTM	0,715	0,320	0,819	0,277	<b>0,018</b>	0,606	0,257
CPE+CTM x CPE	0,943	0,994	0,726	0,930	0,870	0,946	0,858
CPE+CTM x Tx meio	<b>0,010</b>	0,103	<b>0,029</b>	0,064	0,053	<b>0,002</b>	<b>0,048</b>
CTM x CPE	0,663	0,316	0,563	0,317	<b>0,027</b>	0,560	0,338
CTM x Tx meio	<b>0,027</b>	<b>0,008</b>	0,051	<b>0,003</b>	0,484	<b>0,007</b>	<b>0,002</b>
CPE x Tx meio	<b>0,008</b>	0,104	<b>0,012</b>	0,052	0,078	<b>0,001</b>	<b>0,031</b>

Legenda: ASF2: área sistólica final no 30º dia após transplante; Dif ASF: Diferença da ASF2-ASF1; VSF2: volume sistólico final no 30º dia após transplante; Dif VSF: Diferença do VSF2-VSF1; FE1: fração de ejeção do ventrículo esquerdo no 7º dia após indução da MI; FE2: fração de ejeção do ventrículo esquerdo no 30º dia após transplante; Dif FE: Diferença da FE2-FE1.

### 5.11.2 Comparação entre as avaliações pré e pós dentro de cada grupo

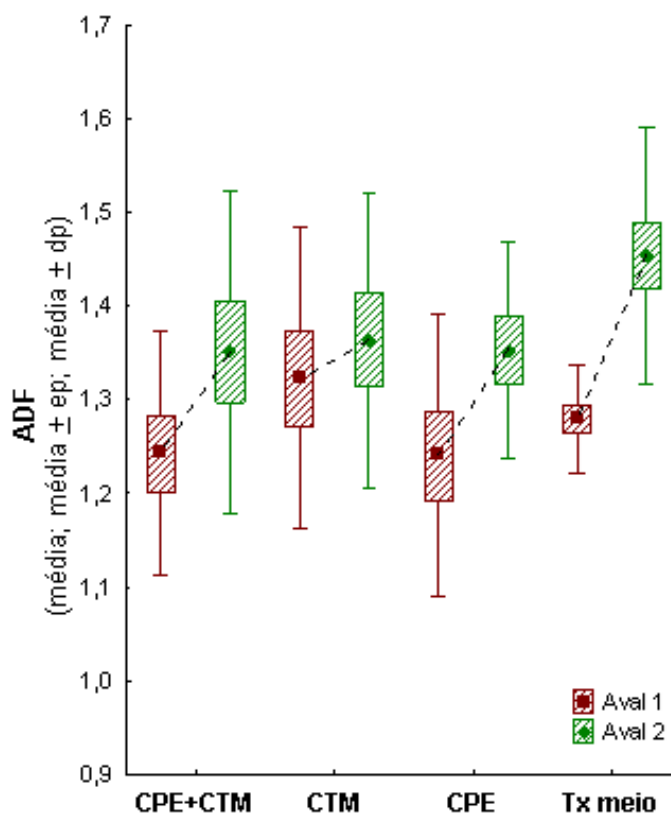
A análise ecocardiográfica demonstrou que houve melhora da FE nos grupos de terapia celular 30 dias após o transplante. O grupo transplante de meio (controle) não apresentou melhora em relação aos valores iniciais.

Tabela 30 – Comparação entre os valores da área diastólica final pré e pós-transplante dentro de cada grupo

Grupo	Avaliação	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Valor de p*
CPE+CTM	ADF1		1,24	0,13		
	ADF2	10	1,35	0,17	0,11	0,116
CTM	ADF1		1,32	0,16		
	ADF2	10	1,36	0,16	0,04	0,615
CPE	ADF1		1,24	0,15		
	ADF2	10	1,35	0,12	0,11	0,074
Tx meio	ADF1		1,28	0,06		
	ADF2	15	1,45	0,14	0,17	<0,001

Legenda: \*Teste t de Student para amostras pareadas,  $p < 0,05$ ; ADF1 = área diastólica final no 7º dia após indução da MI; ADF2 = área diastólica final no 30º dia após transplante.

Gráfico 10 – Média da área diastólica final pré e pós-transplante dentro de cada grupo



Legenda: Aval 1 = área diastólica final no 7º dia após indução da MI; Aval 2 = área diastólica final no 30º dia após transplante.

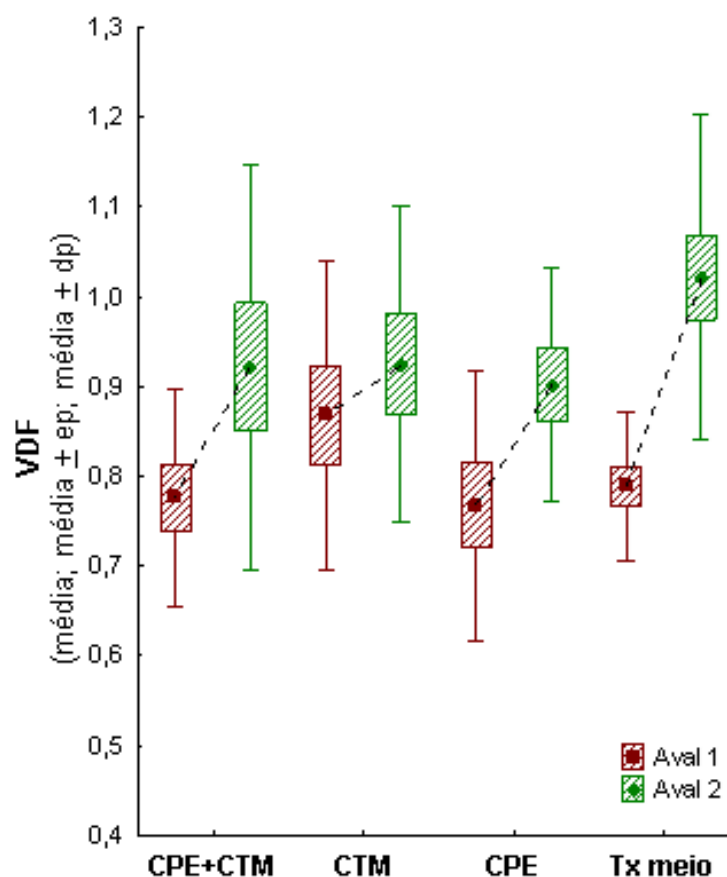


Tabela 31 – Comparação entre os valores do volume diastólico final pré e pós-transplante dentro de cada grupo

Grupo	Avaliação	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Valor de p*
CPE+CTM	VDF1	10	0,78	0,12	0,15	0,099
	VDF2		0,92	0,23		
CTM	VDF1	10	0,87	0,17	0,06	0,526
	VDF2		0,92	0,18		
CPE	VDF1	10	0,77	0,15	0,13	0,031
	VDF2		0,90	0,13		
Tx meio	VDF1	15	0,79	0,08	0,23	<0,001
	VDF2		1,02	0,18		

Legenda: \*Teste t de Student para amostras pareadas,  $p < 0,05$ ; VDF1 = volume diastólico final no 7º dia após indução da MI; VDF2 = volume diastólico final no 30º dia após transplante.

Gráfico 11 – Média do volume diastólico final pré e pós-transplante dentro de cada grupo



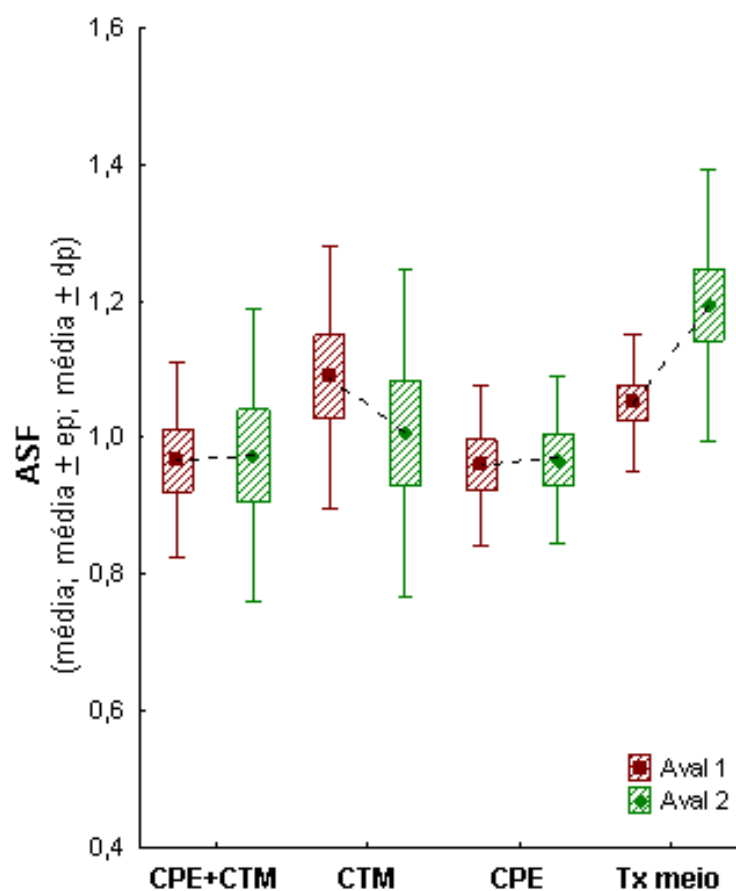
Legenda: Aval 1 = volume diastólico final no 7º dia após indução da MI; Aval 2 = volume diastólico final no 30º dia após transplante.

Tabela 32 – Comparação entre os valores da área sistólica final pré e pós-transplante dentro de cada grupo

Grupo	Avaliação	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Valor de p*
CPE+CTM	ASF1	10	0,97	0,14	0,01	0,924
	ASF2		0,97	0,21		
CTM	ASF1	10	1,09	0,19	-0,08	0,465
	ASF2		1,01	0,24		
CPE	ASF1	10	0,96	0,12	0,01	0,854
	ASF2		0,97	0,12		
Tx meio	ASF1	15	1,05	0,10	0,14	0,003
	ASF2		1,19	0,20		

Legenda: \*Teste t de Student para amostras pareadas,  $p < 0,05$ ; ASF1 = área sistólica final no 7º dia após indução da MI; ASF2 = área sistólica final no 30º dia após transplante.

Gráfico 12 – Média da área sistólica final pré e pós-transplante dentro de cada grupo



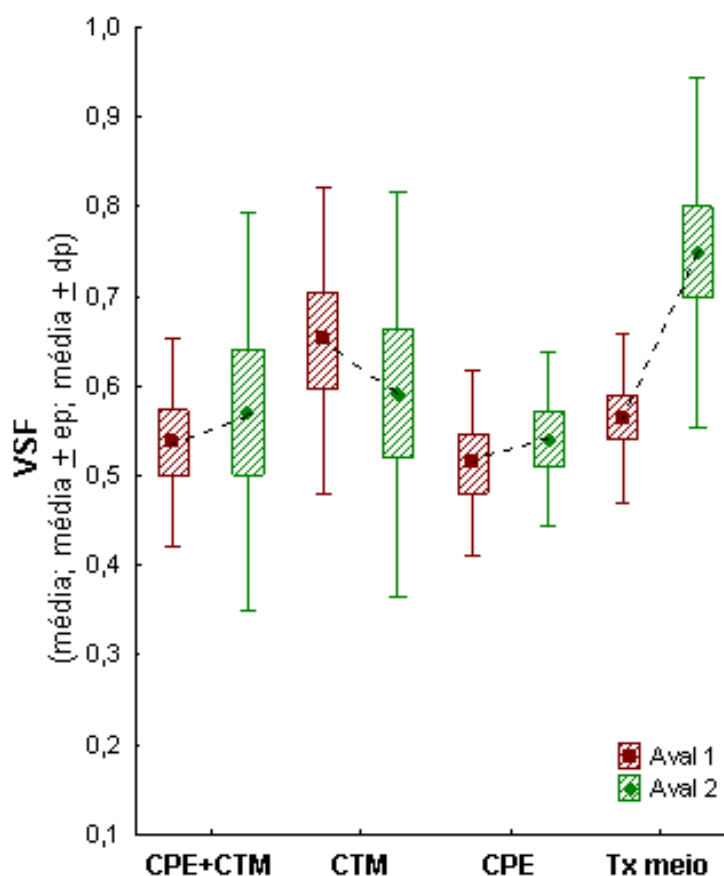
Legenda: Aval 1 = área sistólica final no 7º dia após indução da MI; Aval 2 = área sistólica final no 30º dia após transplante.

Tabela 33 – Comparação entre os valores do volume sistólico final pré e pós-transplante dentro de cada grupo.

Grupo	Avaliação	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Valor de p*
CPE+CTM	VSF1	10	0,54	0,12	0,04	0,652
	VSF2		0,57	0,22		
CTM	VSF1	10	0,65	0,17	-0,06	0,564
	VSF2		0,59	0,23		
CPE	VSF1	10	0,51	0,10	0,03	0,433
	VSF2		0,54	0,10		
Tx meio	VSF1	15	0,56	0,09	0,19	<b>&lt;0,001</b>
	VSF2		0,75	0,20		

Legenda: \*Teste t de Student para amostras pareadas,  $p < 0,05$ ; VSF1 = volume sistólico final no 7º dia após indução da MI; VSF2 = volume sistólico final no 30º dia após transplante.

Gráfico 13 – Média do volume sistólico final pré e pós-transplante dentro de cada grupo.



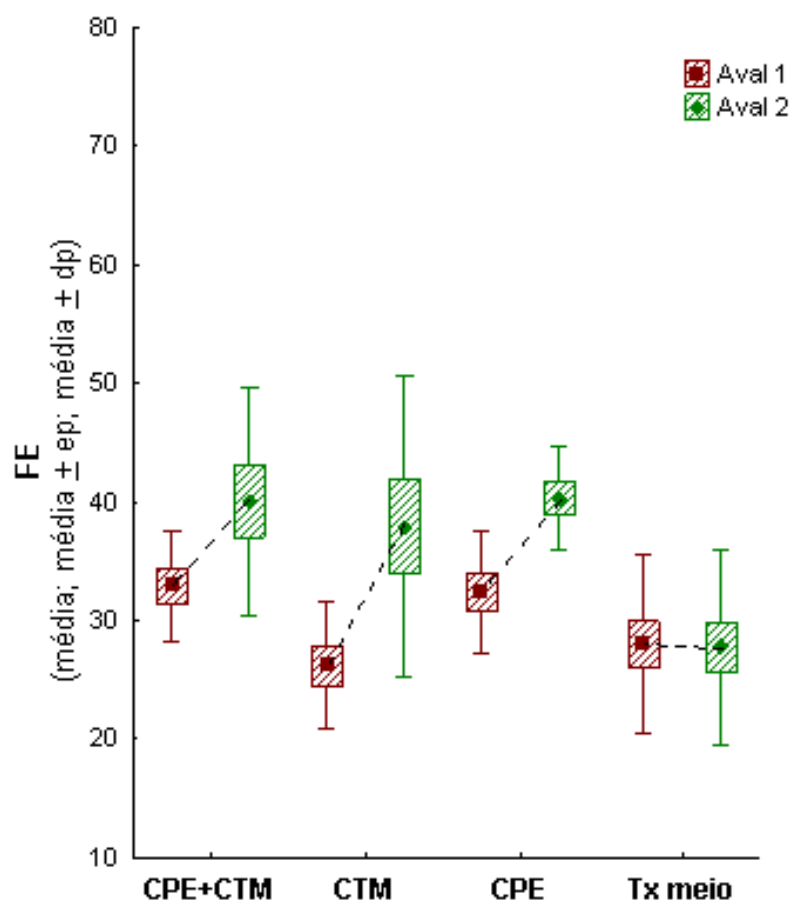
Legenda: Aval 1 = volume sistólico final no 7º dia após indução da MI; Aval 2 = volume sistólico final no 30º dia após transplante.

Tabela 34 – Comparação entre os valores da fração de ejeção pré e pós dentro de cada grupo.

Grupo	Avaliação	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Valor de p*
CPE+CTM	FE1		32,86	4,67		
	FE2	10	40,06	9,59	7,19	0,047
CTM	FE1		26,21	5,35		
	FE2	10	37,98	12,66	11,77	0,026
CPE	FE1		32,42	5,20		
	FE2	10	40,33	4,43	7,91	<0,001
Tx meio	FE1		27,95	7,56		
	FE2	15	27,72	8,15	-0,24	0,912

Legenda: \*Teste t de Student para amostras pareadas,  $p < 0,05$ ; FE1 = fração de ejeção do ventrículo esquerdo no 7º dia após indução da MI; FE2 = fração de ejeção do ventrículo esquerdo no 30º dia após transplante.

Gráfico 14 – Média da fração de ejeção pré e pós-transplante dentro de cada grupo.



Legenda: Aval 1 = fração de ejeção do ventrículo esquerdo no 7º dia após indução da MI; Aval 2 = fração de ejeção do ventrículo esquerdo no 30º dia após transplante.

## 6 DISCUSSÃO

Dentre as doenças isquêmicas do coração, o infarto agudo do miocárdio é a principal causa de óbito na população mundial. Apesar dos avanços farmacológicos, das intervenções intravasculares para a colocação de *stents*, tratamentos intervencionistas e cirurgia de revascularização, nenhum é eficaz para substituir o tecido isquêmico por cardiomiócitos funcionais. Frente a este quadro, se faz necessário a busca de novas terapias para o reparo do miocárdio.

A terapia celular tem sido proposta na cardiologia para evitar o afinamento da parede miocárdica e a expansão da lesão isquêmica. A descoberta de células-tronco cardíacas residentes (172), células c-kit<sup>+</sup> (24), células derivadas de cardioesferas (295), células islet-1<sup>+</sup> (296), associado à demonstração de que as células-tronco derivadas da medula óssea são mobilizadas para o tecido cardíaco e se transdiferenciam em cardiomiócitos (297), demonstram a ocorrência e a importância da auto-renovação miocárdica. No entanto, o coração não consegue regenerar totalmente o tecido lesado por ações patológicas (23).

Até o momento, a maioria dos estudos experimentais e clínicos utilizaram células-tronco adultas após o infarto agudo do miocárdio e demonstraram uma melhora global da função cardíaca. O uso terapêutico de células não selecionadas derivadas da medula óssea foi uma das primeiras abordagens clínicas da terapia celular para aplicação na cardiologia (298). Vários estudos clínicos investigaram o uso de células derivadas da medula óssea para o tratamento do infarto agudo do miocárdio (33, 217, 299, 300), bem como o de linhagens específicas, como as células 133<sup>+</sup> (301), células 34<sup>+</sup> (302), células-tronco mesenquimais (303) e células-tronco cardíacas residentes (304). No entanto, os resultados obtidos são conflitantes.

O modelo experimental utilizado neste estudo mostrou-se de fácil execução e boa reprodutibilidade. Os nossos dados corroboram com Minicucci et al. (2010) que relataram em animais infartados a presença de maiores diâmetros do átrio esquerdo e maior cavidade do ventrículo esquerdo na diástole e na sístole, além de desenvolverem hipertrofia na parede do ventrículo esquerdo e alteração da forma elíptica para esférica (305). A partir dos trabalhos Pfeffer et al. (1985) demonstrou-se que 50% dos animais evoluem a óbito quando o ventrículo esquerdo está comprometido em 5 a 19,9%; já para infartos considerados moderados, entre 20 a

39,9%, 75% dos animais evoluem a óbito e, para grandes infartos, com comprometimento acima de 40%, 85% dos animais evoluem a óbito em um período de 12 meses (212). Zornoff et al. (2009), em artigo de revisão, citam que a mortalidade verificada nas primeiras 24 horas após a indução da miocardiopatia isquêmica situa-se comumente entre 40 e 60% (306).

No presente trabalho foram utilizados 440 animais para a indução da miocardiopatia isquêmica. A mortalidade durante o procedimento de indução da MI foi de 132 animais, no pós-cirúrgico foi de 70 animais e após 24 horas foi de 16 animais, totalizando 49,6% de óbitos. A primeira análise ecocardiográfica foi realizada em 222 animais, destes apenas 62 (27,9%) apresentaram fração de ejeção igual ou inferior a 40%, sendo este o critério de inclusão no estudo. No nono dia após a indução da MI os animais foram randomizados entre os quatro grupos experimentais, sendo 18 para o grupo controle, 17 para o grupo CTM, 13 para o grupo CPE e 14 para o grupo CTM+CPE. A mortalidade durante ou após o transplante foi de 3 animais para o grupo controle, 7 animais para o grupo CTM, 3 animais para o grupo CPE e 4 animais para o grupo CTM+CPE, totalizando 45 animais vivos até o 30º dia após o transplante. Justifica-se, desta maneira, o grande número de animais necessários para o desenvolvimento dos ensaios pré-clínicos. Goldman e Raya (1995) citam que o grande atrativo deste modelo experimental é a similaridade com as alterações fisiopatológicas que ocorrem após o infarto em humanos, além de ser reprodutível e viável economicamente (207).

Nós optamos em desenvolver o modelo de MI em animais imunocompetentes e que não fossem submetidos a imunossupressão. O trabalho de Tolar et al. (2007) indica que o uso da imunossupressão nas terapias celulares alogênicas ou xenogênicas para o infarto agudo do miocárdio deve ser visto com cautela, pois pode impedir os efeitos terapêuticos das células-tronco, uma vez que a função ventricular esquerda melhorou apenas em camundongos com sistema imunológico intacto (213).

A via de administração escolhida foi a intracardiaca que apresenta como vantagem a visualização da aplicação das células na área de interesse. No entanto, este procedimento implica em uma nova cirurgia com a necessidade de toracotomia, que, neste estudo, resultou em uma taxa de mortalidade de 27,4%. Novos estudos devem ser realizados para verificar se a infusão das células pela via caudal ou pela

jugular não trariam os mesmos benefícios sem a necessidade dos animais já comprometidos fisiologicamente passarem por uma cirurgia de grande porte.

A utilização em conjunto das CTM e CPE para a terapia celular em cardiopatias foi pouco explorada na literatura. O trabalho de Suuronen et al. (2007) utilizou ratos Sprague-Dawley no modelo experimental de infarto por ligadura da artéria coronária utilizando células homólogas. Foram transplantadas  $1 \times 10^6$  células em 3 diferentes grupos: células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, células progenitoras endoteliais derivadas do sangue periférico e a associação dos dois tipos celulares. O único grupo que apresentou melhora da fração de ejeção foi o que recebeu células progenitoras endoteliais (146).

Em outro modelo experimental, Zhang et al. (2008) induziram ratas a lesão miocárdica pela aplicação de isoproterenol. As células foram obtidas da fração mononuclear da medula óssea de ratos machos. Após 4 semanas foram transplantadas  $2 \times 10^6$  células por animal entre os seguintes grupos: CPE, CTM, CPE e CTM. Os grupos para controle receberam 200 $\mu$ L de salina e 200 $\mu$ L de meio EGM-2. A avaliação dos resultados demonstrou que o grupo que recebeu o transplante da associação de CPE e CTM apresentou uma melhora na função cardíaca, pois aumentou a fração de ejeção e a fração de encurtamento e reduziu a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo quando comparado com os demais grupos (225).

No entanto, os dados obtidos no nosso estudo diferem dos relatados por Suuronen et al. (2007) e por Zhang et al. (2008) e podem ser atribuídos a diversos fatores. Primeiramente, no nosso estudo foram utilizadas células-tronco mesenquimais derivadas da geléia de Wharton de cordão umbilical humano e células progenitoras endoteliais derivadas do sangue de cordão umbilical humano. Os trabalhos de Zhang et al (2008) e Suuronen (2007) utilizaram células da medula de ratos. Nos dois trabalhos as células não foram devidamente caracterizadas pela morfologia, imunofenotipo e funcionalidade. No nosso estudo o número de células injetadas foi de  $2 \times 10^6$  por animal, sendo que o grupo CTM+CPE recebeu  $1,0 \times 10^6$  de cada tipo celular, corroborando com o trabalho de Zhang et al (2008). No trabalho de Suuronen et al (2007) o número de células foi de apenas  $1 \times 10^6$  por animal. Os três trabalhos utilizaram o volume de 200  $\mu$ L para a injeção das células e do meio/PBS.

Com os resultados obtidos pela avaliação ecocardiográfica, confirma-se a efetividade da terapia celular na melhora da função cardíaca, onde a diferença do

percentual da função ventricular esquerda, 30 dias pós-transplante, do percentual da função ventricular esquerda pré-transplante, foi de 7,19% no grupo CTM+CPE, 7,91% no grupo CPE e 11,77% no grupo CTM. Já o grupo controle não apresentou melhora, pois a diferença entre a FEVE após 30 dias e da FEVE no 7º dia após indução da MI foi de -0,23%. Ao analisar comparativamente os grupos que receberam o transplante de células constata-se que não houve diferença significativa entre os diferentes tipos de tratamento. Todos os grupos de terapia celular, independentemente do tipo celular, apresentaram efeitos benéficos na função do ventrículo esquerdo em animais com fração de ejeção  $\leq 40\%$ . Entretanto, ocorreu diferença significativa na comparação dos grupos tratamento com o grupo controle. No trabalho de Suuronen et al (2007) não foi utilizada a fração de ejeção como parâmetro de elegibilidade e, ao se comparar as análises ecocardiográficas da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, observou-se uma redução após 4 semanas do transplante nos grupos que receberam PBS de  $69 \pm 11,7\%$  para  $49,6 \pm 9,5\%$ , no grupo CTM de  $68,3 \pm 18,9\%$  para  $53 \pm 6\%$ , no grupo CTM+CPE de  $69,4 \pm 7,4\%$  para  $55 \pm 11,1\%$  e o grupo que recebeu CPE permaneceu estável de  $66,4 \pm 17,6\%$  para  $68,3 \pm 9,8\%$ . O grupo que recebeu a associação dos dois tipos celulares não apresentou melhora, possivelmente pelo efeito dose-resposta (146). No presente estudo esperava-se que o grupo que recebeu a associação dos dois tipos celulares apresentasse uma melhor resposta frente aos grupos que receberam apenas um tipo celular, no entanto, não houve diferença significativa ao analisar a fração de ejeção do ventrículo esquerdo entre os diferentes grupos de tratamento. Já no estudo de Zhang et al. (2008) as ratas que apresentaram redução de 20% na fração de ejeção do ventrículo esquerdo após a indução com isoproterenol foram selecionadas para o estudo. O valor da FEVE pré-indução foi de  $77,47 \pm 1,97\%$ , após a indução foi reduzida para  $56,16 \pm 4,23\%$ . Após 12 semanas do tratamento os grupos apresentaram os seguintes valores para a fração de ejeção de ventrículo esquerdo: PBS  $55,68 \pm 3,34\%$ ; Meio EGM-2  $55,04 \pm 3,53\%$ ; CTM  $62,85 \pm 4,84\%$ ; CPE  $63,43 \pm 4,49\%$  e CTM+CPE  $68,23 \pm 2,69\%$ . O grupo que recebeu a associação dos dois tipos celulares apresentou uma melhor resposta frente aos demais (225). No entanto, o modelo experimental difere do presente estudo como também do estudo de Suuronen et al (2007). Outra grande divergência é o valor basal da fração de ejeção, que nos dois trabalhos citados foi superior ao utilizado neste estudo.



Ao transpor estes resultados para os estudos clínicos demonstra-se a efetividade das células no tratamento, pois Assmus et al. (2006) realizaram uma metanálise de estudos clínicos e relataram um aumento significativo de 3,66% da FEVE nos pacientes que receberam o transplante de células-tronco derivadas da medula óssea (307, 308). O mesmo foi observado na revisão realizada por Gersh et al (2009) onde o resultado obtido em 4 diferentes estudos clínicos demonstrou um aumento de, aproximadamente, 3% na FEVE (309).

A análise do sangue periférico pelo arranjo de anticorpos demonstrou que citocinas humanas estavam presentes na circulação periférica após 30 dias do transplante. Assim, estima-se que algumas células transplantadas estavam presentes e funcionais, secretando fatores tróficos que atenuam o remodelamento ventricular, induzem a neovascularização e promovem a regeneração tecidual (115, 310, 311).

Na análise por FISH foram encontradas evidências de que as células humanas transplantadas fusionaram-se ao tecido isquêmico nos três grupos experimentais, corroborando com Zhang et al (2008) que encontraram células de ratos machos transplantadas em ratas após 12 semanas do transplante nos 3 grupos: CTM; CPE e CTM+CPE (225). Foi relatado por Hirata et al. (2005), em ratos Wistar machos induzidos ao IAM que receberam  $2 \times 10^5$  células CD34<sup>+</sup> injetadas via intramiocárdica derivadas do sangue de cordão umbilical, que as células transplantadas sobreviveram, foram localizadas ao redor dos vasos do tecido isquêmico e melhoraram a vascularização, mas apenas 1% das células injetadas foi incorporada aos vasos cardíacos. Alvarez-Dolado et al. (2003) concluíram que a fusão das células mononucleares aos cardiomiócitos parece ser um fenômeno bastante raro (312). Nossos resultados vão de encontro ao apresentado por estes autores, uma vez que as células transplantadas foram encontradas em baixa frequência após 30 dias do transplante.

Na análise histológica pode-se evidenciar pela coloração de tricrômio de Masson, redução das estriações e dos núcleos, decorrente da degeneração e morte das fibras musculares cardíacas e, conseqüentemente, substituição por tecido conjuntivo. No entanto, a avaliação morfométrica dos grupos que receberam o transplante de células demonstrou redução nas taxas de colágeno quando comparados ao grupo controle. O mesmo foi demonstrado por Zhang et al. (2008), onde os grupos que receberam o transplante demonstraram uma menor taxa de

deposição de colágeno, sendo de 31,81% para o grupo CTM, 30,28% para o grupo CPE e 25,59% para o grupo CTM+CPE (225).

A análise quantitativa e qualitativa de colágeno pela coloração de picrossírius red demonstrou que os animais que receberam o transplante de células apresentaram menor deposição de colágeno quando comparados com os animais que receberam o transplante de meio, vindo de encontro aos resultados observados na função ventricular. Dados semelhantes foram observados por Hu et al. (2006), onde o grupo de ratos infartados que recebeu o transplante de células mononucleares do SCUh apresentou menor densidade de colágeno no ventrículo esquerdo (313). Desta forma, demonstra-se que as células transplantadas atenuam o processo de remodelamento cardíaco.

Em conjunto, os dados obtidos demonstraram melhora nos parâmetros cardíacos funcionais e histopatológicos dos animais que receberam o transplante de CTM, CPE ou CTM+CPE. No entanto, a retenção das células no coração foi bastante reduzida.

Inicialmente acreditava-se que o mecanismo de ação das células transplantadas ocorresse por transdiferenciação. O estudo pioneiro realizado por Orlic et al. (2001) demonstrou que células mononucleares da medula óssea de camundongos machos foram capazes de regenerar o músculo cardíaco de camundongos fêmeas quando injetadas na cicatriz do infarto. Após nove dias do IAM foram localizadas na região do infarto células endoteliais, células musculares e células endoteliais com o cromossomo Y (214). Em outro estudo foi observado que as CTM após o tratamento com 5-azacitidina poderiam se diferenciar em cardiomiócitos quando injetadas em ratos infartados por criolesão e melhorar a função ventricular (135). No entanto, há relatos na literatura que a transdiferenciação não ocorre *in vivo*. Outros pesquisadores quando transplantaram células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea não encontraram células transdiferenciadas (28, 314), indo contra ao apresentado por Tomita et al. (1999) (135) e Orlic et al. (2001) (214).

A fusão também foi proposta como mecanismo de ação das células-tronco (312, 315). No entanto, foi relatado com baixa frequência, o que reduz a possibilidade deste mecanismo ser o principal fator de efetividade da terapia celular.

Nós não investigamos o mecanismo de ação das células, no entanto acredita-se que o potencial parácrino e imunomodulador sejam os principais responsáveis

pelos efeitos benéficos da terapia celular, já que as isquemias começam com processos inflamatórios. Existe um número crescente de evidências que suportam a hipótese de que o mecanismo parácrino mediado pela liberação de fatores pelas células-tronco adultas desempenha um papel essencial no processo de reparação observado após a mobilização ou transplante de células-tronco no infarto do miocárdio (316). Tem sido demonstrado que as células-tronco adultas, particularmente as CTM, produzem e secretam uma grande variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem estar potencialmente envolvidos na reparação cardíaca (317). Concentrações teciduais de proteínas, tais como VEGF, bFGF, HGF, IGF-I, e adrenomedulina estão aumentadas significativamente nos tecidos cardíacos isquêmicos tratados com CTM ou células-tronco multipotentes derivadas da medula óssea (162, 318).

Alguns pesquisadores propuseram que os benefícios funcionais observados após o transplante de células-tronco em modelos animais de lesão cardíaca podem estar relacionados à secreção de fatores solúveis que, agindo de forma parácrina, protegem o coração, atenuando o remodelamento ventricular, induzindo a neovascularização, e promovendo a regeneração tecidual (115, 310). Assim, os três principais mecanismos de ação das células-tronco adultas na reparação cardíaca seriam: a regeneração dos cardiomiócitos, a vasculogênese e as ações parácrinas (316).

Estudos experimentais dão um forte suporte ao mecanismo parácrino na reparação cardíaca. Resultados encorajadores foram obtidos em ensaios experimentais em que a administração de meio condicionado proveniente de células-tronco adultas é capaz de repetir os efeitos benéficos observados após terapia celular. Foi demonstrado que o meio condicionado de CTM, particularmente das CTM geneticamente modificadas para a superexpressão do gene Akt-1, exercem proteção dos cardiomiócitos isquêmicos e, através dos meios de cultura condicionados para hipóxia, são capazes de reduzir a apoptose e a necrose de cardiomiócitos de ratos expostos a baixas tensões de oxigênio (310, 311). Esses dados comprovaram que as CTM exercem seu efeito protetor no miocárdio pela liberação de fatores parácrinos e que a ativação da via de Akt potencializa a produção e a liberação desses fatores.

Uma das abordagens em outros trabalhos do nosso grupo foi que a eficácia dos transplantes de CTM seria melhorada se houvesse uma pré-diferenciação

destas em cardiomíocitos *in vitro* antes dos transplantes *in vivo* como estratégia para prevenir a diferenciação intramiocárdica das CTM. Rebelatto et al. (2009) demonstraram que o tratamento de CTM derivadas da MO e do TA com doadores de óxido nítrico aumenta a expressão dos níveis de VEGF *in vitro* (319). Berardi et al. (2011) utilizaram CTM derivadas do TA pré-comissionadas para o fenótipo cardíaco. Foi desenvolvido o modelo de IAM em ratos Wistar em 3 grupos: Tx de meio, Tx de CTM e Tx de CTM+SNAP (doador de óxido nítrico). Após 30 dias do transplante os animais que receberam as células tratadas *in vitro* com SNAP apresentaram aumento significativo da fração de ejeção, tendência de menor remodelamento, aumento da expressão de marcadores musculares cardíacos e de neovascularização (320). Schittini et al. (2010) investigaram o potencial dos fatores solúveis liberados no meio, através de explante cardíaco humano, sobre as CTM derivadas da medula óssea. Níveis aumentados do mRNA de VEGF, conexina-43, troponina I e troponina T foram observados nas CTM cultivadas com meio condicionado quando comparadas com o controle. Os resultados sugerem que o meio condicionado de explantes cardíacos humanos talvez funcione como um modelo *in vitro* para estudar fatores de diferenciação cardíaca com potencial para aplicações clínicas futuras (321).

Neste trabalho as concentrações plasmáticas de IL-6, IL-8, trombopoietina e interferon-gama humana em todos os grupos de terapia celular indicaram que algumas das células transplantadas permaneceram vivas e ativas nos ratos após um mês de transplante liberando, pelos menos, estes quatro fatores parácrinos. A liberação de fatores de crescimento e citocinas pelas células transplantadas pode ter auxiliado no processo de regeneração cardíaca. A produção local ou sistêmica de mediadores inflamatórios talvez influencie não somente a migração das CTM aos tecidos danificados (322, 323), mas também a proliferação, diferenciação (324) e a integração das células exógenas aos tecidos danificados (325). Além disso, as células podem secretar fatores importantes na regulação da angiogênese (326). A IL-6 é uma citocina responsável pelo crescimento celular, apoptose, sobrevivência e diferenciação em vários tipos celulares e órgãos, inclusive o coração (327). Ainda, IL-6 é conhecida não somente pela modulação dos processos inflamatórios, mas também pela modulação na angiogênese. A IL-8 e Gro trabalham conjuntamente na ativação de neutrófilos ao tecido danificado com infarto do miocárdio (328), além de participarem no processo de angiogênese (329). Várias pesquisas básicas e clínicas

têm sugerido que o principal regulador da produção de plaquetas, trombopoietina (TPO) (330), desempenha um papel vital na auto-renovação e expansão de células-tronco hematopoéticas (331), atua na formação hemangioblastos (332) e na síntese e secreção de VEGF (333). Amano et al. (2005) demonstraram em um modelo experimental de terapia gênica em ratos que os efeitos da TPO em resposta à isquemia aguda são, provavelmente, mediados pela liberação de fatores angiogênicos pelas plaquetas para o tecido isquêmico (334). Segundo Kuby et al. (1999), o INF- $\gamma$  contribui na resposta inflamatória aguda e principalmente na crônica, atraindo macrófagos e aumentando o número de células fagocitárias no local da inflamação (335). Interessantemente, o grupo transplantado com os dois tipos celulares juntos apresentou um maior número de fatores parácrinos, mas estes fatores foram tanto pró-angiogênicos quanto anti-angiogênicos. Isto poderia explicar, pelo menos parcialmente, os resultados das avaliações funcionais dos corações dos ratos transplantados, ainda que não existam diferenças significativas entre os grupos.

A efetividade do transplante de células-tronco é inquestionável, mas algumas questões permanecem em aberto, como qual é a melhor via para o transplante no miocárdio, qual é o número de células ideal para a efetividade do transplante, qual é o mecanismo de ação das células transplantadas, qual é a melhor fonte celular e como fazer para que as células sobrevivam por mais tempo.

A busca pela fonte celular ideal é uma constante na área da terapia celular. A possibilidade de utilizar células derivadas do SCUh e do CUh aumenta com o desenvolvimento de estudos pré-clínicos e clínicos. São muitas as vantagens destas fontes celulares frente a medula óssea: a coleta não oferece risco ao recém-nascido e a parturiente, as células apresentam alta capacidade proliferativa, alto potencial de diferenciação, baixa imunorrelatividade, baixa possibilidade de transmissão de doenças infecciosas por vírus latentes, são fontes de CTH, CPE, CTM e de linhagens multi/pluripotentes de células-tronco. Já a medula óssea apresenta como fator complicador a dificuldade de encontrar doadores de medula óssea compatíveis com os receptores, agravado pela grande variabilidade genética e alta miscigenação da população brasileira, além do procedimento ser altamente invasivo, trabalhoso e doloroso. A aplicação autóloga das células derivadas da medula óssea evita o problema de rejeição, mas a idade do paciente influencia no potencial de auto-

renovação, proliferação e diferenciação celular (66, 143), pesando diretamente na efetividade da terapia.

Outra abordagem deste estudo foi padronizar a obtenção de CTM derivadas do CUh. Uma vez que a obtenção das CTM a partir da MO apresentam os problemas citados anteriormente, as CTM derivadas do CUh são uma fonte alternativa para a aplicação clínica visto que são abundantes e de fácil acesso. Outra vantagem referente a este tipo celular é que os pacientes que forem transplantados terão um menor índice de rejeição em comparação a outras fontes celulares, uma vez que estas células apresentam baixa expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal humano tipo I (HLA-ABC) e ausência da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal humano tipo II (HLA-DR), caracterizando baixa imunogenicidade, o que favorece o uso destas células em terapias alogênicas (238). Além disso, o SCUh pode fornecer CPE de um mesmo doador, possibilitando aplicações mais abrangentes na medicina regenerativa. A obtenção das CPE derivadas do SCUh já foi padronizada no nosso grupo de pesquisa pelo trabalho de Senegaglia et al. (2008, 2010) (174, 336).

O trabalho realizado por Salehinejad et al., (2012) demonstrou que a utilização de colagenase e tripsina proporciona melhores resultados em relação a conservação das características celulares quando comparado ao isolamento por colagenase/hialuronidase/tripsina e explante (240). No entanto, independente do método escolhido, é necessário cultivar as células antes da utilização, pois devido ao isolamento enzimático há muitos *debris* celulares que são eliminados durante o cultivo.

Atualmente, há um enorme interesse no estabelecimento e desenvolvimento de bancos de sangue do cordão umbilical. Em todo o mundo, mais de 400 mil unidades de sangue do cordão umbilical estão disponíveis em mais de 50 bancos (227). No entanto, há uma polêmica entre as opções de bancos para armazenamento de SCUh: público e privado. Os bancos públicos dispõem as unidades de SCUh para o transplante alogênico, utilizando o material de doadores voluntários. Antes da inclusão no registro, as amostras são examinadas com base no volume, número e tipos de células, histórico de saúde e doenças infecciosas. Por outro lado, os bancos de sangue privados armazenam o SCUh para uso autólogo da criança sob a tutela dos pais. Neste serviço as amostras são mais onerosas tanto na coleta como na manutenção. A maior crítica aos bancos privados é que o doador

para quem o sangue foi congelado, provavelmente nunca vai precisar do SCU armazenado e o mesmo não é acessível ao público em geral (337). Ballen et al. (2008) estimaram que a chance de um indivíduo desenvolver uma doença tratável com o seu próprio SCUh, até a idade de 20 anos, é de 0,04% a 0,005%, na hipótese de transplante hematopoético (338). Johnson (1997) relatou que a proporção de indivíduos que seriam candidatos para usar transplantes autólogo ou alogênico entre irmãos, é de 1/2.700 e 1/1.400, respectivamente (339). Por isso, é necessária a otimização do SCUh e do CUh para a obtenção de diferentes tipos celulares como fontes alternativas para a aplicação clínica.

No esforço de superar doenças incuráveis, pode ser apenas uma questão de tempo até as células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical e as células progenitoras endoteliais derivadas do sangue do cordão umbilical serem utilizadas com sucesso em aplicações de engenharia clínica e tecidual.

Como relatado acima, estudos randomizados com o objetivo de avaliar a utilização terapêutica de células-tronco adultas no miocárdio isquêmico têm gerado diferentes resultados. Embora seja concebível que estas observações conflitantes são causadas pela utilização de diferentes técnicas, tipos de células, fontes celulares, da dose celular e da via de aplicação, não há um consenso na literatura quanto às seguintes questões:

- Qual é a dose, a via e o tempo de transplante celular terapeuticamente ideal?
- Quais são os potenciais benefícios terapêuticos das células no restabelecimento funcional do órgão-alvo?
- As CTM e CPE derivadas do CUh e do SCUh, respectivamente são seguras e viáveis?
- O transplante realizado imediatamente após o infarto (cenário agudo) é mais efetivo aos realizados vários dias após o infarto (cenário crônico)?
- Há uma forma de melhorar a retenção e sobrevivência das células transplantadas?
- Qual o tempo de duração dos benefícios da terapia com células-tronco?
- Será possível a re-injeção de células-tronco no mesmo paciente?

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que:

O isolamento das CTM provenientes da geléia de Wharton do cordão umbilical humano foi efetivo;

O isolamento das CPE provenientes do sangue de cordão umbilical humano foi efetivo;

Foi possível caracterizar as CTM e as CPE por meio de análise morfológica, fenotípica e por ensaios funcionais;

O ensaio de imunofluorescência indireta permitiu analisar a expressão de proteínas específicas pelas CTM e CPE;

Foi estabelecido o modelo de indução a miocardiopatia isquêmica em ratos Wistar;

A análise ecocardiográfica demonstrou que o transplante celular dos três grupos foi efetivo na melhora funcional do modelo experimental de miocardiopatia isquêmica desenvolvido em ratos Wistar;

A análise histológica pela coloração de tricrômio de Masson e Picrossírius red demonstrou que os animais que receberam o transplante celular reduziram a área de colágeno no tecido isquêmico;

A análise por FISH demonstrou poucas células humanas fusionadas ao tecido isquêmico;

A análise do sangue periférico dos animais 30 dias após o transplante demonstrou a presença de fatores angiogênicos humanos.



## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. **The World Health Report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life**. The world health report 2002. Disponível em:<[http://www.who.int/whr/2002/en/whr02\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf)>.
2. Timerman S, Ramires J. Morte Súbita – Aspectos Epidemiológicos. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. 2006;16(1):8-23.
3. Lotufo PA. A mortalidade precoce por doenças crônicas nas capitais de áreas metropolitanas do Brasil. : Universidade de São Paulo; 1996.
4. Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2008: 20 anos de Sistema Único de Saúde no Brasil**. 2009. p. 416.
5. World Health Organization. **The world health report 1999: Making a difference 1999**. Disponível em:< [http://www.who.int/whr/1999/en/whr99\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/1999/en/whr99_en.pdf)>.
6. World Health Organization. **The world health report 2000 - Health systems: improving performance 2000**. Disponível em:< [http://www.who.int/whr/2000/em/whr00\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2000/em/whr00_en.pdf)>.
7. da Silva MA, Sousa AG, Schargodsky H. [Risk factors for acute myocardial infarction in Brazil. FRICAS Study]. **Arq Bras Cardiol**. 1998;71(5):667-75.
8. Piegas LS, Avezum A, Pereira JC, Neto JM, Hoepfner C, Farran JA, et al. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. **Am Heart J**. 2003;146(2):331-8.
9. Kannel WB, Cupples LA, D'Agostino RB. Sudden death risk in overt coronary heart disease: the Framingham Study. **Am Heart J**. 1987;113(3):799-804.
10. Fenton DE. **Myocardial Infarction**. eMedicine; 2008. Disponível em:<<http://emedicine.medscape.com/article/759321-overview>>.
11. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Clin Invest**. 1991;88(6):1785-92.
12. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. **Circulation**. 1977;56(5):786-94.
13. Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. **Circulation**. 1993;88(1):107-15.
14. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**. 1986;74(5):1124-36.
15. D'Alecy LGZ, G.B. Pathophysiology of ischemia and hypoxia. In: Zelenock GB DAL, Shlafer M, Fantone III JC, Stanley JC, editor. **Clinical ischemic syndromes:**

**mechanisms and consequences of tissue injury.** St Louis: The CV Mosby company; 1990. p. 618.

16. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. **Circulation.** 1990;81(4):1161-72.
17. Epifanio HB, Zornoff LA, Matsubara BB, de Paiva SA, Inoue RM, Matsubara LS. [Myocardial remodeling after experimental acute myocardial infarction in rats. Effect of renin-angiotensin-aldosterone blockade]. **Arq Bras Cardiol.** 2005;84(1):10-4.
18. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESCAAHAWHFTFftRoMI. Universal definition of myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol.** 2007;50(22):2173-95.
19. Vandervelde S, van Luyn MJ, Tio RA, Harmsen MC. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. **J Mol Cell Cardiol.** 2005;39(2):363-76.
20. Ambrose JA. Myocardial ischemia and infarction. **J Am Coll Cardiol.** 2006;47(11 Suppl):D13-7.
21. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. **Chest.** 1978;73(6):843-9.
22. Srinivas G, Anversa P, Frishman WH. Cytokines and myocardial regeneration: a novel treatment option for acute myocardial infarction. **Cardiol Rev.** 2009;17(1):1-9.
23. Laflamme MA, Zbinden S, Epstein SE, Murry CE. Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev Pathol.** 2007;2:307-39.
24. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Human cardiac stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007;104(35):14068-73.
25. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circ Res.** 2004;95(1):9-20.
26. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. **Circ Res.** 2002;91(12):1092-102.
27. Oliveira DM, Campos AH. Uso terapêutico de células-tronco em cardiologia. **Einstein.** 2009;7(2):7.
28. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. **Nature.** 2004;428(6983):668-73.

29. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001;98(18):10344-9.
30. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nat Med**. 2001;7(4):430-6.
31. Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. **Gene Ther**. 2000;7(6):451-7.
32. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000;97(7):3422-7.
33. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation**. 2002;106(24):3009-17.
34. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. **Lancet**. 2003;361(9351):45-6.
35. Gowdak LH, Schettert IT, Rochitte CE, Lisboa LA, Dallan LA, Cesar LA, et al. Early increase in myocardial perfusion after stem cell therapy in patients undergoing incomplete coronary artery bypass surgery. **J Cardiovasc Transl Res**. 2011;4(1):106-13.
36. Gowdak LH, Schettert IT, Baptista E, Lopes NL, Rochitte CE, Vieira ML, et al. Intramyocardial injection of autologous bone marrow cells as an adjunctive therapy to incomplete myocardial revascularization--safety issues. **Clinics (Sao Paulo)**. 2008;63(2):207-14.
37. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. **J Am Coll Cardiol**. 2005;46(9):1651-8.
38. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOW transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. **Circulation**. 2006;113(10):1287-94.
39. Meluzin J, Janousek S, Mayer J, Groch L, Hornacek I, Hlinomaz O, et al. Three-, 6-, and 12-month results of autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. **Int J Cardiol**. 2008;128(2):185-92.

40. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. **Science**. 1994;264(5155):98-101.
41. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. **J Clin Invest**. 1996;98(11):2512-23.
42. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. **Nat Med**. 1998;4(8):929-33.
43. Kessler PD, Byrne BJ. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. **Annu Rev Physiol**. 1999;61:219-42.
44. Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2000;119(6):1169-75.
45. Taylor DA. Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease and heart failure. **Curr Control Trials Cardiovasc Med**. 2001;2(5):208-10.
46. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. **J Am Coll Cardiol**. 2003;41(7):1078-83.
47. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2007;133(3):717-25.
48. Ahmadi H, Baharvand H, Ashtiani SK, Soleimani M, Sadeghian H, Ardekani JM, et al. Safety analysis and improved cardiac function following local autologous transplantation of CD133(+) enriched bone marrow cells after myocardial infarction. **Curr Neurovasc Res**. 2007;4(3):153-60.
49. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation**. 2002;105(1):93-8.
50. Chen S, Liu Z, Tian N, Zhang J, Yei F, Duan B, et al. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. **J Invasive Cardiol**. 2006;18(11):552-6.
51. Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2006;26(2):257-66.

52. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. **Physiol Rev.** 2005;85(4):1373-416.
53. Gomperts BN, Strieter RM. Stem cells and chronic lung disease. **Annu Rev Med.** 2007;58:285-98.
54. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat Res.** 1961;14:213-22.
55. Dorn J, Wagers A, Weissman IL. **Regenerative Medicine.** Department of Health and Human Services. Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells. Disponível em: < <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2006report.htm> > Acesso em: 23 nov. 2009.
56. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. **Cell.** 2004;116(5):639-48.
57. Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M. Stem cells: promises versus limitations. **Tissue Eng Part B Rev.** 2008;14(1):53-60.
58. National Institutes of Health. **Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions.** Department of Health and Human Services. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/2001report/2001report.htm>>. Acesso em: 01 abr. 2010.
59. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.** 2002:369-91.
60. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol.** 2002;12(11):502-8.
61. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Int J Biochem Cell Biol.** 2004;36(4):568-84.
62. Sujata L, Chaudhuri S. Stem cell niche, the microenvironment and immunological crosstalk. **Cell Mol Immunol.** 2008;5(2):107-12.
63. Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. **Cytotherapy.** 2005;7(1):36-45.
64. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. **N Engl J Med.** 2003;348(7):593-600.
65. Taylor DA, Zenovich AG. Cardiovascular cell therapy and endogenous repair. **Diabetes Obes Metab.** 2008;10 Suppl 4:5-15.
66. Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Ann Hematol.** 2012.

67. Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. **Stem Cell Rev.** 2007;3(4):239-48.
68. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science.** 1999;284(5411):143-7.
69. Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. **Annu Rev Biomed Eng.** 2010;12:87-117.
70. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation.** 1968;6(2):230-47.
71. Piersma AH, Ploemacher RE, Brockbank KG. Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. **Br J Haematol.** 1983;54(2):285-90.
72. Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. **Bone Miner Res.** 1985;3:1-25.
73. Owen M. Marrow stromal stem cells. **J Cell Sci Suppl.** 1988;10:63-76.
74. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res.** 1991;9(5):641-50.
75. Castro-Malaspina H, Schaison G, Passe S, Pasquier A, Berger R, Bayle-Weisgerber C, et al. Subacute and chronic myelomonocytic leukemia in children (juvenile CML). Clinical and hematologic observations, and identification of prognostic factors. **Cancer.** 1984;54(4):675-86.
76. Wang QR, Wolf NS. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VIII. Clonal isolation and identification of cell types in murine CFU-F colonies by limiting dilution. **Exp Hematol.** 1990;18(4):355-9.
77. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J Cell Physiol.** 2007;213(2):341-7.
78. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. **J Clin Invest.** 2000;105(12):1663-8.
79. Mori KJ, Fujitake H, Ohkubo H, Ito Y, Dexter TM. Development of stromal cell colonies in bone marrow cell culture. **Gann.** 1978;69(5):689-93.
80. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, van Vliet E, Brakel-van Peer KM, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. **Exp Hematol.** 1985;13(4):237-43.
81. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science.** 1997;276(5309):71-4.

82. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. 2006;8(4):315-7.
83. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **J Pathol**. 2009;217(2):318-24.
84. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. **Circ Res**. 2004;95(7):671-6.
85. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anat Rec**. 2001;264(1):51-62.
86. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**. 2001;7(2):211-28.
87. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum**. 2001;44(8):1928-42.
88. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000;97(25):13625-30.
89. Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Braz J Med Biol Res**. 2003;36(9):1179-83.
90. Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siqueira R, et al. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. **Exp Cell Res**. 2005;309(2):340-4.
91. Almeida-Porada G, El Shabrawy D, Porada C, Zanjani ED. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. **Exp Hematol**. 2002;30(12):1454-62.
92. Lee MW, Choi J, Yang MS, Moon YJ, Park JS, Kim HC, et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. **Biochem Biophys Res Commun**. 2004;320(1):273-8.
93. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**. 2004;103(5):1669-75.
94. Yu M, Xiao Z, Shen L, Li L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. **Br J Haematol**. 2004;124(5):666-75.

95. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy**. 2004;6(6):543-53.
96. Ahrens N, Tormin A, Paulus M, Roosterman D, Salama A, Krenn V, et al. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. **Transplantation**. 2004;78(6):925-9.
97. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Arthritis Rheum**. 2004;50(5):1522-32.
98. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**. 2004;364(9429):149-55.
99. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. **J Orthop Res**. 2002;20(5):1060-9.
100. Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Lab Invest**. 2005;85(8):962-71.
101. Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. **Cell Transplant**. 2008;17(3):303-11.
102. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Jr., Orellana MD, Freitas MC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. **Exp Hematol**. 2008;36(5):642-54.
103. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**. 2006;119(Pt 11):2204-13.
104. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell**. 2008;3(3):301-13.
105. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen PS, et al. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. **Stem Cells**. 2009;27(1):230-7.
106. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. **Circ Res**. 2005;97(6):512-23.



107. Tagami M, Ichinose S, Yamagata K, Fujino H, Shoji S, Hiraoka M, et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell Tissue Res.** 2003;312(1):31-40.
108. Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 2000;120(5):999-1005.
109. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. **J Biomed Sci.** 2003;10(2):228-41.
110. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scand J Immunol.** 2003;57(1):11-20.
111. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Exp Hematol.** 2002;30(1):42-8.
112. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation.** 2003;75(3):389-97.
113. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood.** 2002;99(10):3838-43.
114. Chen F, Hui JH, Chan WK, Lee EH. Cultured mesenchymal stem cell transfers in the treatment of partial growth arrest. **J Pediatr Orthop.** 2003;23(4):425-9.
115. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. **Circulation.** 2004;109(12):1543-9.
116. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. **Circulation.** 2001;104(9):1046-52.
117. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2004;287(6):H2670-6.
118. Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. **Ann Thorac Surg.** 2005;80(1):229-36; discussion 36-7.

119. Liang F, Wang YF, Nan X, Yue HM, Xu YX, Shi SS, et al. [In vitro differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into blood vessel endothelial cells]. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**. 2005;27(6):665-9.
120. Dai W, Hale SL, Kloner RA. Stem cell transplantation for the treatment of myocardial infarction. **Transpl Immunol**. 2005;15(2):91-7.
121. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **Am J Cardiol**. 2004;94(1):92-5.
122. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. **N Engl J Med**. 2001;344(5):385-6.
123. Solchaga LA, Temenoff JS, Gao J, Mikos AG, Caplan AI, Goldberg VM. Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds. **Osteoarthritis Cartilage**. 2005;13(4):297-309.
124. Penick KJ, Solchaga LA, Welter JF. High-throughput aggregate culture system to assess the chondrogenic potential of mesenchymal stem cells. **Biotechniques**. 2005;39(5):687-91.
125. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. **J Orthop Res**. 2003;21(3):420-31.
126. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003;100(14):8407-11.
127. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002;99(4):2199-204.
128. Rice CM, Scolding NJ. Adult stem cells--reprogramming neurological repair? **Lancet**. 2004;364(9429):193-9.
129. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **Lancet**. 2008;371(9624):1579-86.
130. Peng L, Xie DY, Lin BL, Liu J, Zhu HP, Xie C, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. **Hepatology**. 2011;54(3):820-8.

131. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002;99(13):8932-7.
132. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). **Bone Marrow Transplant**. 2002;30(4):215-22.
133. Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. **Stem Cells**. 2008;26(9):2201-10.
134. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. **J Mol Cell Cardiol**. 2007;42(1):88-97.
135. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. **Circulation**. 1999;100(19 Suppl):II247-56.
136. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. **Stem Cells**. 2004;22(3):377-84.
137. Chu L, Jiang Y, Hao H, Xia Y, Xu J, Liu Z, et al. Nitric oxide enhances Oct-4 expression in bone marrow stem cells and promotes endothelial differentiation. **Eur J Pharmacol**. 2008;591(1-3):59-65.
138. Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. **Trends Mol Med**. 2010;16(5):203-9.
139. Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Vasileva AK, Marey MV, Galkina SI, Isaev NK, et al. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. **J Cell Mol Med**. 2008;12(5A):1622-31.
140. van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. **Hepatology**. 2008;47(5):1634-43.
141. Si YL, Zhao YL, Hao HJ, Fu XB, Han WD. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. **Ageing Res Rev**. 2011;10(1):93-103.
142. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **J Cell Sci**. 2003;116(Pt 9):1827-35.

143. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**. 2003;33(6):919-26.
144. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**. 1997;275(5302):964-7.
145. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. **Circulation**. 2003;107(3):461-8.
146. Suuronen EJ, Price J, Veinot JP, Ascah K, Kapila V, Guo XW, et al. Comparative effects of mesenchymal progenitor cells, endothelial progenitor cells, or their combination on myocardial infarct regeneration and cardiac function. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2007;134(5):1249-58.
147. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. **Nat Med**. 1999;5(4):434-8.
148. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. **Circulation**. 2002;105(6):732-8.
149. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. **Circ Res**. 2002;90(3):284-8.
150. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. **J Cell Mol Med**. 2004;8(4):498-508.
151. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. **J Clin Invest**. 2001;108(3):391-7.
152. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. **Circulation**. 2001;103(24):2885-90.
153. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. **Blood**. 2000;95(10):3106-12.
154. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. **Blood**. 2004;104(9):2752-60.

155. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. **Leukemia**. 2007;21(6):1141-9.
156. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. **Blood**. 1998;92(2):362-7.
157. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. **J Clin Invest**. 2000;105(1):71-7.
158. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. **J Clin Invest**. 2002;109(3):337-46.
159. Padfield GJ, Newby DE, Mills NL. Understanding the role of endothelial progenitor cells in percutaneous coronary intervention. **J Am Coll Cardiol**. 2010;55(15):1553-65.
160. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2004;24(2):288-93.
161. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. **Blood**. 2000;95(3):952-8.
162. Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. **Circulation**. 2005;112(11):1618-27.
163. Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. **Br J Haematol**. 2001;115(1):186-94.
164. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. **Circ Res**. 2003;93(11):1023-5.
165. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. **Circ Res**. 2004;95(4):343-53.
166. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **EMBO J**. 1999;18(14):3964-72.
167. Fan CL, Li Y, Gao PJ, Liu JJ, Zhang XJ, Zhu DL. Differentiation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood CD 34+ cells in vitro. **Acta Pharmacol Sin**. 2003;24(3):212-8.

168. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. **J Clin Invest.** 2000;105(11):1527-36.
169. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. **Blood.** 2004;103(7):2577-84.
170. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation.** 2004;109(5):656-63.
171. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. **J Clin Invest.** 2001;107(11):1395-402.
172. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. **Cell.** 2003;114(6):763-76.
173. Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. **Cell Biol Toxicol.** 2007;23(4):223-39.
174. Senegaglia AC, Brofman PR, Aita CA, Dallagiovanna B, Rebelatto CL, Hansen P, et al. In vitro formation of capillary tubules from human umbilical cord blood cells with perspectives for therapeutic application. **Rev Bras Cir Cardiovasc.** 2008;23(4):467-73.
175. Iwaguro H, Asahara T. Endothelial progenitor cell culture and gene transfer. **Methods Mol Med.** 2005;112:239-47.
176. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood.** 1997;90(12):5002-12.
177. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. **Lancet.** 2003;362(9385):697-703.
178. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. **J Exp Med.** 2001;193(9):1005-14.
179. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR, et al. Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. **Nat Med.** 2005;11(2):206-13.

180. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. **Ann Thorac Surg.** 2000;70(3):829-34.
181. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. **J Am Coll Cardiol.** 2007;49(7):741-52.
182. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. **N Engl J Med.** 2005;353(10):999-1007.
183. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. **Nat Med.** 2003;9(6):702-12.
184. Wang X, Chen J, Tao Q, Zhu J, Shang Y. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. **Drug Chem Toxicol.** 2004;27(3):243-55.
185. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 2004;31(7):407-13.
186. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. **Circ Res.** 2001;89(1):E1-7.
187. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. **Circulation.** 2002;106(22):2781-6.
188. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. **Diabetes.** 2004;53(1):195-9.
189. Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, et al. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2004;24(7):1246-52.
190. de Groot K, Bahlmann FH, Bahlmann E, Menne J, Haller H, Fliser D. Kidney graft function determines endothelial progenitor cell number in renal transplant recipients. **Transplantation.** 2005;79(8):941-5.
191. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2004;24(8):1442-7.

192. Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P, Rivard A. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. **J Mol Cell Cardiol**. 2006;41(2):275-84.
193. Wang X, Zhu J, Chen J, Shang Y. Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells. **J Clin Pharmacol**. 2004;44(8):881-9.
194. Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, Matsui K, Yoshioka T, Takahashi M, et al. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. **Heart**. 2004;90(6):685-6.
195. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. **Circulation**. 2004;110(10):1209-12.
196. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. **Circulation**. 2001;103(23):2776-9.
197. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, et al. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**. 2005;12(4):407-14.
198. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. **Blood**. 2003;102(4):1340-6.
199. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, et al. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. **Ann N Y Acad Sci**. 2001;938:36-45; discussion -7.
200. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. **J Clin Invest**. 2001;108(3):399-405.
201. Assmus B, Urbich C, Aicher A, Hofmann WK, Haendeler J, Rossig L, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. **Circ Res**. 2003;92(9):1049-55.
202. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. **Circulation**. 2003;108(25):3115-21.
203. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. **Circulation**. 2003;107(24):3059-65.



204. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. **Circulation**. 2004;109(2):220-6.
205. Zammaretti P, Zisch AH. Adult 'endothelial progenitor cells'. Renewing vasculature. **Int J Biochem Cell Biol**. 2005;37(3):493-503.
206. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. **J Am Coll Cardiol**. 2001;37(6):1726-32.
207. Goldman S, Raya TE. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. **J Card Fail**. 1995;1(2):169-77.
208. Chimenti S, Carlo E, Masson S, Bai A, Latini R. Myocardial infarction: animal models. **Methods Mol Med**. 2004;98:217-26.
209. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. **Am J Physiol**. 1991;260(5 Pt 2):H1406-14.
210. Risso S, DeFelice LJ. Ca channel kinetics during the spontaneous heart beat in embryonic chick ventricle cells. **Biophys J**. 1993;65(3):1006-18.
211. Capasso JM, Li P, Zhang X, Anversa P. Heterogeneity of ventricular remodeling after acute myocardial infarction in rats. **Am J Physiol**. 1992;262(2 Pt 2):H486-95.
212. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. **Circulation**. 1985;72(2):406-12.
213. Tolar J, Wang X, Braunlin E, McElmurry RT, Nakamura Y, Bell S, et al. The host immune response is essential for the beneficial effect of adult stem cells after myocardial ischemia. **Exp Hematol**. 2007;35(4):682-90.
214. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**. 2001;410(6829):701-5.
215. Hiasa K, Egashira K, Kitamoto S, Ishibashi M, Inoue S, Ni W, et al. Bone marrow mononuclear cell therapy limits myocardial infarct size through vascular endothelial growth factor. **Basic Res Cardiol**. 2004;99(3):165-72.
216. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P, et al. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. **Circulation**. 2003;108 Suppl 1:II253-8.

217. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. **Circulation**. 2002;106(15):1913-8.
218. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. **J Am Coll Cardiol**. 2004;44(8):1690-9.
219. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. **Lancet**. 2004;364(9429):141-8.
220. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. **Lancet**. 2006;367(9505):113-21.
221. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. **N Engl J Med**. 2006;355(12):1199-209.
222. Schachinger V, Assmus B, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. **Eur J Heart Fail**. 2009;11(10):973-9.
223. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. **Lancet**. 2003;361(9351):47-9.
224. Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang SY, Khan ZA, Yuan L, Oettgen P, et al. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. **Circ Res**. 2008;103(2):194-202.
225. Zhang X, Wei M, Zhu W, Han B. Combined transplantation of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells into a rat model of isoproterenol-induced myocardial injury. **Arch Cardiovasc Dis**. 2008;101(5):333-42.
226. Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatzadeh MR, Murphy M, et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. **Circ Res**. 2009;104(12):1410-20.
227. Ilie IM, L.; Georgescu, C.; Ilie, R.; Duncea, I.; Mocan, T.; Iancu, D.; Zaharie, F. **Human Cord Blood-Derived Stem Cells in Transplantation and Regenerative Medicine**: InTech; 2011.

228. Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. **Stem Cell Rev.** 2011;7(1):195-207.
229. Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. **Int J Clin Exp Med.** 2010;3(4):248-69.
230. Kadner A, Hoerstrup SP, Tracy J, Breyman C, Maurus CF, Melnitchouk S, et al. Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. **Ann Thorac Surg.** 2002;74(4):S1422-8.
231. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells.** 2003;21(1):105-10.
232. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. **Stem Cells.** 2005;23(2):220-9.
233. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. **Stem Cells.** 2006;24(3):781-92.
234. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. **Histochem Cell Biol.** 2009;131(2):267-82.
235. Tsagias N, Koliakos I, Karagiannis V, Eleftheriadou M, Koliakos GG. Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes. **Transfus Med.** 2011;21(4):253-61.
236. Meyer TP, A.; Höcht, B. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells in Wharton's jelly of the human umbilical cord: potent cells for cell-based therapies in paediatric surgery? . **European Surgery.** 2008;40(5):6.
237. Montanucci P, Basta G, Pescara T, Pennoni I, Di Giovanni F, Calafiore R. New simple and rapid method for purification of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord Wharton jelly. **Tissue Eng Part A.** 2011;17(21-22):2651-61.
238. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. **Haematologica.** 2006;91(8):1017-26.
239. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. **Stem Cells.** 2007;25(2):319-31.

240. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 2012;48(2):75-83.
241. De Bruyn C, Najar M, Raicevic G, Meuleman N, Pieters K, Stamatopoulos B, et al. A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. **Stem Cells Dev.** 2011;20(3):547-57.
242. Pereira WC, Khushnooma I, Madkaikar M, Ghosh K. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. **J Tissue Eng Regen Med.** 2008;2(7):394-9.
243. Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Exp Hematol.** 2009;37(5):629-40.
244. Xu Y, Meng H, Li C, Hao M, Wang Y, Yu Z, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells isolated by a novel explantation technique can differentiate into functional endothelial cells and promote revascularization. **Stem Cells Dev.** 2010;19(10):1511-22.
245. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. **Stem Cells.** 2003;21(1):50-60.
246. Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. **Gastroenterology.** 2008;134(3):833-48.
247. Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. **Int J Mol Med.** 2006;18(6):1089-96.
248. Nekanti U, Rao VB, Bahirvani AG, Jan M, Totey S, Ta M. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev.** 2010;19(1):117-30.
249. Butler MG, Menitove JE. Umbilical cord blood banking: an update. **J Assist Reprod Genet.** 2011;28(8):669-76.
250. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. **Lancet.** 2007;369(9577):1947-54.
251. Kurtzberg J, Prasad VK, Carter SL, Wagner JE, Baxter-Lowe LA, Wall D, et al. Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of

unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. **Blood**. 2008;112(10):4318-27.

252. Frangoul H, Wang L, Harrell FE, Jr., Manes B, Calder C, Domm J. Unrelated umbilical cord blood transplantation in children with immune deficiency: results of a multicenter study. **Bone Marrow Transplant**. 2010;45(2):283-8.

253. Bizzetto R, Bonfim C, Rocha V, Socie G, Locatelli F, Chan K, et al. Outcomes after related and unrelated umbilical cord blood transplantation for hereditary bone marrow failure syndromes other than Fanconi anemia. **Haematologica**. 2011;96(1):134-41.

254. Prasad VK, Mendizabal A, Parikh SH, Szabolcs P, Driscoll TA, Page K, et al. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes. **Blood**. 2008;112(7):2979-89.

255. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **N Engl J Med**. 1989;321(17):1174-8.

256. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. **N Engl J Med**. 1996;335(3):157-66.

257. Gluckman E, Locatelli F. Umbilical cord blood transplants. **Curr Opin Hematol**. 2000;7(6):353-7.

258. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. **Blood**. 2011;117(3):1061-70.

259. Johansen KA, Schneider JF, McCaffree MA, Woods GL, Council on S, Public Health AMA. Efforts of the United States' National Marrow Donor Program and Registry to improve utilization and representation of minority donors. **Transfus Med**. 2008;18(4):250-9.

260. Hwang WY, Samuel M, Tan D, Koh LP, Lim W, Linn YC. A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2007;13(4):444-53.

261. Jr CG, Gregianin LJ, Brunetto AL. [Bone marrow transplantation and cord blood transplantation in children]. **J Pediatr (Rio J)**. 2001;77(5):345-60.

262. Hollands P, McCauley C. Private cord blood banking: current use and clinical future. **Stem Cell Rev**. 2009;5(3):195-203.

263. Wofford JDR, D.M.; Creer, M.H. . Adult transplant outcomes, single versus pooled blood transplants. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. 2005;11(2):2.
264. McKenna DH, Brunstein CG. Umbilical cord blood: current status and future directions. **Vox Sang**. 2011;100(1):150-62.
265. Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. **J Neurosci Res**. 2002;69(6):880-93.
266. Newcomb JD, Willing AE, Sanberg PR. Umbilical cord blood cells. **Methods Mol Biol**. 2009;549:119-36.
267. Ende N, Chen R. Parkinson's disease mice and human umbilical cord blood. **J Med**. 2002;33(1-4):173-80.
268. Sanberg PR, Eve DJ, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Tan J, Sanberg CD, et al. The treatment of neurodegenerative disorders using umbilical cord blood and menstrual blood-derived stem cells. **Cell Transplant**. 2011;20(1):85-94.
269. Ende N, Chen R, Ende-Harris D. Human umbilical cord blood cells ameliorate Alzheimer's disease in transgenic mice. **J Med**. 2001;32(3-4):241-7.
270. Di Campi C, Piscaglia AC, Pierelli L, Rutella S, Bonanno G, Alison MR, et al. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. **Dig Liver Dis**. 2004;36(9):603-13.
271. Zhao Y, Mazzone T. Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes. **Autoimmun Rev**. 2010;10(2):103-7.
272. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2005;102(32):11474-9.
273. Arien-Zakay H, Lazarovici P, Nagler A. Tissue regeneration potential in human umbilical cord blood. **Best Pract Res Clin Haematol**. 2010;23(2):291-303.
274. Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. **Cell Prolif**. 2011;44 Suppl 1:60-9.
275. Ingram DA, Krier TR, Mead LE, McGuire C, Prater DN, Bhavsar J, et al. Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. **Stem Cells**. 2007;25(2):297-304.
276. Pinho-Ribeiro V, Maia AC, Werneck-de-Castro JP, Oliveira PF, Goldenberg RC, Campos de Carvalho AC. Human umbilical cord blood cells in infarcted rats. **Braz J Med Biol Res**. 2010.
277. Freer S. **Thomas Wharton's Adenographia**. New York Oxford; 1996. 322 p.

278. McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WH. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. **Biochem Soc Trans.** 1991;19(1):29S.
279. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells.** 2004;22(7):1330-7.
280. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. **Stem Cells.** 2007;25(6):1384-92.
281. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem Cells.** 2008;26(1):146-50.
282. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. **Cell Immunol.** 2009;259(2):150-6.
283. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **J Exp Med.** 2004;200(2):123-35.
284. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Exp Biol Med (Maywood).** 2008;233(7):901-13.
285. BRASIL. Resolução MS/CNS n.º 196, de 10 de outubro de 1996 – Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. 1996. Disponível em:< [http://dtr2004.saude.gov.br/susdeaz/legislacao/arquivo/Resolucao\\_196\\_de\\_10\\_10\\_1996.pdf](http://dtr2004.saude.gov.br/susdeaz/legislacao/arquivo/Resolucao_196_de_10_10_1996.pdf)>.
286. BRASIL. Resolução MS/CNS n.º 251 de 07 de agosto de 1997. Normas de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos envolvendo seres humanos. 1997. Disponível em:< [http://www.ung.br/pesquisa/cep/res\\_cns\\_251\\_97.pdf](http://www.ung.br/pesquisa/cep/res_cns_251_97.pdf)>.
287. BRASIL. RDC Nº 56, de 16 de dezembro de 2010. Regulamento técnico para o funcionamento dos laboratórios de processamento de células progenitoras hematopoéticas provenientes de medula óssea e sangue periférico e bancos de sangue de cordão umbilical e placentário, para finalidade de transplante convencional e dá outras providências. 2010 Disponível em:<<http://brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/106695-56.html>>.
288. Kim Y-J. Culture of umbilical cord- and blood cord-derived stem cells. In: Freshney IRS, G.N.; Auerbach, J.M., editor. **Culture of Human Stem Cells** 2007. p. 351.

289. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. **Ann Surg**. 1954;140(5):675-82.
290. Capriglione LGAB, F.; Miyague,N.I.; Ottoboni,G.S.; Senegaglia,A.C.; Suss,P.H.; Rebelatto,C.L.K.; Pimpão,C.T.; Brofman,P.R.S. Comparison of two surgical experimental techniques of myocardial infarction in Wistar rats. Experimental myocardial infarction in Wistar rats. **Laboratory Animals**. 2012. No prelo.
291. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**. 1979;11(4):447-55.
292. Junquiera LC, Junqueira LC, Brentani RR. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. **Anal Biochem**. 1979;94(1):96-9.
293. Henegariu O, Dunai J, Chen XN, Korenberg JR, Ward DC, Greally JM. A triple color FISH technique for mouse chromosome identification. **Mamm Genome**. 2001;12(6):462-5.
294. Henegariu O, Grober L, Haskins W, Bowers PN, State MW, Ohmido N, et al. Rapid DNA fiber technique for size measurements of linear and circular DNA probes. **Biotechniques**. 2001;31(2):246-50.
295. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. **Circulation**. 2007;115(7):896-908.
296. Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, et al. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. **Nature**. 2009;460(7251):113-7.
297. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. **Circulation**. 2003;107(9):1247-9.
298. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Pirr J, Rager U, Lippolt P, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. **Eur Heart J**. 2009;30(24):2978-84.
299. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**. 2003;107(18):2294-302.
300. Cao F, Sun D, Li C, Narsinh K, Zhao L, Li X, et al. Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up. **Eur Heart J**. 2009;30(16):1986-94.
301. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow



progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. **Circulation**. 2005;112(9 Suppl):I178-83.

302. Blatt A, Cotter G, Leitman M, Krakover R, Kaluski E, Milo-Cotter O, et al. Intracoronary administration of autologous bone marrow mononuclear cells after induction of short ischemia is safe and may improve hibernation and ischemia in patients with ischemic cardiomyopathy. **Am Heart J**. 2005;150(5):986.

303. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**. 2009;54(24):2277-86.

304. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. **Lancet**. 2012;379(9819):895-904.

305. Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SA, Zornoff LA. [Association between sphericity, ventricular function and size of the infarction in rats]. **Arq Bras Cardiol**. 2010;94(5):645-50.

306. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. **Arq Bras Cardiol**. 2009;93(4):434-40, 26-32.

307. Assmus B, Schachinger V, Zeiher AM. [Regenerative therapy in cardiology: how distant is it from reality?]. **Internist (Berl)**. 2006;47(11):1177-82.

308. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. **N Engl J Med**. 2006;355(12):1222-32.

309. Gersh BJ, Simari RD, Behfar A, Terzic CM, Terzic A. Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. **Mayo Clin Proc**. 2009;84(10):876-92.

310. Gneccchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. **Nat Med**. 2005;11(4):367-8.

311. Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. **FASEB J**. 2006;20(6):661-9.

312. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature**. 2003;425(6961):968-73.

313. Hu CH, Wu GF, Wang XQ, Yang YH, Du ZM, He XH, et al. Transplanted human umbilical cord blood mononuclear cells improve left ventricular function

through angiogenesis in myocardial infarction. **Chin Med J (Engl)**. 2006;119(18):1499-506.

314. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. **Nature**. 2004;428(6983):664-8.

315. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. **Nature**. 2002;416(6880):545-8.

316. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circ Res**. 2008;103(11):1204-19.

317. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J Cell Biochem**. 2006;98(5):1076-84.

318. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. **Circulation**. 2005;112(8):1128-35.

319. Rebelatto CK, Aguiar AM, Senegaglia AC, Aita CM, Hansen P, Barchiki F, et al. Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents. **Biochem Biophys Res Commun**. 2009;378(3):456-61.

320. Berardi GR, Rebelatto CK, Tavares HF, Ingberman M, Shigunov P, Barchiki F, et al. Transplantation of SNAP-treated adipose tissue-derived stem cells improves cardiac function and induces neovascularization after myocardium infarct in rats. **Exp Mol Pathol**. 2011;90(2):149-56.

321. Schittini AV, Celedon PF, Stimamiglio MA, Krieger M, Hansen P, da Costa FD, et al. Human cardiac explant-conditioned medium: soluble factors and cardiomyogenic effect on mesenchymal stem cells. **Exp Biol Med (Maywood)**. 2010;235(8):1015-24.

322. Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. **Blood**. 2007;109(9):4055-63.

323. Girgenrath M, Weng S, Kostek CA, Browning B, Wang M, Brown SA, et al. TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. **EMBO J**. 2006;25(24):5826-39.

324. Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. **Stem Cells**. 2006;24(11):2483-92.

325. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. **Circ Res**. 2004;94(12):1543-53.

326. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. **Pharmacol Res.** 2008;58(2):88-111.
327. Banerjee I, Fuseler JW, Intwala AR, Baudino TA. IL-6 loss causes ventricular dysfunction, fibrosis, reduced capillary density, and dramatically alters the cell populations of the developing and adult heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2009;296(5):H1694-704.
328. Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. **Int J Hematol.** 2000;72(4):391-8.
329. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science.** 1992;258(5089):1798-801.
330. Kaushansky K. Thrombopoietin. **N Engl J Med.** 1998;339(11):746-54.
331. Kaushansky K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. **Ann N Y Acad Sci.** 2005;1044:139-41.
332. Perlingeiro RC, Kyba M, Bodie S, Daley GQ. A role for thrombopoietin in hemangioblast development. **Stem Cells.** 2003;21(3):272-80.
333. Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1997;94(2):663-8.
334. Amano H, Hackett NR, Rafii S, Crystal RG. Thrombopoietin gene transfer-mediated enhancement of angiogenic responses to acute ischemia. **Circ Res.** 2005;97(4):337-45.
335. Kuby J. Cells and organs of the immune system. 5 ed 1999.
336. Senegaglia AC, Barboza LA, Dallagiovanna B, Aita CA, Hansen P, Rebelatto CL, et al. Are purified or expanded cord blood-derived CD133+ cells better at improving cardiac function? **Exp Biol Med (Maywood).** 2010;235(1):119-29.
337. Navarrete C, Contreras M. Cord blood banking: a historical perspective. **Br J Haematol.** 2009;147(2):236-45.
338. Ballen KK, Barker JN, Stewart SK, Greene MF, Lane TA, American Society of B, et al. Collection and preservation of cord blood for personal use. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2008;14(3):356-63.
339. Johnson FL. Placental blood transplantation and autologous banking--caveat emptor. **J Pediatr Hematol Oncol.** 1997;19(3):183-6.

## APÊNDICE A – FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

**ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA CAPACIDADE PRÓ-ANGIOGÊNICA  
DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS  
PROGENITORAS ENDOTELIAIS HUMANAS TRATADAS COM DOADOR  
DE ÓXIDO NÍTRICO** 1

 <b>PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ</b> <b>FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS</b>				
<b>Número do Protocolo (Uso do CEUA): _____</b>  <b>Data de recebimento (Uso do CEUA): ____/____/____</b>				
Área do Conhecimento: Ciências da saúde				
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>				
Nome: Paula Hansen Suss				
Identidade: 6.275.267-0	CPF: 027.650.999-44	Endereço (Rua, n.º): Rua Alcides Terézio de Carvalho, 87 casa 01		
Nacionalidade: Brasileira	Profissão: Bióloga	CEP: 81520-230	Cidade: Curitiba	U.F. PR
Maior Titulação: Graduação	Cargo Especialista em cultivo celular	Fone: (41) 32712219	Fax (41) 32712646	
Instituição a que pertence: PUCPR		Email: paula.h@pucpr.br		
<b>Termo de Compromisso:</b> Declaro que conheço e cumprirei os princípios da ética em pesquisa com animais vigentes no país. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.				
Data: 17/11/2008		 Assinatura		
<b>INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO A PESQUISA</b>				
Nome: Pontifícia Universidade Católica do Paraná		Endereço (Rua, n.º): Rua Imaculada Conceição, 1155		
Centro/Curso: ICBS- Curso de Doutorado em Ciências da Saúde		CEP: 80215901	Cidade: Curitiba	U.F. PR
Participação Estrangeira: Sim ( ) Não (x)		Fone: (41) 32712219	Fax: (41) 32712646	
Projeto Multicêntrico: Sim ( ) Não (x) Nacional ( ) Internacional ( ) (Anexar lista de todos os Centros Participantes no Brasil e no Exterior)				
<b>Termo de Compromisso (Deverá ser assinado pelo Decano de Centro):</b> Declaro que conheço os princípios da ética em pesquisa com animais vigentes no país, conheço também o projeto de pesquisa anexo e tenho ciência de seu aspecto orçamentário (item 9 do Formulário de Submissão).				
Nome: Prof. Dr. Alberto Accioly Veiga		Cargo DECANO DO CCBS		
Data: 18/11/2008		 Assinatura Decano do CCBS		

Documentos necessários para a submissão de projetos de pesquisa no CEUA (todos em 3 vias):

1. Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Animais (preenchido)
2. Formulário para Submissão de Projeto de Pesquisa com Animais (preenchido)
3. Folha de Parecer Técnico (apenas com o Título do Projeto de Pesquisa)
4. Projeto de Pesquisa (anexar)

**Observação Importante:** O processo de análise será interrompido e os documentos devolvidos ao pesquisador responsável em caso de incoerência entre o projeto anexado e o Formulário de Submissão.

# APÊNDICE B – FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Planos de Saúde - Servidor

Page 1 of 1



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR - 229426	
Projeto de Pesquisa ESTUDO IN VITRO E IN VIVO DA CAPACIDADE PRÓ-ANGIOGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS HUMANAS TRATADAS COM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO.					
Área de Conhecimento 4.00 - Ciências da Saúde - 4.01 - Medicina - Nenhum			Grupo Grupo III	Nível Não se aplica	
Área(s) Temática(s) Especial(s)				Fase Não se Aplica	
Unitermos células-tronco, terapia celular					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 50	Total Brasil 50	Nº de Sujeitos Total 50	Grupos Especiais		
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Sem Tratamento Específico NÃO	Banco de Materiais Biológicos NÃO	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Paula Hansen		CPF 027.650.999-44	Identidade 62752670		
Área de Especialização Biologia		Maior Titulação Graduação	Nacionalidade Brasileira		
Endereço Imaculada Conceição, 1155		Bairro Prado Velho	Cidade Curitiba - PR		
Código Postal	Telefone 41 32711428 / 41 32712219	Fax 41 32711657	Email paula.h@pucpr.br		
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. <i>Paula Hansen</i> Data: <u>17/11/2008</u> Assinatura					
Instituição Onde Será Realizado					
Nome Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR		CNPJ 76.659.820/0001-51	Nacional/Internacional Nacional		
Unidade/Órgão ICBS		Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO		
Endereço Rua Imaculada Conceição 1155 cpx 16210		Bairro Prado Velho	Cidade Curitiba - PR		
Código Postal 80215-901	Telefone 41 2712292	Fax 41 2712292	Email nep@pucpr.br		
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. Nome: <u>Alberto Accioly Veiga</u> Data: <u>18/11/08</u> Decano do CCBS <i>Alberto Accioly Veiga</i> Assinatura					
Patrocinadora					
Nome Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP		CNPJ 33.749.086/0001-09			
Endereço Praia do Flamengo, 200 - 13º andar		Bairro Flamengo	Cidade Rio de Janeiro - RJ		
Código Postal 22210-030	Telefone (21)2555-0555	Fax (21)2555-0509	Email seac@finep.gov.br		
Responsável Maura		Cargo / Função Avaliadora			

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 06/11/2008. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

[Voltar](#)
[IMPRIMIR](#)

## APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
NÚCLEO DE TECNOLOGIA CELULAR  
LABORATÓRIO EXPERIMENTAL DE CULTIVO CELULAR

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidada(o) para participar, como voluntária(o), em uma pesquisa científica. Após ser esclarecida(o) sobre as informações a seguir, no caso de aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada(o) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná pelo telefone (41) 3271-2292.

Eu, \_\_\_\_\_, nacionalidade \_\_\_\_\_,  
idade \_\_\_\_\_, estado civil \_\_\_\_\_, profissão \_\_\_\_\_,  
endereço \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, entendo que estou sendo convidada(o) a participar de um projeto denominado: “Estudo *in vitro* e *in vivo* da capacidade pró-angiogênica das células-tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais humanas tratadas com doador de óxido nítrico”, onde os pesquisadores estão empenhados em buscar um melhor conhecimento das células-tronco presentes no sangue e no cordão umbilical para desenvolver uma maneira de proteger o coração dos efeitos causados pelas doenças cardiovasculares, podendo os seus resultados identificar, melhorar e aperfeiçoar o tratamento médico.

Foi-me explicado que a minha participação no referido estudo será no sentido de doar o sangue e o cordão umbilical e que este procedimento não trará riscos físicos para mim e para o bebê e que o procedimento do parto não será alterado.

Eu entendo que a minha participação neste projeto é voluntária e não me dá direito a qualquer tipo de remuneração.

Eu expressamente autorizo que os pesquisadores procedam à coleta do sangue do cordão umbilical e do cordão umbilical do recém-nascido imediatamente após a realização do parto.

Eu compreendo que o sangue e o cordão umbilical são coletados após o nascimento do bebê depois do cordão umbilical ser cortado. Na sala de parto, os pesquisadores farão a coleta do sangue e do cordão que serão utilizados para a obtenção das células que serão estudadas nessa pesquisa. As células obtidas serão apenas analisadas em laboratório e não serão utilizadas para qualquer fim terapêutico.

Eu entendo que a minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, o nome do bebê, ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Página | 1

Rubrica do sujeito de pesquisa	Rubrica do pesquisador
--------------------------------	------------------------

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
 NÚCLEO DE TECNOLOGIA CELULAR  
 LABORATÓRIO EXPERIMENTAL DE CULTIVO CELULAR

Tenho conhecimento de que poderei a qualquer momento, antes, durante e depois, abandonar a pesquisa sem que isso acarrete qualquer consequência a minha pessoa. Sei também que não terei qualquer tipo de gasto financeiro para a realização desta pesquisa, e caso venha ter, serei ressarcido integralmente pelo pesquisador. Terei os meus direitos preservados e a garantia do sigilo, quanto ao meu nome, endereço e atividade profissional, sendo-me assegurada a privacidade quanto a todos os dados envolvidos na pesquisa.

Pude verificar que a minha participação nesta pesquisa não acarretará nenhum problema a minha pessoa, quanto a danos físicos, morais, sociais, éticos, de origem religiosa e financeira.

Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido na Pontifícia Universidade Católica do Paraná e os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Paula Hansen Suss; Paulo Roberto Slud Brofman e com eles poderei manter contato pelos telefones: (41) 32712219 / (41) 32711858.

Sendo assim, não havendo quaisquer dúvidas, dou-me por esclarecido quanto aos objetivos, importância e resultados desta pesquisa, dos meus direitos, riscos e benefícios, em participar desta pesquisa. Portanto, concordo de livre e espontânea vontade com a minha participação na realização desta pesquisa.

Reafirmo, portanto, que li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar e concordo voluntariamente em participar.

“Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o CEP PUCPR (41) 3271-2292 ou mandar um e-mail para [nep@pucpr.br](mailto:nep@pucpr.br)”

Curitiba, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome do sujeito da pesquisa = \_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito da pesquisa = \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador responsável = \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável = \_\_\_\_\_

Página | 2

Rubrica do sujeito de pesquisa	Rubrica do pesquisador
--------------------------------	------------------------

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro do projeto no CEUA: 401 2ª versão

Data do parecer: 20/03/2009

**Título do Projeto:**

Estudo in vitro e in vivo da capacidade pró-angiogênica das células-tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais humanas tratadas com doador de óxido nítrico

**Pesquisador responsável:**

Paula Hansen Suss

**Equipe da pesquisa:**

Paulo Roberto Slud Brofman

**Instituição:**

PUCPR

**Categoria do Experimento – D**

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
<i>Rattus norvegicus albinus</i>	Macho	Adulto, 250g	200

O colegiado do CEUA em reunião no dia 19/03/2009, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Curitiba, 20 de março de 2009.

Atenciosamente

  
Profa. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira  
Coordenadora do CEUA  
PUC PR



## ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Você já pode submeter o seu projeto em qualquer versão via internet.

Acesse o endereço:  
<http://www.pucpr.br/cep>



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
Núcleo de Bioética  
Comitê de Ética em Pesquisa  
*Ciência com Consciência*

### PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0002325/08**

Protocolo CEP Nº **2788**

Título do projeto **Estudo in vitro e in vivo da capacidade pró-angiogênica das células-tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais humanas tratadas com doador de óxido nítrico**

Grupo **III**

Versão **1**

Protocolo CONEP **0538.0.084.000-08**

Pesquisador responsável **Paula Hansen**

Instituição

#### Objetivos

Estudar os efeitos do doador de óxido nítrico DEA/NO na diferenciação de células progenitoras endoteliais e células-tronco mesenquimais em células endoteliais e na capacidade parácrina pró-angiogênica destas células. Serão também avaliados os efeitos do co-transplante destes dois tipos celulares tratados ou não com o doador de óxido nítrico em modelo animal infartado.

#### Comentários

O projeto tem a relevância de contribuir para elucidar questões como permitir a avaliação pré-clínica para a possibilidade de utilizar transplantes de células progenitoras endoteliais e células-tronco mesenquimais tratadas com óxido nítrico

#### Considerações

O projeto tem embasamento científico e pesquisadores com experiência na área pertinente ao objeto de pesquisa.

#### Termo de consentimento livre e esclarecido

Adequado aos sujeitos.

#### Conclusões

O projeto atende as exigências da Res. 196/96, portanto, está aprovado.



Parecer Nº **0002325/08**Protocolo CEP Nº **2788**Título do projeto **Estudo in vitro e in vivo da capacidade pró-angiogênica das células-tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais humanas tratadas com doador de óxido nítrico**Grupo **III**  
Versão **1**Protocolo CONEP **0538.0.084.000-08**Pesquisador responsável **Paula Hansen**

Instituição

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **26/11/2008**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.

---


**Situação Aprovado**

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 26 de Novembro de 2008.



**Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira**  
**Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**  
**PUCPR**



## ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA

## Dissimilar Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Adipose Tissue

C. K. REBELATTO,\* A. M. AGUIAR,†,‡ M. P. MORETÃO,‡ A. C. SENEGAGLIA,\* P. HANSEN,\*  
F. BARCHIKI,\* J. OLIVEIRA,\* J. MARTINS,‡ C. KULIGOVSKI,‡ F. MANSUR,‡ A. CHRISTOFIS,\*  
V. F. AMARAL,§ P. S. BROFMAN,\* S. GOLDENBERG,†,‡ L. S. NAKAO,§ AND A. CORREA†,1

\*Laboratório Experimental de Cultivo Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215-901, Brazil; †FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; ‡Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Rua Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba 81350-010, Brazil; §Núcleo de Investigação Molecular Avançada, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215-901, Brazil

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been investigated as promising candidates for use in new cell-based therapeutic strategies such as mesenchyme-derived tissue repair. MSCs are easily isolated from adult tissues and are not ethically restricted. MSC-related literature, however, is conflicting in relation to MSC differentiation potential and molecular markers. Here we compared MSCs isolated from bone marrow (BM), umbilical cord blood (UCB), and adipose tissue (AT). The isolation efficiency for both BM and AT was 100%, but that from UCB was only 30%. MSCs from these tissues are morphologically and immunophenotypically similar although their differentiation diverges. Differentiation to osteoblasts and chondroblasts was similar among MSCs from all sources, as analyzed by cytochemistry. Adipogenic differentiation showed that UCB-derived MSCs produced few and small lipid vacuoles in contrast to those of BM-derived MSCs and AT-derived stem cells (ADSCs) (arbitrary differentiation values of  $245.57 \pm 943$  and  $243.89 \pm 145.52 \mu\text{m}^2$  per nucleus, respectively). The mean area occupied by individual lipid droplets was  $7.37 \mu\text{m}^2$  for BM-derived MSCs and  $2.36 \mu\text{m}^2$  for ADSCs, a finding indicating more mature adipocytes in BM-derived MSCs than in treated cultures of ADSCs. We analyzed FAPB4, ALP, and type II collagen gene

expression by quantitative polymerase chain reaction to confirm adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation, respectively. Results showed that all three sources presented a similar capacity for chondrogenic and osteogenic differentiation and they differed in their adipogenic potential. Therefore, it may be crucial to predetermine the most appropriate MSC source for future clinical applications. *Exp Biol Med* 233:901–913, 2008

**Key words:** mesenchymal stem cells; bone marrow; umbilical cord blood; adipose tissue; differentiation

### Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) comprise a population of multipotent progenitors capable of supporting hematopoiesis and differentiating into many tissues (1). MSCs are not ethically restricted and have low immunogenicity (2). MSCs are thought to be promising candidates for novel cell-based therapeutic strategies such as the repair of mesenchyme-derived tissues. In fact, MSCs have already been clinically used to repair or regenerate somatic tissues (3–6), to promote engraftment, and to prevent or treat severe graft-versus-host disease in allogeneic stem cell transplantation (7–8). In the appropriate microenvironment, MSCs differentiate into various cell types, including adipocytes, osteoblasts, chondrocytes (9–11), cardiomyocytes (12–14), and also into nonmesodermal-derived cells, including hepatocytes and neurons (15). Selective differentiation is dependent on specific environmental effectors: usually a combination of growth factors and cytokines supplied *in vitro* (1, 16). MSCs were originally isolated from bone marrow (BM) by Friedenstein *et al.* (17); however, similar populations have been reported in other tissues, such as peripheral blood (18), cord blood (19), trabecular bone (20),

This work was supported by grants from Ministério da Saúde and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq (552234/2005-2). A.C. is recipient of a FioCruz–CNPq Visiting Researcher Fellowship, and S.G. is a research fellow from CNPq.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed at Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Rua Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba 81350-010, Brazil. E-mail: alejandro@tecpa.br

Received December 27, 2007.  
Accepted March 9, 2007.

DOI: 10.3181/0712-RM-356  
1535-3702/08/2337-0901\$15.00  
Copyright © 2008 by the Society for Experimental Biology and Medicine

adipose tissue (1), synovium (21), skin (22), muscle, and brain (23).

MSCs have been characterized by their fibroblast-like morphology, plastic-adhesive and self-renewal properties, and their ability to differentiate *in vitro* into at least three mesodermal-derived tissues: bone, cartilage, and fat (1). Immunophenotypically, MSCs have been defined as cells expressing CD29, CD44, CD90, and CD105 and lacking hematopoietic lineage markers and HLA-DR (9–11). However, recent studies have demonstrated that MSCs isolated from several sources are not a homogenous population and that their differentiation potential may vary depending on the source and the donor (11, 24, 25). Unfortunately, the factors affecting these differences are still unknown. BM has been considered the main MSC source because of their potential to both proliferate and differentiate (3, 7). However, other sources of similar cell populations are being investigated, because BM-derived MSC isolation requires a painful and invasive procedure, the frequency of MSCs is low (1), and their ability to proliferate and differentiate decline with age (26).

Human umbilical cord blood (UCB)-derived MSCs are being evaluated for use in cellular therapies because they are ontogenically primitive, are less exposed to immunologic challenges, are abundantly available, and can be harvested without risk to the donor (27). Various reports are conflicting in relation to the presence of MSCs in UCB (28–30); however, several groups have successfully isolated MSCs from UCB (11, 15, 24, 31–35). The frequency of mesenchymal progenitors in the UCB of full-term deliveries is extremely low (0.0003% of nucleated cells) (31); however, these progenitors have the highest expansion potential when compared with that of other sources (11, 25).

Adipose tissue has recently been identified as a convenient alternative source of MSC-like cells. Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) are available in quantities of hundreds of million cells per individual (9), have an extensive self-renewal capacity (36), are easily isolated by differential sedimentation, and can be cultured for several months *in vitro* with low levels of senescence (37). ADSCs also have the potential to differentiate into various cells, including adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, neurons, and multinucleated myocytes in response to lineage-specific induction factors (10, 11, 37–41).

The starting population for most of the trans-differentiation experiments is different; therefore, comparing results between various groups is difficult and may also partly account for the lack of reproducibility in some of the initial reports (10). MSCs are poorly defined, and this has led separate groups to assign diverse names and phenotypes to this cell population (42). Thus, a precise characterization of MSC and its properties relating to molecular differentiation represents an absolute condition for future development and exploitation of stem cell research for clinical applications (10, 11).

In this study we characterized for the first time adult

stem cells isolated from three sources (BM, UCB, and AT) by flow cytometry and compared their differentiation properties to adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes by cellular (cytochemistry) and molecular (reverse transcriptase polymerase chain reaction [RT-PCR]/quantitative polymerase chain reaction [qPCR]) approaches.

## Materials and Methods

**Collection of BM, UCB, and AT.** Human BM stromal cells were obtained from the iliac crest of 10 patients with dilated cardiomyopathy who were aged between 50 and 70 years ( $60.36 \pm 9.86$  years) and who had applied for a stem cell transplantation procedure. About 5 ml of BM aspirate were collected in a syringe containing 10,000 IU heparin to prevent coagulation.

UCB units from full-term deliveries ( $n = 10$ ) were collected from unborn placenta by a standardized procedure using syringes that contained anticoagulant citrate dextrose, and were processed within 12 hrs after collection. Donors faced no complications throughout their pregnancy.

AT was obtained from 10 donors, aged between 26 and 50 years ( $38.0 \pm 12.55$  years), who were undergoing elective bariatric surgery and dermolipectomy procedures. Typically, 100 ml of AT was processed.

All samples of BM, UCB, and AT were collected after informed consent was obtained in accordance with the guidelines on the use of human subjects, as approved by the ethics committee of Pontificia Universidade Católica de Paraná (approval number 597).

**Isolation and Culture of Adherent Cells.** Three sources of adherent cells were used in this work.

**BM.** The aspirate was diluted 1:3 with Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY) and carefully loaded onto Histopaque (1.077 g/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) to isolate BM mononuclear cells (MNCs). MNCs were isolated by density gradient centrifugation (400 g, 30 mins, room temperature) and washed twice with IMDM (43). BM-derived MNCs were cultured at a density of  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in T75 culture flasks (TPP, Trasadingen, Switzerland) at 37°C in a humidified atmosphere that contained 5% CO<sub>2</sub>; IMDM supplemented with 15% fetal calf serum (FCS) (Gibco Invitrogen), penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 µg/ml) (Gibco Invitrogen) were also used. The culture medium was changed to remove the remaining nonadherent cells 2 days after the initial plating. Thereafter, the culture medium was replaced twice each week.

**UCB.** UCB MNCs were isolated by using two methods. In the first, each UCB unit was diluted 1:3 and processed as described for BM. The second was performed by using a commercially available kit (RosetteSep, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) according to the manufacturer's instructions; Histopaque density separation as described (15) followed. UCB-derived MNCs were set in culture at a density of  $6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in T75 culture flasks

in the same culture medium described in the preceding section. The cultures were incubated for 4 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Nonadherent cells were then removed, and fresh medium was added to the flasks. Culture medium was removed by complete exchange every 7 days.

**AT.** ADSCs were isolated by using enzymatic digestion. In brief, 100 ml AT was washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco Invitrogen). A one-step digestion by 1 mg/ml collagenase type I (Invitrogen) was performed for 30 mins at 37°C during permanent shaking and was followed by filtration through first a 40- and then 100- $\mu$ m mesh filter (BD FALCON, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA, USA). The cell suspension was centrifuged at 800 g for 10 mins, and contaminating erythrocytes were removed by erythrocyte lysis buffer, pH 7.3. The cells were washed and then cultivated at a density of  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in T75 culture flasks in DMEM-F12 (Gibco Invitrogen) supplemented with 10% FCS, penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100  $\mu$ g/ml) (44). The medium was changed 2 days after the initial plating. The culture medium was then replaced twice each week.

BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs were subcultured after the cultures had reached 80% to 90% confluence; MSCs were detached by treatment with 0.25% trypsin/EDTA (Invitrogen) and were replated as passage-1 cells (the process was then continued as previously described).

**Determination of the Cell-Surface Antigen Profile.** BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs, between the third and fifth passages (P<sub>3</sub> through P<sub>5</sub>), were labeled with antibodies against several human proteins to analyze cell-surface expression of typical marker proteins: nonconjugated CD105, CD90, CD44, and CD31, each of which was conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC); CD73, CD166, and CD34, each of which was conjugated with phycoerythrin (PE); CD29, CD117, and CD14, each of which was conjugated with allophycocyanin (APC; BD Pharmingen, CA, USA); and CD45 conjugated with peridinin chlorophyll protein (PerCP; BD Pharmingen, San Diego, CA). Cells were detached by treatment with 0.25% trypsin/EDTA, washed with PBS, and incubated in the dark for 30 mins at room temperature with the respective antibody. Cells were then washed with wash flow buffer and resuspended in 500  $\mu$ l of 1% formaldehyde solution. For the detection of CD105, cells were further washed and incubated for 15 mins with a secondary antibody Goat F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG (gamma) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) (45). Mouse isotype IgG1 antibodies were employed as controls (BD Pharmingen). Approximately 20,000 labeled cells were passed through a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and were analyzed by FlowJo software (Flowjo, Ashland, Oregon, USA).

**Differentiation Procedures.** BM-derived and

UCB-derived MSCs and ADSCs were assessed for their potency by inducing their differentiation into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes. Cells between P<sub>3</sub> and P<sub>5</sub> from each source were incubated with three differentiation media.

**Adipogenic Differentiation.** Subconfluent (80%) MSCs were seeded on glass coverslips (Sarstedt, Newton, NC, USA) in 24-well plates (TPP) and were treated with three types of media: medium 1 consisted of 0.05  $\mu$ M dexamethasone (Sigma Chemical Co.), 10  $\mu$ g/ml insulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 60  $\mu$ M indomethacin (Sigma-Aldrich) in DMEM-HG (Gibco Invitrogen) with 15% FCS (46); medium 2 consisted of 1  $\mu$ M dexamethasone, 5  $\mu$ g/ml insulin, 60  $\mu$ M indomethacin in IMDM with 15% FCS (46); and medium 3 consisted of Poietics Differentiation Basal Medium Adipogenic (Cambrex BioScience, Walkersville, MD) supplemented with hMSC Adipogenic SingleQuots (Cambrex BioScience). Adipogenic differentiation was induced by cyclic changes; the maintenance medium that contained the adipogenic inducer was changed every 3 days during 3 weeks. Oil Red O (Sigma-Aldrich) was used to visualize lipid-rich vacuoles. Briefly, cells were treated with Bouin's fixative (Biotec, Labmaster, Paraná, Brazil) for 10 mins at room temperature, washed twice with 70% ethanol and once with Milliq water, and stained with a solution of 0.5% Oil Red O (Sigma-Aldrich) for 1 hr. Hematoxylin-eosin (HE) (Biotec) was used for nuclear staining. Control cells were kept in IMDM medium with 15% FCS. To quantitatively analyze adipogenic differentiation, 70 fields in three biological replicates from each source of MSCs were counted by using Image-Pro Plus version 4.5. We also performed RT-PCR and qPCR to estimate the level of adipocyte-specific FABP4 mRNA in induced (medium 2) and noninduced (negative control) cultures.

**Osteogenic Differentiation.** Cells were seeded and cultured on slides placed in 24-chamber plates (TPP) to induce osteogenic differentiation. Subconfluent (80%) cultures were subjected to three types of osteogenic medium: medium 4 consisted of 0.1  $\mu$ M dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate (Sigma-Aldrich), and 50  $\mu$ M ascorbate in DMEM-HG with 15% FCS (16); medium 5 consisted of 0.1  $\mu$ M dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate, 100  $\mu$ M ascorbate, and IMDM with 15% FCS (16); and medium 6 consisted of Poietics Differentiation Basal Medium Osteogenic (Cambrex BioScience) supplemented with hMSC Osteogenic SingleQuots (Cambrex BioScience). Media were replaced every 3 days over a 3-week period. Induced monolayers were fixed for 10 mins in Bouin's fixative (Biotec) and washed (twice with 70% ethanol and once with Milliq water). Monolayers were then incubated for 15 mins with Alizarin Red S at pH 7.0 and pH 4.2 (Fluka Chemie, Buchs, UK) at room temperature to evaluate calcium accumulation. Light green (Sigma-Aldrich) was used to counterstain. Control cells were kept in IMDM with 15% FCS over the same period. In addition, RT-PCR and qPCR were performed to estimate the level of

Table 1. Primer Sets Used for RT-PCR and qPCR

Gene	Sequence (5'-3')	Accession no.	Amplicon (bp)
GAPDH	Forward: GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	2597	150
	Reverse: TGGTTCACACCCATGACGA		
FABP4	Forward: ATGGGATGGAAAATCAACCA	2167	97
	Reverse: GTGGAAGTGACGCCCTTCAT		
Osteonectin	Forward: ACATCGGGCCTTGCAAATACATCC	6678	437
	Reverse: GAAGCAGCCGGCCACTCATC		
ALP	Forward: TACAAGGTGGTGGGCGGTGAACGA	249	92
	Reverse: TGGCGCAGGGGCACAGCAGAC		
Collagen type II, $\alpha 1$	Forward: CCGGGCAGAGGGCAATAGCAGGTT	1280	128
	Reverse: CAATGATGGGGAGGCGTGAG		

the osteoblast-specific osteonectin and alkaline phosphatase (ALP) mRNA in MSCs cultured in induction medium (medium 5) and in noninduction or control medium.

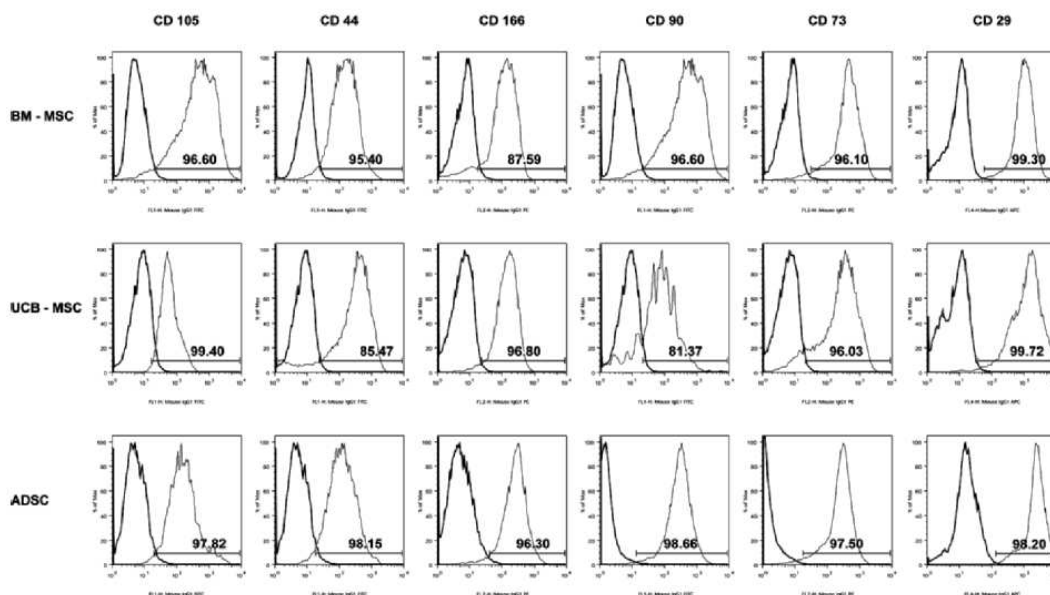
**Chondrogenic Differentiation.** Cells were grown in micromass culture to promote chondrogenic differentiation (47). Briefly,  $2 \times 10^5$  cells in 0.5 ml of medium were centrifuged at 300 *g* for 10 mins in a 15-ml polypropylene tube to form a pellet. Without disturbing the pellet, cells were cultured for 21 days in three different chondrogenic media: medium 7 consisted of DMEM-HG supplemented with 15% FCS and 0.01  $\mu$ M dexamethasone, 397  $\mu$ g/ml ascorbic acid-2-phosphate (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate (Gibco Invitrogen), 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (Sigma-Aldrich), and 1% insulin-transferrin-selenium-X (Gibco Invitrogen) (27); medium 8 consisted of DMEM-HG supplemented with 1% FCS and 10 ng/ml TGF $\beta$ 1, 0.5  $\mu$ g/ml of insulin, 50  $\mu$ M ascorbic acid (27); and medium 9 consisted of Differentiation Basal Medium Chondrogenic supplemented with hMSC Chondrogenic SingleQuots. Media was changed every 3 days. On day 21, cell aggregates were fixed in 10% formaldehyde for 1 hr at room temperature, dehydrated in serial ethanol dilutions, and embedded in paraffin blocks. Paraffin sections (4- $\mu$ m thick) were stained for histologic analysis with HE, Mallory (Biotec), or Toluidine Blue solution (Sigma-Aldrich) to demonstrate the presence of intracellular matrix mucopolysaccharides. Chondrogenic differentiation was further confirmed by RT-PCR analysis of the chondrocyte-specific protein collagen type II mRNA in induced (medium 8) and noninduced cultures.

**Total RNA Extraction and RT-PCR.** Total RNA was obtained with the RNeasy kit (QIAGEN, Austin, TX) and treated in column with DNase I (QIAGEN). Concentrations were determined by spectrophotometry (Gene-Quant, Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA by using 1  $\mu$ l of 10  $\mu$ M oligo-dT primer (USB Corporation, Cleveland, OH) and 1  $\mu$ l of reverse transcriptase (IMPROM II, Promega, Fitchburg, WI) according to the manufacturers' instructions. PCR was carried out with 20 ng of cDNA as template, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50

mM KCl, 5 pmol of primers (10 pmol for the *FABP4* gene; Table 1), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.0625 mM dNTPs, and 1 unit *Taq* polymerase (Invitrogen). The oligonucleotide primer sets used for PCR and the amplicon size are depicted in Table 1. PCR included heating at 94°C for 2 mins, and the heating was followed by 30 cycles of 94°C for 15 secs, 55°C for 30 secs, 72°C for 40 secs, and a final extension of 72°C for 3 mins by using a Bio-Cycler II thermocycler (Peltier Thermal Cycler; Bio-Rad, Hercules, CA). Ten microliters of RT-PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining, and photographed under ultraviolet illumination (UV White Darkroom, UVP Bioimaging Systems, Upland, CA).

**qPCR.** Quantitative PCR was performed by using the ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Amplifications were carried out in a final reaction volume of 20  $\mu$ l with the SYBR Green master mix (Applied Biosystems), 10 ng cDNA template, and 5 pmol primers (10 pmol for *FABP4*). PCR conditions were 50°C for 2 mins and 95°C for 10 mins, and this initial step was followed by 45 cycles of 95°C for 15 secs, 60°C for 30 secs, and 72°C for 40 secs. The melting curves were acquired after PCR to confirm the specificity of the amplified products. A standard curve based on cycle threshold values was used to evaluate gene expression. In brief, we used 1:5 dilutions of known concentrations of cDNA in triplicate to generate curves extending from 50 pg to 80 ng cDNA. We generated standard curves for each gene, including the control (housekeeping) gene. The relative amount of gene expression for each sample was normalized by dividing the value obtained for the analyzed gene by the value obtained for each control gene. Results were analyzed as gene expression relative to the housekeeping gene expression. Differences in expression were observed by comparing cells induced to differentiate with control samples that had not been induced (48).

**Statistical Analysis.** Continuous variables were presented as means  $\pm$  standard deviations, and categorical variables were presented as frequencies and percentages. Comparisons between BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs were performed by using the nonparametric



**Figure 2.** Immunophenotype assessed by flow cytometry. BM-derived MSCs, UCB-derived MSCs, and ADSCs were labeled with antibodies against the indicated antigens and analyzed by flow cytometry. Representative histograms are displayed. On the y axis is the % Max (the cell count in each bin divided by the cell count in the bin that contained the largest number of cells), and the x axis is the fluorescence intensity in a log ( $10^2$ – $10^4$ ) scale. The isotype control is shown as a thick black-line histogram.

were found between BM-derived MSCs ( $DV = 245.57 \pm 943 \mu\text{m}^2$  per nucleus) and ADSCs ( $DV = 243.89 \pm 145.52 \mu\text{m}^2$  per nucleus). The impressively high variations observed in BM-derived MSCs DV may be a consequence of the heterogeneous cell population present at the moment analyzed. However, the mean area occupied by individual lipid droplets was  $7.37 \mu\text{m}^2$  in BM-derived MSCs and  $2.36 \mu\text{m}^2$  in ADSCs, indicating that adipocytes in BM-derived MSC cultures are more mature than in treated ADSC cultures.

Osteogenic differentiation was assessed by the mineralization of the extracellular matrix, visualized by Alizarin Red S staining at pH 4.2. We detected calcium carbonate and phosphate in cells from all sources after 21 days of differentiation induction (Fig. 3). No differences in the osteogenic differentiation capacity were detected among BM-derived and UCB-derived MSC and ADSC samples.

In chondrogenic differentiation assays, MSCs formed aggregates that dislodged and floated freely in the suspension culture. High-density micromass MSC cultures generated cellular nodules, which produced large amounts of cartilage-related extracellular matrix molecules such as collagen. Paraffin sections of the aggregates stained with HE, Mallory, or Toluidine Blue showed a condensed structure with cuboidal cells and chondrocyte-like lacunae. The cells stained positively for Toluidine Blue; this dye is specific for the highly sulfated proteoglycans of cartilage

matrices. All samples tested, irrespective of their origin, demonstrated a cartilage-like phenotype with chondrocyte-like lacunae (Fig. 3).

Untreated control cultures, which were grown in regular medium without adipogenic, osteogenic, or chondrogenic differentiation stimuli, did not exhibit spontaneous adipocyte, osteoblasts, or chondrocyte formation after 14 and 21 days of cultivation (Fig. 3).

**Expression Profile of Differentiation Markers by RT-PCR and q-PCR Analysis.** The mRNA levels of various marker genes were analyzed by RT-PCR and qPCR of total RNA isolated from induced and noninduced cultures. GAPDH mRNA was used as an internal control.

Levels of mRNA for FAPB4 were analyzed as a marker of adipogenic differentiation. RT-PCR easily detected FAPB4 expression in induced BM-derived MSCs and ADSCs in comparison with FAPB4 expression in the noninduced control cells; importantly, control cells were cultured for the same period as treated cells were. The overall RT-PCR profile was very similar for replicates from the same MSC source. However, results of qPCR detected significant variability in expression among independent biological samples (Fig. 5A). No expression or low levels of expression of FAPB4 were detected in induced and noninduced UCB-derived MSCs; this low expression is in contrast to that observed in BM-derived MSCs and ADSCs (Fig. 5A). Therefore, poor adipogenic potential detected in



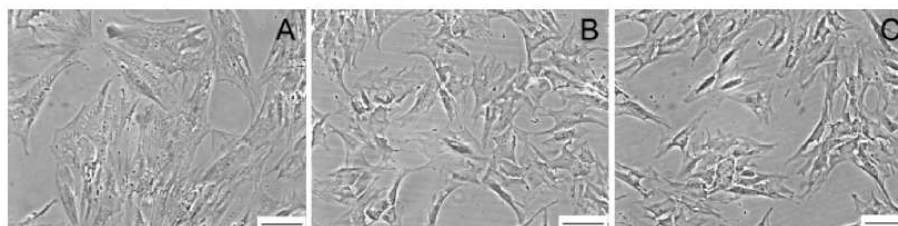


Figure 1. Microscopic appearance of MSCs. (A) BM-derived MSCs. (B) UCB-derived MSCs. (C) ADSCs. Magnification:  $\times 400$ . The bar indicates 20  $\mu\text{m}$ .

Kruskal-Wallis exact test, and values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant. Analysis was performed with the SPSS V.14 software package.

## Results

**Isolation, Expansion, and Morphology of BM-Derived and UCB-Derived MSCs and ADSCs.** The success rate for isolating BM-derived MSCs and ADSCs was 100% (10/10). By contrast, the success rate for UCB was only 30% (3/10). UCBs were processed no longer than 12 hrs after umbilical cord collection. A net volume of  $74.4 \pm 28.7$  ml and  $88.1 \times 10^6 \pm 48.4 \times 10^6$  MNCs were obtained. No correlation was detected between volume, number of MNCs in the UCB after gradient separation, and success in obtaining MSCs. Although evidence for the isolation of fibroblastoid cells with MSC characteristics from UCB is still under debate (11, 15, 24, 28–30, 33–35, 44), we observed that MSC-like cells can be isolated from UCB units of full-term newborns.

The commercial kit (RosetteSep) did not significantly improve the isolation of UCB-derived MSCs. Therefore, the density gradient method (Histopaque) was used because it was less expensive and faster. Only a few cells attached to the plastic culture flasks and formed spindle-shaped adherent cells within 3 to 4 weeks after the plating of UCB-derived MNCs. By contrast, BM-derived MNCs and ADSCs formed clusters of elongated, spindle-shaped (fibroblast-like) MSCs within 3 days and reached cell confluence after 1 week.

Confluent cells were treated with trypsin and were subcultured (1:2 split). Cells from BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs after two passages were homogeneous in size ( $P = 0.159$ ) and granularity ( $P = 0.165$ ), having a fibroblastic shape (Fig. 1).

**MSC Cell-Surface Antigen Profile.** Cell-surface antigen expression was evaluated by flow cytometry in at least 3 samples each from BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs between  $P_3$  and  $P_5$  (Fig. 2). With few exceptions, all three sources displayed similar immunophenotypes for the markers analyzed (Fig. 2 and Table 2). Cells were uniformly positive for the endoglin receptor CD105, the extracellular matrix protein CD90, the surface enzyme ecto-5'-nucleotidase CD73, the activated leukocyte cell

adhesion molecule CD166, the  $\beta_1$ -integrin CD29, and the hyaluronate receptor CD44. No detectable contamination of hematopoietic cells was observed, as flow cytometry analysis was negative for markers of hematopoietic lineage, including the lipopolysaccharide receptor CD14, the leukocyte common antigen CD45, and the endothelial cell marker CD31. The percentages of expression of CD34, a hematopoietic progenitor cell marker, in MSCs isolated from BM, UCB, and ADSCs were  $2.16\% \pm 2.48\%$ ,  $10.52\% \pm 10.58\%$ , and  $10.37\% \pm 8.37\%$ , respectively (Table 2). Statistical analysis comparing the MSCs sources regarding CD34 showed a significant difference only between BM and ADSCs ( $P = 0.02$ ). Flow cytometry experiments for CD117 (c-kit) were independently analyzed by three experts. The independent analyses showed that CD117 is a complex marker to evaluate. Whereas ADSCs were clearly positive ( $98.11 \pm 3.06$ ), BM-derived and UCB-derived MSCs showed dimly positive-to-negative staining for CD117. This pattern became evident when the mean values and standard deviations of BM-derived and UCB-derived MSCs positive for CD117 were evaluated ( $52.7 \pm 46.46$  and  $38.84 \pm 40.80$ , respectively; Table 2).

**Differentiation Assays.** After careful visual examination, the following differentiation media were considered the most efficient in inducing adipogenic (medium 2), osteogenic (medium 5), and chondrogenic (medium 8) differentiation. Using these media, MSCs from the three sources between passages  $P_3$  and  $P_5$  were compared for their multilineage differentiation plasticity by *in vitro* assays. Differentiation to adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes was qualitatively assessed on the basis of cell morphology and cytochemistry.

We used the presence of lipid-rich vacuoles stained with Oil Red O to analyze adipogenic induction. BM-derived MSCs and ADSCs presented large, round cells with cytoplasmic lipid-rich vacuoles (Fig. 3); however, UCB-derived MSCs displayed few and very small intracellular lipid droplets (Fig. 4). Seventy fields in three biological replicates from each source of MSCs were analyzed to estimate the differentiation value (DV), which was calculated by dividing the lipid droplet area by the number of nuclei so that possible differences in field cell confluences were considered. No differences in the adipogenic potential

## DIFFERENTIATION POTENTIAL OF VARIOUS MSCs

907

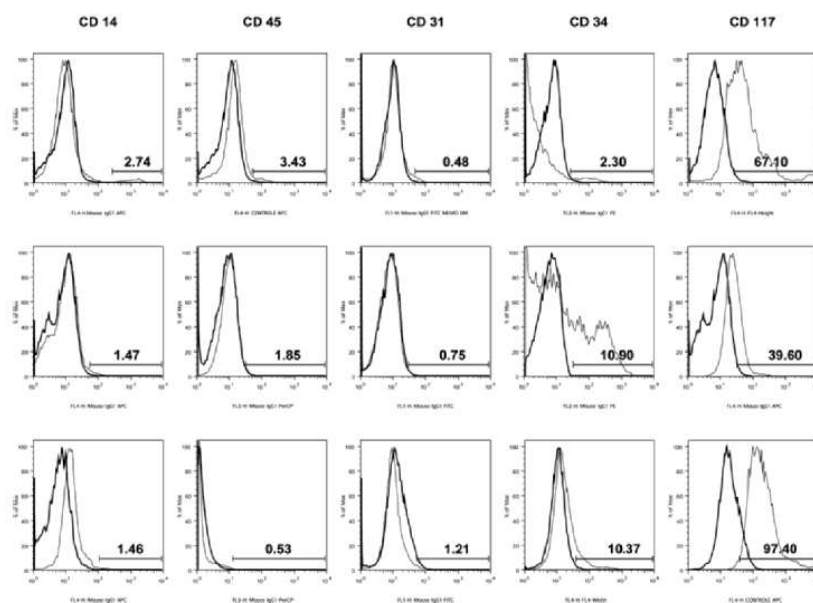


Figure 2. Continued.

UCB-derived MSCs by microscopic analysis was consistent with the results observed in FAPB4 expression analyses.

We analyzed osteonectin and ALP expression to evaluate osteogenic induction. Osteonectin is a glycoprotein that has been used as a differentiation marker for bone cells (49). RT-PCR showed no difference in osteonectin expression between induced and noninduced cells (data not shown). By qPCR, we observed discordant osteonectin expression profiles among biological samples from all three MSC sources. Whereas osteonectin expression in the induced culture in one BM sample was considerably greater than that in the noninduced culture, no difference was observed in the

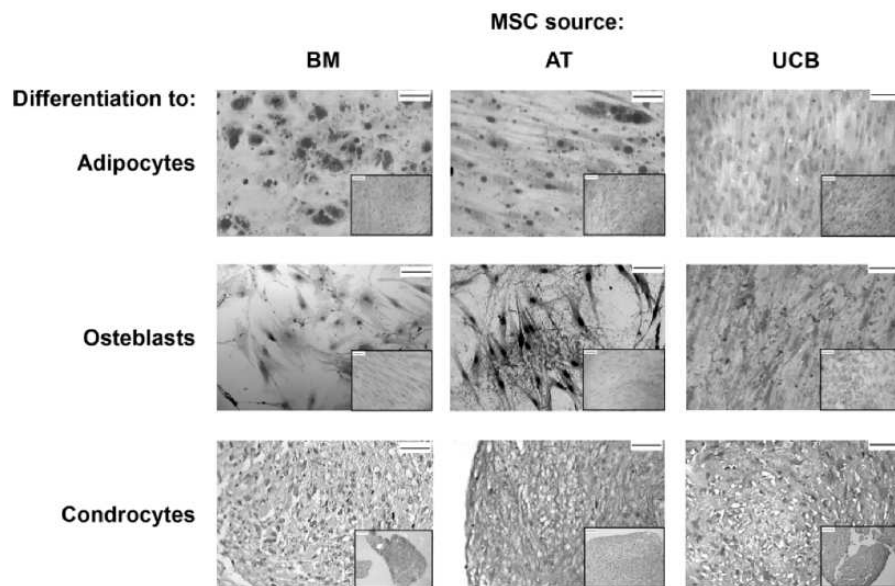
remaining samples. Therefore, we concluded osteonectin did not appear to be a suitable marker for osteogenic differentiation, at least in the culture conditions used in this study. Therefore, ALP mRNA levels were analyzed. We detected higher ALP mRNA levels in the induced cells than in noninduced cells from all sources after performing qPCR (Fig. 5B). In all the induced UCB-derived MSCs replicates analyzed, ALP mRNA levels were higher than those in the induced samples from the other sources (Fig. 5B).

Chondrogenesis was further studied by analyzing the mRNA level of a well-known marker, the cartilage-specific type II collagen gene. Similar to osteonectin expression, a

**Table 2.** Comparison of the Expression of Surface Proteins of Mesenchymal Stem Cells Derived from at Least 3 Samples of BM-Derived MSCs, UCB-Derived MSCs, and ADSCs Analyzed by Flow Cytometry<sup>a</sup>

Antibody	BM	UCB	AT
CD105	95.75 ± 5.52	96.96 ± 4.33	98.83 ± 1.01
CD90	93.16 ± 4.61	87.16 ± 5.79	96.78 ± 1.88
CD73	97.61 ± 2.83	96.84 ± 0.81	96.42 ± 2.82
CD166	91.69 ± 4.10	80.71 ± 25.31	93.79 ± 6.78
CD44	95.43 ± 4.27	92.48 ± 7.01	98.77 ± 0.62
CD29	98.72 ± 2.28	99.78 ± 0.06	97.45 ± 4.18
CD14	4.06 ± 4.35	4.32 ± 3.57	2.13 ± 1.79
CD45	1.97 ± 1.46	0.97 ± 0.88	0.45 ± 0.58
CD31	0.28 ± 0.20	0.41 ± 0.43	0.94 ± 1.54
CD34	2.16 ± 2.48	10.52 ± 10.58	10.37 ± 7.98
CD117	52.70 ± 46.46	38.84 ± 40.80	98.11 ± 3.06

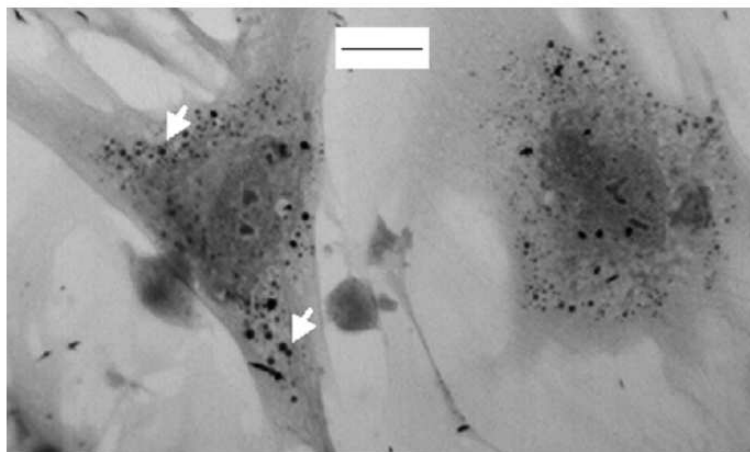
<sup>a</sup> Each value is the mean percentage of at least three experiments ± standard deviation.



**Figure 3.** Differentiation of BM-derived MSCs, UCB-derived MSCs, and ADSCs. Cells between P<sub>3</sub> and P<sub>5</sub> from each source were incubated for 21 days in the presence of specific differentiation agents for adipocytes (medium 2), osteoblasts (medium 5), and chondrocytes (medium 8). Differentiation into the adipocyte lineage was demonstrated by staining with Oil Red O. Alizarin Red S staining shows mineralization of the extracellular matrix. Toluidine Blue shows the deposition of proteoglycans and lacunae. Untreated control cultures without adipogenic, osteogenic, or chondrogenic differentiation stimuli are shown on the bottom right corner of each photograph. Magnification:  $\times 200$ . The bar indicates 20  $\mu\text{m}$ .

strong band was detected in all induced and noninduced MSCs under the RT-PCR conditions used in this study. However, we detected higher type II collagen expression in induced cells than in noninduced cells after qPCR; this

increase in expression was evident for most induced cells although individual expression levels varied (Fig. 5C). In a few cases, no significant differences between induced and noninduced cells were seen (2 of 4 ADSCs).



**Figure 4.** Tiny intracytoplasmic lipid droplets (arrowheads) present in UCB-derived MSCs under standard differentiation conditions. Magnification:  $\times 1000$ . The bar indicates 20  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

The expected plasticity of human mesenchymal progenitors is paramount for upcoming therapeutic strategies for cellular therapy and tissue engineering. Functional assays are required to establish the presence of MSCs in a tissue because there are no specific and universal molecular markers of adult MSCs. Here we compared the biological properties and differentiation potential of MSCs isolated from presently the most important sources: BM, UCB, and AT.

MSC isolation differed depending on the source. Whereas BM-derived MSCs and ADSCs isolation efficiency was 100%, that for UCB-derived MSCs was only 30%. Other groups have also reported low levels of efficiency in the isolation and establishment of UCB-derived MSCs (10, 11, 24). Sharing UCB-derived MSCs with the fetus (50) and cross-contamination with monocytes and osteoclast-like cells during culture establishment (24) are some of the hypotheses to explain the low yields of MSCs from this source. Also, successes in obtaining UCB-derived MSCs are related to the time between collection and isolation, and the UCB unit volume (24). In this study, the storage time was less than 12 hrs, and the mean volume was  $74.4 \pm 28.7$  ml; however, the low number of MNCs ( $88.11 \times 10^6 \pm 48.37$ ) might account for the extremely low frequency of UCB-derived MSCs obtained in comparison with the frequencies of BM-derived MSCs or ADSCs. The period for establishing BM-derived MSCs or an ADSC monolayer was shorter than that for UCB-derived MSCs. Growth of the latter was slower than that of BM-derived MSC and ADSC cultures, but once cultures were established, growth was maintained over multiple passages. This result probably reflects the low precursor frequency of MSCs in UCB (32).

No morphologic differences were observed between BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs, as has been previously reported (10, 11, 51). Also, flow cytometry measurements showed no significant differences concerning cell size and complexity in all MSC populations (data not shown). The homogeneity of MSC cultures at specific passages was apparent after assessment of the cell-surface antigen profile. The direct comparison reported here showed that BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs share classic MSC marker proteins (52). As expected, these cells lacked the hematopoietic marker CD14, CD45, and the endothelial marker CD31. However, CD34 gene expression was 2% in BM-derived MSCs and about 10% in UCB-derived MSCs and ADSCs. This observation was not unusual as freshly isolated or primary cultures of BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs have been reported to be dimly to significantly positive for CD34 (15, 53–56).

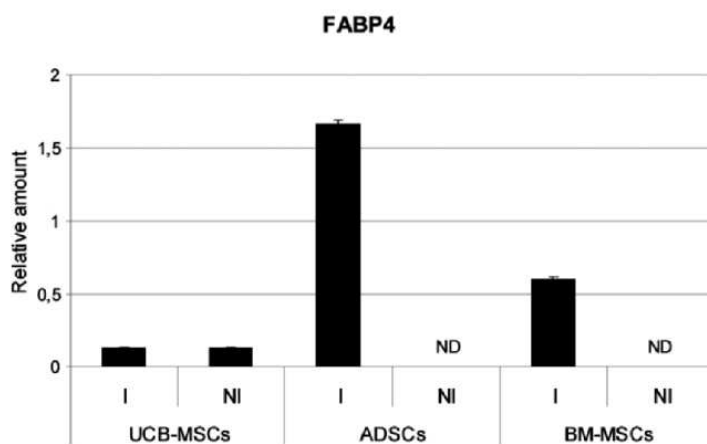
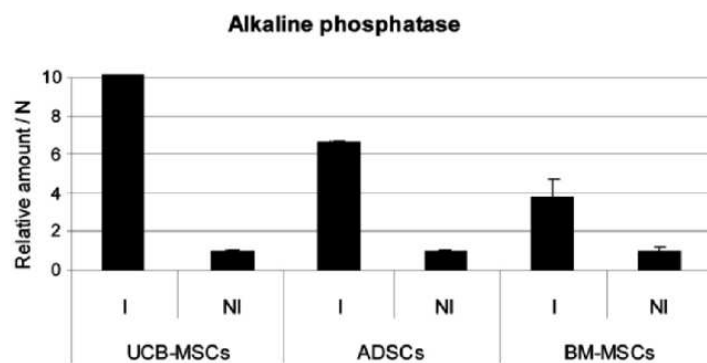
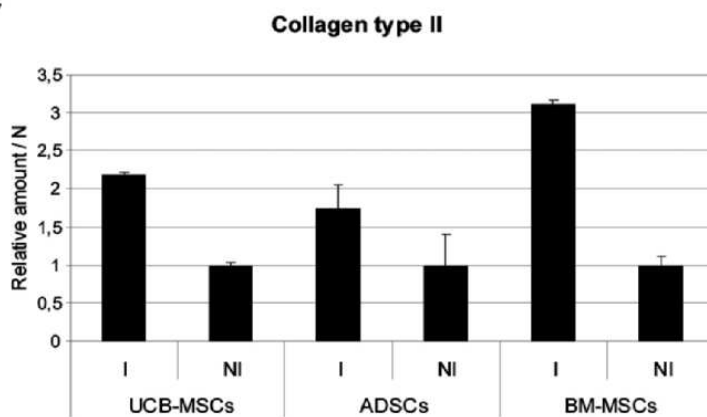
CD117 was present in ADSCs and dim in BM-derived and UCB-derived MSCs. Expression of this protein by MSCs is controversial. It has been previously reported that

MSCs do not express CD117 (10, 57–59), whereas other reports have shown that embryonic stem cells, hematopoietic stem cells, and MSCs are dimly or strongly positive for this marker (60–63); our results are consistent with the latter. Together, these data strongly suggest that BM-derived MSCs, UCB-derived MSCs, and ADSCs are highly similar morphologically but are not so immunophenotypically (54, 57, 62–65).

In this study, we used qualitative assays to demonstrate the *in vitro* multilineage developmental potential of BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs after exposure to specific culture conditions. BM-derived MSCs and ADSCs demonstrated a high *in vitro* potential to differentiate into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes, whereas UCB-derived MSCs presented a more restricted, or at least delayed, adipocyte differentiation capacity. Immaturity of these neonatal cells cannot account for their low adipocyte differentiation potential because differentiation to osteoblasts and chondrocytes was similar to that of BM-derived MSCs and ADSCs.

BM-derived MSCs and ADSCs cultures had a greater propensity to differentiate into adipocytes than did UCB-derived MSCs under similar culture conditions. Induced BM-derived MSCs presented more mature adipocytes (unilocular lipid vacuoles) by morphometric assessment than did induced ADSCs. Karahuseynoglu *et al.* (66) reported that some MSCs in the BM stroma may already be committed to form mature adipocytes *in situ*. Previous studies had reported conflicting data regarding the adipogenic differentiation potential of UCB-derived MSCs (10, 11, 15, 24, 25, 32, 50). UCB-derived MSCs rarely differentiated toward adipocytes under our standard differentiation protocols. Only tiny lipid vacuoles were observed in a few UCB-derived MSCs after 21 days of induction, and FABP4 expression was poor or even absent; FABP4 is a fatty acid-binding protein characteristically present in adipocytes. These tiny lipid vacuoles suggest that differentiation is at its initial stages, and it is highly probable that a longer culture period is necessary for UCB-derived MSC adipogenic differentiation. In fact, human umbilical cord stromal cells achieved adipogenic differentiation only after 40 days of induced culture (66); this represents a relatively longer period than with BM-derived MSCs and ADSCs. Also, Bieback *et al.* (24) showed that adipogenic differentiation could solely be induced in MSC-like cells cultured continuously in adipogenic induction medium for at least 5 weeks.

In this study, human BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs were able to proliferate and subsequently differentiate into osteoblasts. Incubation with differentiation medium induced cell aggregation and matrix production, which positively stained with the calcium-specific marker Alizarin Red S. The mRNA profiles for osteonectin were not satisfactory for the detection of osteoblast differentiation, at least under our conditions. Compared with induced MSCs, untreated MSCs from all three sources

**A****B****C**

mostly showed no differences in osteonectin mRNA levels. Data deposited at the Gene Expression Omnibus profile at National Center for Biotechnology Information (accession number GDS1288 record | GPL96 212667) show that osteonectin mRNA levels in BM-derived MSCs are quite high, and it has also been shown by Serial Analysis of Gene Expression analyses that noninduced BM-derived and UCB-derived MSCs significantly expressed this glycoprotein (67, 68); these data are consistent with our observations. Therefore, we suggest that osteonectin is not an appropriate hallmark gene for cultures induced to differentiate into osteoblasts during 21 days. Matrix mineralization is the latest stage of osteoblast differentiation process, and osteonectin may be considered a marker for terminal differentiation (69); terminal differentiation was not achieved in the 21 days of our induced cultures. Accordingly, Plant and Tobias (70) studied osteoblast differentiation and observed that osteocalcin, osteopontin, and osteonectin expression showed modest increases only at later times, such as 20 and 24 days after induction. Conversely, ALP appeared to be a good osteogenic marker under conditions used in this study. In addition, identifying genes associated with osteoblast differentiation is a very complex task in MSCs induced to become an osteoblast lineage (71–74).

BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs cultured with TGF- $\beta$  developed typical morphologic features of chondrocytes and produced mucopolysaccharide, an indicator of chondrogenic differentiation. Although the extracellular matrix protein collagen type II is expressed by chondrocytes and MSCs, q-PCR assays clearly showed that its mRNA levels were higher in induced MSCs than in noninduced MSCs. A common observation for all the molecular markers analyzed was the considerable variability seen among all biological samples. The overall profiles were similar among samples that had undergone similar treatment, but the relative mRNA levels differed enormously. It is highly probable that the variation observed was mainly due to the age, the health condition, and the genetic background of the patients and donors rather than due to technical variations (75, 76).

Here we presented comparative data from human BM-derived and UCB-derived MSCs and ADSCs. It is reasonable to conclude that MSCs can be found in these three various tissues, and although MSCs from the 3 sources analyzed here may be considered morphologically and immunophenotypically similar with the usual markers available, they clearly diverge in their differentiation

capacity and/or differentiation kinetics. Presently, stem cell-based therapies are being extensively studied *in vivo*. Whereas BM-derived MSCs and ADSCs can produce a variety of tissues of mesodermal and nonmesodermal origins (77–82), the *in vivo* adipocyte differentiation potential of UCB-derived adherent cells seems to be reduced (27), as it was observed in our *in vitro* assays. Therefore, further basic research is still necessary to understand the biology of MSCs obtained from different tissues and to delineate their extent and significance on clinical applications.

We thank Patricia Shigunov, Miriam Beltrame, and José A. Moutinho for technical assistance; Marcia Olandoski for statistical analysis; and Dr. Bruno Dallagiovanna for helpful discussion of the data.

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147, 1999.
2. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte culture and mitogenic response independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 57:11–20, 2003.
3. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pveritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5: 309–313, 1999.
4. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WW, Marx JC, Neel M, Mcnall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8932–8937, 2002.
5. Kawate K, Yajima H, Ohgushi H, Kotobuki N, Sigitomo K, Ohmura T, Kobata Y, Shigematsu K, Kawamura K, Tamai K, Takakura Y. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs* 30: 960–962, 2006.
6. Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, Baldini N, Giunti A. Human bone marrow stromal cells: *in vitro* expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials* 27:6150–6160, 2006.
7. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AL, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 18:307–316, 2000.
8. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy* 8:559–561, 2006.
9. Gimble JM, Guilak F. Differentiation potential of adipose derived adult stem cell (ADAS) cells. *Curr Top Dev Biol* 58:137–160, 2003.
10. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause

**Figure 5.** Expression profile of differentiation markers. BM-derived MSCs, UCB-derived MSCs, and ADSCs were maintained in induced or control medium for 21 days and assayed for the expression of adipogenic, osteogenic, and chondrogenic specific mRNA levels. (A) The adipogenic differentiation marker FABP4, (B) the osteogenic differentiation marker ALP, and (C) the chondrogenic differentiation marker collagen type II were analyzed by q-PCR. Abbreviations: BM, bone marrow; UCB, umbilical cord blood; MSCs, mesenchymal stem cell; ADSC, adipose tissue derived stem cells; I, induced cells; NI, noninduced cell (negative control); ND, not detected. Representative results of three independent experiments are shown. Results of q-PCR are expressed as mean and standard deviation of the technical triplicate. GAPDH was used as an internal control. When possible, the relative amount values were normalized with the noninduced values (relative amount/N); thus, the value for the noninduced sample was 1.

- U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33:1402–1416, 2005.
11. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294–1301, 2006.
  12. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103:697–705, 1999.
  13. Toma C, Pittenger KS, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate of a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105:93–98, 2002.
  14. Tomita Y, Makino S, Hakuno D, Hattan N, Kimura K, Miyoshi S, Murata M, Ieda M, Fukuda K. Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved. *Med Biol Eng Comput* 45:209–220, 2007.
  15. Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L, Chen T-H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103:1669–1675, 2004.
  16. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger DR. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 9645–9652, 2000.
  17. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3:393–403, 1970.
  18. Zvaifler NJ, Marinova-Matafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2:477–488, 2000.
  19. Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18:893–908, 2004.
  20. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20:1060–1069, 2002.
  21. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 44:85–95, 2001.
  22. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3:778–784, 2001.
  23. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30:896–904, 2002.
  24. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Clinical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22:625–634, 2004.
  25. Chang Y-J, Shih D, Tseng C-P, Hsieh T-B, Lee D-C, Hwang S-M. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Stem Cells* 24: 679–685, 2006.
  26. Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* 82:583–590, 2001.
  27. Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RY, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao O, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200:123–135, 2004.
  28. Gutiérrez-Rodríguez M, Reyes-Maldonado E, Mayani H. Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 18:46–52, 2000.
  29. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 86:1099–1100, 2001.
  30. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 121:368–374, 2003.
  31. Campagnoli C, Roberts LAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk N. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* 98:2396–2402, 2001.
  32. Goodwin H, Bicknese A, Chien S, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 7:581–588, 2001.
  33. Lee MW, Choi J, Yang MS, Moon YJ, Park JS, Kim HC, Kim YJ. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun* 320:273–278, 2004.
  34. Wang TT, Tio M, Lee W, Beerheide W, Udolph G. Neural differentiation of mesenchymal-like stem cells from cord blood is mediated by PKA. *Biochem Biophys Res Commun* 357:1021–1027, 2007.
  35. Markov V, Kusumi K, Tadesse MG, William DA, Hall DM, Lounev V, Carlton A, Leonard J, Cohen RI, Rappaport EF, Saitta B. Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles. *Stem Cell Dev* 16:53–73, 2007.
  36. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279–4295, 2002.
  37. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang JI, Futrell WJ, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–226, 2001.
  38. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Aughter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7:729–741, 2001.
  39. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 109:199–209, 2002.
  40. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen Y-DC, Wilkinson WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 371–379, 2002.
  41. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99:1285–1297, 2006.
  42. Nardi NB, Meirelles LS. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. New York: Springer, pp249–282, 2005.
  43. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21(Suppl):77–89, 1968.
  44. Strutt B, Khalil W, Killinger D. Growth and differentiation of human adipose stromal cells in culture. In: *Methods in Molecular Medicine: Human Cell Culture Protocols*. New Jersey: Humana Press, pp41–51, 1996.
  45. Owens MA, Vall HG, Hurley AA, Wormsley SB. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. *J Immunol Methods* 243:33–50, 2000.
  46. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:2204–2213, 2006.
  47. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:268–272, 1998.
  48. Nardelli SC, Avila AR, Freund A, Motta MC, Manhães L, Jesus TC.

- Schenkman S, Frago SP, Krieger MA, Goldenberg S, Dallagiovanna B. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryotic Cell* 6:337–345, 2007.
49. Gabbay JS, Heller JB, Mitchell SA, Zuk PA, Spoon DB, Wasson KL, Jarrahy R, Benhaim P, Bradley JP. Osteogenic potentiation of human adipose-derived stem cells in a 3-dimensional matrix. *Ann Plast Surg* 57: 89–93, 2006.
  50. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109:235–242, 2000.
  51. Musina RA, Beckchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Cell Technol Biol Med* 1:504–509, 2005.
  52. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317, 2006.
  53. Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 78:2848–2853, 1991.
  54. Dicker A, Le Blanc K, Aström G, van Harmelen V, Götherström C, Lomqvist L, Arner P, Rydén M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 308: 283–290, 2005.
  55. Boquest AC, Shahdadfar A, Fronsald K, Sigurjonsson O, Tunheim SH, Collas P, Brichmann JE. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after *in vitro* cell culture. *Mol Biol Cell* 16:1131–1141, 2005.
  56. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 129:118–129, 2005.
  57. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23:412–423, 2005.
  58. Yañez R, Laman ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host-disease. *Stem Cells* 24:2582–2591, 2006.
  59. Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Stem Cells* 25:2017–2024, 2007.
  60. Prat-Vidal C, Roura S, Farré J, Gálvez C, Llach A, Molina CE, Hove-Madsen L, Garcia J, Cincea J, Bayes-Genis A. Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits. *Transplant Proc* 39:2434–2437, 2007.
  61. Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GL, van Ham SM, van Milligen FJ. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev* 16:91–104, 2007.
  62. Colter DC, Class R, Digirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3213–3218, 2000.
  63. Aye MT, Hashemi S, Leclair B, Zeibdawi A, Trudel E, Halpenny M, Fuller V, Cheng G. Expression of stem cell factor and c-kit mRNA in cultured endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells (CFU-RF). *Exp Hematol* 20:523–527, 1992.
  64. Shahdadfar A, Fronsald K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. *In vitro* expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 23:1357–1366, 2005.
  65. Sudo K, Kanno M, Miharada K, Ogawa S, Hiroshima T, Saijo K, Nakamura Y. Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and/or adipogenic cells *in vitro* are present in most primary fibroblast-like cell populations. *Stem Cells* 25: 1610–1617, 2007.
  66. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: *in situ* and *in vitro* surveys. *Stem Cells* 25: 319–331, 2007.
  67. Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, Santos AR, Zago MA. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 21:661–669, 2003.
  68. Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA, Proto-Siqueira R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas DT, Zago MA. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22:1263–1278, 2004.
  69. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrinol Rev* 14:424–442, 1993.
  70. Plant A, Tobias JH. Characterization of the temporal sequence of osteoblast gene expression during estrogen-induced osteogenesis in female mice. *J Cell Biochem* 82:683–691, 1991.
  71. Harris SE, Guo D, Harris MA, Krishnaswamy A, Lichtler A. Transcriptional regulation of BMP-2 activated genes in osteoblasts using gene expression microarray analysis: role of Dlx2 and Dlx5 transcription factors. *Front Biosci* 8: S1249–S1265, 2003.
  72. Korchynski O, Dechering KJ, Sijbers AM, Olijve W, Ten Dijke P. Gene array analysis of bone morphogenetic protein type I receptor-induced osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 18:1177–1185, 2003.
  73. Peng Y, Kang Q, Cheng H, Li X, Sun MH, Jiang W, Lu HH, Park JY, Haydon RC, He TC. Transcriptional characterization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-mediated osteogenic signaling. *J Cell Biochem* 90:1149–1165, 2003.
  74. Roman-Roman S, Garcia T, Jackson A, Theilhaber J, Rawadi G, Connolly T, Spinella-Jaegle S, Kawai S, Courtois B, Bushnell S, Auberval M, Call K, Baron R. Identification of genes regulated during osteoblastic differentiation by genome-wide expression analysis of mouse calvaria primary osteoblasts *in vitro*. *Bone* 32:474–482, 2003.
  75. Tokalov SV, Grüner S, Schindler S, Wolf G, Baumann M, Abolmaali N. Age-related changes in the frequency of mesenchymal stem cells in the bone marrow of rats. *Stem Cells Dev* 16:439–446, 2007.
  76. Siddappa R, Licht R, van Blitterswijk C, Boer J. Donor variation and loss of multipotency during *in vitro* expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J Orthop Res* 25:1029–1041, 2007.
  77. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AB, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after *in utero* transplantation in sheep. *Nat Med* 6:1282–1286, 2000.
  78. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J, Kogon AJ, Nanda D, Grant RT, Breitbart AS. Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 50:610–617, 2003.
  79. Chen J, Wang C, Lü S, Wu J, Guo X, Duan C, Dong L, Song Y, Zhang J, Jing D, Wu L, Ding J, Li D. *In vivo* chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 319:429–438, 2005.
  80. Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z. Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells* 24:1728–1737, 2006.
  81. Jackson L, Jones DR, Scotting O, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 53:121–127, 2007.
  82. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair current views. *Stem Cells* 25:2896–2902, 2007.



## ANEXO D – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA



REVISTA BRASILEIRA  
DE HEMATOLOGIA  
E HEMOTERAPIA

## Expansão de células-tronco da medula óssea e do sangue de cordão umbilical humano

*Expansion of stem cells from bone marrow and human umbilical cord blood*

Alexandra C. Senegaglia<sup>1</sup>

Carmen L. K. Rebelatto<sup>1</sup>

Paula H. Suss<sup>1</sup>

Paulo R. S. Brofman<sup>2</sup>

*Células-tronco/progenitoras frequentemente não estão disponíveis em quantidade suficiente para restauração de órgãos e tecidos danificados, sendo necessária sua expansão in vitro. Instalações físicas adequadas, pessoal técnico qualificado, reagentes de grau clínico e protocolos bem definidos de acordo com as condições de boas práticas de fabricação são imprescindíveis para assegurar a qualidade e segurança das células infundidas no paciente. A medula óssea e o sangue de cordão umbilical ainda são as fontes de células mais utilizadas em terapias. Protocolos bem sucedidos de expansão utilizando células-tronco hematopoéticas, células-tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais já têm sido empregados em estudos pré-clínicos e clínicos. A escolha do tipo celular adequado deve ser direcionada pelo tamanho da lesão ou natureza do tecido tratado e pelo efeito terapêutico desejado. Estudos recentes têm demonstrado que propriedades de diferentes células expandidas in vitro podem ser combinadas para obtenção de um resultado melhor no tratamento de algumas doenças. Células em culturas de longo termo precisam ser acompanhadas por meio de diversas técnicas de citogenética clássica e molecular para demonstrar que não há evidências de transformação espontânea ou sinais de imortalização. Ensaio utilizando a infusão de células expandidas através da barreira alogeneica e xenogeneica, apresentaram melhora funcional e foram alcançados sem imunossupressão e sem evidências de infiltrados celulares que indicariam resposta imune. Porém, mais estudos precisam ser realizados para avaliar a imunogenicidade destas células e garantir a segurança da terapia celular alogênica permitindo sua consolidação no uso clínico. Aqui apresentamos uma atualização sobre expansão celular associada com seu uso clínico. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*

**Palavras-chave:** Células-tronco; medula óssea; cordão umbilical.

### Introdução

As células-tronco/progenitoras não estão disponíveis, naturalmente, em quantidade suficiente para restauração de órgãos e tecidos danificados. Para assegurar o sucesso das terapias regenerativas é necessária a expansão do número destas células. Algumas das limitações ao desenvolvimento de terapias utilizando células expandidas *in vitro* são as

necessidades de instalações físicas adequadas, pessoal técnico qualificado com experiência em cultivo e protocolos bem definidos para a produção de células, seguindo todas as normas internacionais de boas práticas de fabricação. Outra dificuldade é que a expansão requer uma grande variedade de reagentes, como citocinas e fatores de crescimento, que, em sua grande maioria, não são produzidos em grau clínico. A necessidade da substituição destes reagentes por similares

<sup>1</sup>Bióloga – Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) – Curitiba-PR.

<sup>2</sup>Professor Titular – Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) – Curitiba-PR.

Núcleo de Cardiomioplastia Celular – Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba-PR.

**Correspondência:** Alexandra Cristina Senegaglia  
Rua Guilherme Pugsley, 1760 ap 501  
80620-000 – Curitiba-PR – Brasil  
Tel.: (55 41) 3271-2219 – Fax.: (55 41) 3271-1621  
E-mail: alexandra.senegaglia@pucpr.br  
Doi:

de grau clínico é crítica para o desenvolvimento de novos protocolos. Este procedimento visa não somente minimizar os riscos de contaminação, mas também reduzir a chance de desvios de protocolos e otimizar a identificação de problemas na produção e melhorar o processo como um todo.<sup>1</sup>

A escolha do tipo celular adequado para a terapia celular deve ser direcionada pelo tamanho da lesão ou natureza do tecido que está sendo tratado e pelo efeito terapêutico desejado. A expansão de células específicas visa a melhora da eficácia da terapia celular, diminuindo a possibilidade de expansão inesperada, *in vivo*, de células não adequadas. As principais fontes de células utilizadas atualmente são a medula óssea e o sangue de cordão umbilical humano (SCUH).

### Medula óssea

O transplante de medula óssea, utilizado mais comumente para recuperar a linhagem hematopoética, foi o primeiro tipo de transplante que abordou a terapia com células-tronco, e os primeiros ensaios clínicos com sucesso foram na década de 1950.<sup>2</sup>

O uso da medula óssea como fonte de células, especialmente para terapia em cardiomiopatias, tem alguns pontos desfavoráveis, tais como o risco em relação ao procedimento da coleta, a possibilidade de formação de trombos se induzida à mobilização no sangue periférico e a dificuldade no uso para o tratamento da doença isquêmica aguda.<sup>3</sup> A atividade das células-tronco e especialmente das células progenitoras endoteliais é diminuída e o seu número é reduzido em pacientes que sofrem de doenças cardiovasculares, bem como nos pacientes de idade avançada.<sup>4,5,6</sup>

Entre os pontos favoráveis ao uso da medula óssea, está a possibilidade do transplante autólogo e de não haver necessidade de criopreservação da amostra para uso posterior, podendo-se obter uma grande quantidade de células que, no caso dos transplantes com células-tronco hematopoéticas, em geral, é suficiente para o sucesso do transplante.

### Sangue de cordão umbilical humano

O primeiro transplante utilizando células do sangue de cordão umbilical humano (SCUH) foi realizado em 1988 por Gluckman e colaboradores<sup>7</sup> para tratar uma criança com anemia de Fanconi. Até o momento, mais de 10 mil transplantes com SCUH já foram realizados em todo o mundo. Atualmente existem mais de duzentos bancos públicos e privados de SCUH no mundo, armazenando em torno de 2 milhões de unidades.<sup>8</sup>

Em relação ao SCUH têm-se como desvantagens a necessidade da criopreservação para um possível uso futuro e o número de células limitado ao volume coletado. Dentre as vantagens, a coleta não envolve nenhum tipo de risco para a

mãe ou para o bebê, e as células podem ser facilmente extraídas e criopreservadas. Em comparação com as células da medula óssea, no SCUH existe frequentemente um número maior de células-tronco por volume coletado, com alta capacidade de proliferação,<sup>3</sup> e as células transplantadas são menos suscetíveis ao desencadeamento da reatividade alógena no receptor.<sup>9</sup>

### Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM) contribuem na regeneração de cartilagem, gordura, ossos, músculos e estroma,<sup>10</sup> e a expansão destas células, provenientes de diversas fontes, tem sido explorada para o uso clínico nas mais variadas áreas.<sup>11,12,13</sup> Porém, não demonstram *in vivo* capacidade de regeneração ou manutenção de um compartimento tecidual.<sup>14</sup> CTM proliferam em cultura aderidas ao plástico, possuem capacidade de autorrenovação e podem diferenciar-se *in vitro* em múltiplas linhagens; representam uma fração muito pequena, apenas 0,001% a 0,01% das células nucleadas da medula óssea<sup>10</sup> e 0,00003% das células nucleadas do SCUH.<sup>15</sup> A caracterização celular destas células ainda não está totalmente definida, mas há um consenso de que devam ser positivas para os marcadores CD29, CD44, CD90, CD105, CD73 e negativas para os marcadores CD34, CD45, CD14 e CD3.<sup>1,16,17</sup>

A utilização das CTM no transplante para o tratamento de doenças hematopoéticas malignas e não malignas é fundamentada na sua aparente habilidade de modulação imunológica.

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma complicação pós-transplante de células-tronco hematopoéticas (CTH) que apresenta grande índice de mortalidade. As CTM dão suporte para o crescimento e diferenciação de CTH no microambiente medular e promovem a pega do enxerto em modelos animais.<sup>18</sup> Em um estudo com 55 pacientes, resistentes ao tratamento com esteróides e com DECH de graus II a IV, realizado por Le Blanc e colaboradores,<sup>19</sup> as CTM dos doadores, expandidas *in vitro*, foram infundidas nos pacientes pós-transplante de CTH. Após 60 meses de acompanhamento, 39 pacientes responderam ao tratamento, com sobrevivência significativamente mais alta naqueles com resposta completa e sem efeitos colaterais, sugerindo que as CTM podem suprimir a resposta das células T do doador aos aloantígenos do receptor.

Ball e colaboradores,<sup>20</sup> em um ensaio clínico envolvendo 14 pacientes, cotransplantaram CTM e CTH haploidenticas. Cinco semanas antes do transplante de CTH, células mononucleares foram isoladas da medula óssea e as CTM foram expandidas *in vitro*. Comparando-se os resultados dos pacientes que receberam a coinfusão de células com um histórico de 47 pacientes (do grupo controle) nas mesmas condições, que não receberam o cotransplante, verificou-se que no grupo controle houve 15% de falha na pega do transplan-

te e no grupo que recebeu as CTM todos os pacientes tiveram pega do enxerto sem nenhuma reação adversa, demonstrando que as CTM possivelmente suprimem o efeito alorreativo dos linfócitos T do hospedeiro.

A expansão *in vitro* possui o risco de acumular mudanças genéticas e epigenéticas na célula, o que poderia levar a uma transformação celular e ao câncer.<sup>21</sup> O cultivo de CTM na presença de reagentes de origem xenogênica também limita a utilização destas células em ensaios clínicos.

O uso do soro autólogo do paciente em substituição ao soro bovino fetal tem como fator limitante a quantidade que pode ser obtida e também o fato de que a idade dos indivíduos dos quais o soro foi obtido interfere na proliferação e/ou na diferenciação das CTM.<sup>22</sup> Schallmoser e colaboradores<sup>23</sup> demonstraram a capacidade de substituir o uso de soro bovino fetal pelo lisado de plaquetas no cultivo de CTM. Este procedimento previne a contaminação das células cultivadas com patógenos bovinos e a xenoinmunização, mantendo a capacidade de proliferação e diferenciação, e assim permite a utilização clínica das células cultivadas em diferentes doenças. O lisado de plaquetas é obtido a partir da concentração de dez unidades de plaquetas humanas ricas em plasma. Cada unidade é constituída de uma unidade de plasma de doador do grupo AB e quatro unidades de concentrado de plaquetas, de doadores do grupo O, previamente filtradas para depleção de células brancas. A lise das plaquetas se dá pelo congelamento a -30°C; a seguir o produto é centrifugado e filtrado, resultando em um volume aproximado de 2,5 a 3,0 litros, o qual é aliqotado e congelado para uso posterior.

Em culturas de longo termo, CTM de camundongo acumularam alterações cromossômicas e exibiram um fenótipo de transformação maligno<sup>24</sup> e, em alguns modelos animais, estas células levaram à formação de tumores *in vivo*.<sup>25,26</sup> CTM derivadas do tecido adiposo demonstraram potencial de transformação espontânea após culturas de longo termo *in vitro*.<sup>27</sup> CTM humanas originadas da medula óssea parecem diferir bastante no comportamento quando comparadas às CTM de camundongo. Bernardo e colaboradores<sup>28</sup> realizaram um estudo utilizando diversas técnicas de citogenética clássica e molecular para demonstrar que não há evidência de transformação espontânea ou sinal de imortalização das CTM obtidas da medula óssea de indivíduos saudáveis em culturas de longo termo. A análise em diferentes pontos do cultivo que alcançou 25 passagens, ou até a senescência das células, mostrou que não houve aparecimento de anormalidades cromossômicas, a atividade da telomerase e dos transcritos do gene hTERT não foram expressos e os telômeros sofreram encurtamento durante o período de cultivo.

### Hemoangioblastos

O estabelecimento de ilhas sanguíneas no saco vitelínico marca o início da hematopoese e da vasculogênese no desenvolvimento embrionário de camundongos; essas deri-

vam de agregados de células mesodermis e colonizam o saco vitelínico pós-fecundação. As células centrais no interior desses agregados originam as células hematopoéticas embrionárias, enquanto a população periférica se diferencia nas células endoteliais que formam as primeiras estruturas vasculares.<sup>29,30,31</sup> Esse desenvolvimento próximo entre a linhagem hematopoética que origina as células do sistema sanguíneo e da linhagem endotelial leva à hipótese de que elas derivam de um precursor ancestral comum, o hemoangioblasto.<sup>32,33</sup>

Em estudos *in vitro* identificou-se uma população de precursores embrionários com potencial para originar as linhagens hematopoética e endotelial. Esses precursores desenvolvem-se em uma mesma célula, denominada célula formadora de colônias de blastos (BL-CFC), a qual está presente logo no início do desenvolvimento do corpo embriãoide e persiste por um curto período precedendo o início da hematopoese e da vasculogênese.<sup>31</sup> As células CD133+ são originadas a partir da BL-CFC e preenchem muitos critérios, os quais caracterizam os verdadeiros hemoangioblastos.

### Células-tronco hematopoéticas

A expansão de CTH *in vitro* envolve o cultivo das células em suspensão na presença de meio e várias combinações de citocinas e fatores de crescimento. O aumento no número de CTH é especialmente útil para um melhor aproveitamento das amostras de SCUH criopreservadas. O baixo número de CTH obtidas se deve ao pequeno volume de sangue coletado, o que limita sua utilização para crianças ou adultos de baixo peso. A expansão *ex vivo* de CTH do SCUH tornaria esta importante fonte de células útil para aplicações também em adultos. Por isso, nas últimas duas décadas, numerosas tentativas têm sido realizadas para expandir CTH em cultura.<sup>34-38</sup>

Uma alternativa tem sido a realização da expansão *ex vivo* utilizando-se como substrato nanofibras com grupamentos amina conjugados à superfície.<sup>39</sup> As nanofibras parecem prover superfícies adesivas que promovem a expansão das CTH na presença do SCF, Flt-3 ligante, TPO e IL-3. Ao final de dez dias, os espaçadores de etileno e butileno mostraram alta eficiência de expansão, aumentaram em 200 e 235 vezes, respectivamente, o número de células CD34+, CD45+ com 95% de viabilidade e foram capazes de repovoar a medula de camundongos diabéticos não obesos e com imunodeficiência severa combinada NOD/SCID.

Outro estudo recente<sup>40</sup> demonstrou que um grupo de proteínas semelhantes à angiopoietina, especialmente a 5 (Angptl5), e o fator de crescimento de insulina ligante da proteína 2 (IGFBP2), quando associados a outros fatores, podem expandir CTH derivadas do SCUH em até vinte vezes e também repovoar a medula de camundongos NOD/SCID.

A expansão *in vitro* de células da linhagem eritroide pode ser uma alternativa devido à diminuição de doadores

de sangue ou no caso de pacientes de grupos sanguíneos raros. Vários ensaios têm sido realizados na intenção de produzir células vermelhas *in vitro*.<sup>41,43</sup> Baek e colaboradores<sup>43</sup> descreveram a geração *in vitro* de células eritroides derivadas de células CD34+ de SCUH. As células mononucleares foram selecionadas positivamente para o CD34+ e foram cultivadas, por uma semana, em meio livre de soro, suplementado, acrescido de fator de crescimento de células-tronco (SCF), interleucina 3 (IL-3) e eritropoietina (EPO) ou SCF, IL-3 e trombopoietina (TPO) mais o Flt-3 e posteriormente cocultivadas com CTM derivadas do SCUH e da medula óssea. Os melhores resultados foram obtidos no meio com EPO e no cocultivo com CTM do SCUH. As células CD34+ foram diferenciadas na linhagem eritroide e puderam ser expandidas em larga escala, fornecendo uma base sólida para futuras produções clínicas de células vermelhas para transfusão.

### Células progenitoras endoteliais

Até recentemente acreditava-se que a angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos, a partir daqueles pré-existentes<sup>44,45</sup> era a única forma de indução da neovascularização em tecidos isquêmicos. Evidências sugerem que a vasculogênese, que implica a diferenciação *in situ* dos hemoangioblastos em células endoteliais e sua subsequente organização em redes capilares primárias, não ocorre apenas no estágio embrionário. O estudo de Asahara e colaboradores,<sup>30</sup> em 1997, foi fundamental para demonstrar a vasculogênese pós-natal e a existência das células progenitoras endoteliais (CPE).

Estratégias terapêuticas promissoras são baseadas no conceito de que as CPE podem diferenciar-se em células semelhantes às endoteliais, contribuindo para os processos de reparo vascular.<sup>46</sup> Aproximadamente 0,01% das células mononucleares da medula óssea são CPE,<sup>47</sup> o número de CPE no sangue periférico é 500 vezes menor que na medula óssea<sup>48</sup> e no SCUH foram encontradas 0,64% de CPE.<sup>49</sup>

Em estudo pré-clínico de Kawamoto e colaboradores,<sup>50</sup> as CPE diferenciadas *in vitro* e infundidas na área isquêmica de ratos com enfarte agudo do miocárdio foram detectadas na área de neovascularização em estudos histológicos pós-eutanásia. Demonstrou-se que essas células não participam apenas da indução de fatores parácrinos, os quais estimulariam a proliferação de células presentes *in situ*, mas sim fisicamente da reconstrução da área lesada. Estudo similar foi realizado por Kalka e colaboradores<sup>51</sup> em um modelo de ratos com isquemia de membro inferior, também apresentando melhora nos animais que receberam as CPE expandidas.

Até o presente, o transplante de CPE derivadas do SCUH ainda encontra-se na fase de experimentos pré-clínicos.<sup>3</sup> A exata população de CPE (purificadas ou diferenciadas) que seria mais adequada para o uso na terapia celular ainda não está definida. Em modelos animais, ambos os tipos

têm se mostrado efetivos na melhora da neovascularização, como demonstrado pelos experimentos de Melero-Martin e colaboradores.<sup>52</sup>

Estudos recentes têm demonstrado que as propriedades diferentes das CTM e das CPE podem ser combinadas para obtenção de um resultado melhor no tratamento de cardiomiopatias. Ensaios pré-clínicos em ratos utilizando a coinfusão das CTM e das CPE mostraram um aumento na expressão de fatores angiogênicos e menor deposição de colágeno, poucas células em apoptose e uma melhora regional do fluxo sanguíneo quando comparados ao grupo controle, sugerindo que o transplante combinado destas células deve ser considerado para melhora da função cardíaca.<sup>53</sup>

### Transplantes alogênicos

Têm sido relatados estudos utilizando a infusão de CTM através da barreira alogeneica e xenogeneica, apresentando algum tipo de recuperação. Estes resultados foram alcançados sem imunossupressão e sem evidências de infiltrados celulares que indicariam resposta imune.<sup>54-56</sup>

Cho e colaboradores<sup>57</sup> demonstraram em um experimento com miniporcos, com o complexo principal de histocompatibilidade (CPH) definido, a imunogenicidade das CTM de SCUH. A conclusão do estudo é que uma única infusão de células não compatíveis para o complexo principal de histocompatibilidade não induz a uma resposta imune detectável. No entanto, estas células são imunogênicas quando a infusão é realizada em uma região de inflamação, ou são realizadas infusões repetidas em uma mesma região, ou ainda quando estimuladas com o interferon gama (IFN- $\gamma$ ); antes da infusão estas células são imunogênicas. Como algumas vezes estratégias de terapia celular envolvem a infusão de células em regiões de inflamação, ou repetidas doses, estes resultados podem ter implicações importantes para se alcançarem bons resultados sem efeitos deletérios. Estudos mais aprofundados com as CTM e outros tipos de células expandidas em cultivo precisam ser realizados com o objetivo de garantir a segurança da terapia celular alogênica para que futuramente seu uso clínico seja consolidado.

### Abstract

*Stem/progenitor cells are not frequently available in large enough amounts to repair damaged tissues and organs and so in vitro expansion is necessary. Appropriate facilities, qualified technicians, clinical-grade reagents and well defined protocols relating to good manufacturing products are essential to assure the quality and security of the cells injected in the patient. Bone marrow and human umbilical cord blood are still the best sources of cells for therapies. Successful expansion protocols using hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have already been used in clinical and pre-clinical trials. Adequate cell choice should consider the extent of injury or nature of the damaged*

tissue and the desired therapeutic effect. Recent studies have demonstrated that properties of different *in vitro* expanded cells can be combined aiming to improve the outcome of the treatment of some diseases. Long-term cell cultures need to be followed up by classical and molecular cytogenetic techniques to demonstrate that there is no evidence of spontaneous transformation or signs of immortalization. Assays using expanded cell infusions across both xenogeneic and allogeneic transplant barriers showed functional improvement and were achieved without immunosuppression and without evidence of a cellular infiltrate that would indicate an immune response. However, more research needs to be performed to evaluate the immunogenicity of these cells and to guarantee the safety of allogeneic cell therapy, allowing consolidation of their clinical use. Here, we present an update regarding cellular expansion associated with their clinical use. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*

**Key words:** Stem cell; bone marrow; cord blood.

### Referências Bibliográficas

- Wagner JE, Verfaillie CM. Ex vivo expansion of umbilical cord blood hemopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol.* 2004; 32(5):412-3.
- Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee Jw. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957;257(11):491-6.
- Zhang L, Yang R, Han ZC. Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells: a promising method of therapeutic revascularization. *Eur J Haematol.* 2006; 76(1):1-8.
- Couffinhal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witzenbichler B, Magner M, et al. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Circulation.* 1999;99(24):3188-98.
- Van Belle E, Rivard A, Chen D, Silver M, Bunting S, Ferrara N, et al. Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines. *Circulation.* 1997;96(8):2667-74.
- Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation.* 1999; 99(1):111-20.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989;321(17):1174-8.
- Verter. <http://parentsguidecordblood.org>
- Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med.* 2000;342(25):1846-54.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. 1999;284(5411):143-7.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(13):8932-7.
- Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy.* 2006;8(6):559-61.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest.* 1999;103(5):697-705.
- Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004;32(5):414-25.
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001;98(8):2396-402.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006;24(5):1294-301.
- Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233(7):901-13.
- Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 2002;30(8):870-8.
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371(9624):1579-86.
- Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. Cotransplantation of *ex vivo* expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2007;110(7):2764-7.
- Lepperdinger G, Brunauer R, Jannig A, et al. Controversial Issue: Is it safe employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Exp. Geront.* 2008; doi:10.1016/j.exger.2008.07.004 on line published.
- Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! All that glitters is not gold! *Stem Cells.* 2007; 25(7):1603-9.
- Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion.* 2007;47(8):1436-46.
- Zhou YF, Bosch-Marce M, Okuyama H, Krishnamachary B, Kimura H, Zhang L, et al. Spontaneous transformation of cultured mouse bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res.* 2006; 66(22):10849-54.
- Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells.* 2006;24(4):1095-103.
- Aguiar S, Nye E, Chan J, Loebinger M, Spencer-Dene B, Fisk N, et al. Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem Cells.* 2007;25(6):1586-94.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005;65(8):3035-9.
- Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem

- cells do not undergo transformation after long-term *in vitro* culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res.* 2007;67(19):9142-9.
29. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, *et al.* Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis *in vivo*. *Circulation.* 1995;92(9 Suppl):II365-71.
  30. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7.
  31. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 1998;125(4):725-32.
  32. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:73-91.
  33. Sabin FR. Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick. *Anat. Rec.* 1917;13(4):199-204.
  34. Gammaitoni L, Weisel KC, Gunetti M, Wu KD, Bruno S, Pinelli S, *et al.* Elevated telomerase activity and minimal telomere loss in cord blood long-term cultures with extensive stem cell replication. *Blood.* 2004;103(12):4440-8.
  35. Summers YJ, Heyworth CM, de Wynter EA, Hart CA, Chang J, Testa NG. AC133+ G0 cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and a capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells *in vitro*. *Stem Cells.* 2004;22(5):704-15.
  36. Araki H, Mahmud N, Milhem M, Nunez R, Xu M, Beam CA, Hoffman R. Expansion of human umbilical cord blood SCID-repopulating cells using chromatin-modifying agents. *Exp Hematol.* 2006;34(2):140-9.
  37. Suzuki T, Yokoyama Y, Kumano K, Takanashi M, Kozuma S, Takato T, *et al.* Highly efficient *ex vivo* expansion of human hematopoietic stem cells using Delta-1-Fc chimeric protein. *Stem Cells.* 2006;24(11):2456-65.
  38. Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, Izac B, Charneau P, Romeo PH, *et al.* *Ex vivo* expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med.* 2003;9(11):1423-7.
  39. Chua KN, Chai C, Lee PC, Ramakrishna S, Leong KW, Mao HQ. Functional nanofiber scaffolds with different spacers modulate adhesion and expansion of cryopreserved umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol.* 2007;35(5):771-81.
  40. Zhang CC, Kaba M, Iizuka S, Huynh H, Lodish HF. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate *ex vivo* expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood.* 2008;111(7):3415-23.
  41. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, *et al.* *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2005;23(1):69-74.
  42. Loeuillet C, Bernard G, Rémy-Martin J, Saas P, Hervé P, Douay L, *et al.* Distinct hematopoietic support by two human stromal cell lines. *Exp Hematol.* 2001;29(6):736-45.
  43. Baek EJ, Kim HS, Kim S, *et al.* *In vitro* clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34+ cells. *Transfusion.* 2008; publicado on line 31 de julho.
  44. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85(3):221-8.
  45. Chachques JC, Duarte F, Herreros J, Prosper F, Giambroni R, Julia P, *et al.* Cellular myogenic and angiogenic therapy for patients with cardiac or limb ischemia. *Basic. Appl. Myol.* 2003; 13(1): 29-37.
  46. Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin KM, *et al.* Endothelial progenitor cell culture and differentiation *in vitro*: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res.* 2003;58(2):478-86.
  47. Gross P, Herbrig K. Role of endothelial progenitor cells in cardiovascular pathology. *Rocz Akad Med Bialymst.* 2004;49:174-7.
  48. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, *et al.* Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002;360(9331):427-35.
  49. Senegaglia AC, Brofman PRS, Aita CAM. Células progenitoras endoteliais de sangue de cordão umbilical humano: purificação, expansão e diferenciação [Tese de doutorado]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2007. 125p.
  50. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, *et al.* Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation.* 2001;103(5):634-7.
  51. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, *et al.* Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(7):3422-7.
  52. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. *In vivo* vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood.* 2007;109(11):4761-8.
  53. Zhang X, Wei M, Zhu W, Han B. Combined transplantation of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells into a rat model of isoproterenol-induced myocardial injury. *Arch Cardiovasc Dis.* 2008;101(5):333-42.
  54. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev.* 2005;85(4):1373-416.
  55. Zimmet JM, Hare JM. Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol.* 2005;100(6):471-81.
  56. Odeberg J, Piao JH, Samuelsson EB, Falci S, Akesson E. Low immunogenicity of *in vitro*-expanded human neural cells despite high MHC expression. *J Neuroimmunol.* 2005;161(1-2):1-11.
  57. Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, *et al.* Immunogenicity of umbilical cord tissue-derived cells. *Blood.* 2008;111:430-438.
- Avaliação: O tema apresentado consta da pauta elaborada pelo editor, Professor Milton Artur Ruiz, e coeditores deste suplemento, Professores Sergio Paulo Bydlowski e Adriana Seber.
- Conflito de interesse: não declarado
- Recebido: 03/10/2008  
Aceito: 08/10/2008

## ANEXO E – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA

ORIGINAL ARTICLE

Rev Bras Cir Cardiovasc 2008; 23(4): 467-473

## In vitro formation of capillary tubules from human umbilical cord blood cells with perspectives for therapeutic application

*Formação in vitro de túbulos capilares a partir de células de sangue de cordão umbilical humano com perspectivas para aplicação terapêutica*

Alexandra Cristina SENEGAGLIA<sup>1</sup>, Paulo Roberto Slud BROFMAN<sup>1</sup>, Carlos Alberto Mayora AITA<sup>1</sup>, Bruno DALLAGIOVANNA<sup>2</sup>, Carmen Lúcia Kuniyoshi REBELATTO<sup>1</sup>, Paula HANSEN<sup>3</sup>, Fabiane BARCHIKI<sup>4</sup>, Marco Aurélio KRIEGER<sup>2</sup>

RBCCV 44205-1018

### Abstract

**Objective:** Endothelial progenitor cells (EPC) characterized by the CD133+ marker contribute to neovascularization. Increasing EPC number in vitro could be a promising therapeutic tool. Human umbilical cord blood maintains a significant number of EPCs, suggesting the possibility of using these cells to induce revascularization of ischemic tissues. The aim of this study was to analyze the in-vitro function of differentiated CD133+ cells.

**Methods:** Cells were characterized by flow cytometry; VEGF mRNA expression was evaluated by RT-PCR analysis and the functionality by essays of capillary tubes formation.

**Results:** Differentiated cells lost EPC markers, maintained low levels of markers for hematopoietic and monocytic cell lines and increased the expression of adult endothelial cell markers. Differentiated cells expressed VEGF mRNA and were capable to induce in vitro capillary tubules formation.

**Conclusion:** CD133+ cells differentiated into endothelial

cells in vitro are functionally active initiating the possibility of their use in future therapeutic applications.

**Descriptors:** Endothelial cells. Cell proliferation. Cord blood stem cell transplantation. Neovascularization, physiologic.

### Resumo

**Objetivo:** As células progenitoras endoteliais (CPE), caracterizadas pelo marcador CD133+, contribuem para a neovascularização, e o aumento no número dessas células pode ser uma ferramenta terapêutica promissora. O sangue de cordão umbilical humano contém um número significativo de CPE, sugerindo a possibilidade do uso destas células para a revascularização de tecidos isquêmicos. O objetivo desse trabalho foi analisar a funcionalidade das células CD133+ diferenciadas *in vitro*.

**Métodos:** As células diferenciadas foram caracterizadas

1. Ph.D – Center of Cellular Cardiomyoplasty - Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR)
2. Ph.D – Carlos Chagas Institute - FIOCRUZ
3. Biologist Graduate Student, Ph.D Student in Health Sciences - Center of Cellular Cardiomyoplasty - Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR)
4. Biologist Graduate Student - Center of Cellular Cardiomyoplasty - Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR)

This study was carried out at the Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR)

### Correspondence address:

Paulo Roberto Slud Brofman - Rua Gumercindo Mares, 150 - casa 12 - Vista Alegre. Curitiba - PR CEP 80810220. Phone: 55 41 33234926. Fax: 55 41 33234926. E-mail: paulo.brofman@pucpr.br

Article received on January 30<sup>th</sup>, 2008  
Article accepted on September 23<sup>rd</sup>, 2008

por citometria de fluxo; a expressão do mRNA de VEGF foi avaliada por RT-PCR e a funcionalidade, por meio de ensaios de formação de túbulos capilares.

**Resultados:** As células diferenciadas perderam os marcadores de CPE, mantiveram em níveis baixos os marcadores das linhagens hematopoética e monocíticas e aumentaram a expressão dos marcadores de células endoteliais adultas. As células diferenciadas apresentaram transcritos no mRNA de VEGF e mostraram-se capazes de formar túbulos capilares *in vitro*.

**Conclusão:** As células CD133+ diferenciadas *in vitro* em células endoteliais demonstraram serem funcionalmente ativas, abrindo perspectiva para seu uso futuro em aplicações terapêuticas.

**Descritores:** Células endoteliais. Proliferação de células. Transplante de células-tronco de sangue do cordão umbilical. Neovascularização Fisiológica.

## INTRODUCTION

Research about stem cells (SC) has been continually increasing, and there are promising results for recovering injured tissues, including those of the heart [1,2]. However, the lack of sufficient vasculature (which allows for a fast and appropriate supply of cells infused with oxygen and nutrients) is still a limiting factor for the success of the establishment of tissue engineering and for ischemic tissue treatment [3].

There are currently three types of clinical conditions that could benefit from endothelial progenitor cell (EPC) transplantation: lower limb ischemia, myocardial ischemia, and scarring after heart attacks. Studies have indicated that cell therapy using cells expanded *in vitro* could promote neovascularization of ischemic tissues, even when applied as a single therapy; that is, without the administration of growth factors [4-6].

A critical limitation of the therapeutic approach with EPCs in the postnatal period is the low number of such cells in circulation. Several studies have been performed in order to optimize the quantity and quality of these cells available for clinical use [4]. Due to the small quantities of EPCs found in peripheral blood, these cells are not readily available for use in clinical trials. Research on the increase of the functional EPC amount may become important.

After myocardial infarction, natural angiogenesis is normally insufficient in meeting the great oxygen and nutrient demands and in preventing apoptosis of hypertrophic cardiomyocytes and ventricular remodeling. Thus, the increase in infarcted myocardium perfusion in order to improve the circulation of oxygen and nutrients by formation of new blood vessels can potentially improve cardiac function [7].

The potential mechanisms for EPCs to induce neovascularization include an increase in the supply of endothelial cells (ECs) through proliferation and EPC differentiation, or an increase in the supply of growth factors to enable the resident mature endothelial cells (ECs). EPCs are CD133+ cells, and most of them co-express CD34+ (only a small percentage is CD34-). Thus, the CD133+ cells represent a subset of CD34+ SC, and are the best

population for generating ECs [8]. Sant'anna et al. [9] report on increasing capillaries through gene therapy using a transmural injection of plasmid encoding VEGF 165, which leads to supposed benefits in the reduction and recovery of the ischemic area.

It has already been shown that the human umbilical cord blood (HUCB) contains mesenchymal stem cells [10] and a large number of EPCs [11], suggesting the possibility of using these cells for the revascularization of ischemic diseases. At this point, EPC transplantation derived from HUCBs is still undergoing experiments with animals. The exact population of specific EPCs (isolated, expanded or differentiated) that should be used for transplant has not yet been clearly defined [12].

We have implemented methods to differentiate CD133+ cells *in vitro* if they have been derived from HUCBs, producing a population similar to the endothelial cells that were assessed in order to prove whether they were functionally active, thus making its future clinical use possible.

## METHODS

The experiments were performed at the Experimental Laboratory of Cell Culture – PUCPR, and the Paraná Molecular Biology Institute, with five samples of human umbilical cord blood (HUCB) obtained from the Victor Ferreira do Amaral Maternity Hospital - Curitiba/PR from five participants, who, after receiving all necessary information, signed the written informed consent and agreed to participate in the study. The Research Ethics Committee - Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) approved this study (number 1366) and it is registered at the Brazilian Research Ethics Commission (CONEP) under title page No. 105806.

### Criteria for inclusion of pregnant women donors of HUCBs

- Age: 18 to 36 years;
- Recorded prenatal care with at least two consultations;
- Vaginal delivery or Caesarean section;
- Time of amniotic membrane rupture of up to 18 hours;



Parturitions at at least 32 weeks;

Newborn weight of at least 1,500 grams;

Pregnant women without risk behaviors such as drug use, sexual promiscuity, infectious diseases such as hepatitis, sexually transmitted diseases, Chaga's disease or Malaria;

Pregnant women without diseases that may interfere with the placenta's vitality, such as diabetes or hypertension;

Pregnant women who do not use antidepressant drugs, corticoids, anxiolytics or hormones in general.

#### **Purification and expansion of CD133+ cells**

The CD133+ cells were purified using the CD133 MicroBead kit (Miltenyi Biotec ®) linked to anti-CD133 antibody, according to the manufacturer's instructions. The suspension of mononuclear cells (MC) was briefly centrifuged and resuspended in phosphate buffered saline (PBS) (Invitrogen Life Technologies®) supplemented with 5% fetal bovine serum and 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The cells were then filtered (40 µm porosity) and centrifuged for 10 minutes at 450 g. The cell concentration was adjusted to  $1 \times 10^8$  cells (at maximum) in 300 µL of supplemented PBS. We added 100 µm of blocking solution (Miltenyi Biotec ®) and 100 µm of anti-CD133 antibody (pure) linked to magnetic microBeads (Miltenyi Biotec ®). The material was homogeneized and incubated for 30 minutes at 4 C°.

The EPCs resulting from the purification of the MC from HUCB were plated on 12 well-plates covered with fibronectin (BD-Bioscience ®) in supplemented IMDM medium and growth factors (b-FGF) (Invitrogen Life Technologies®), IGF-I (Sigma-Aldrich ®) and VEGF (Sigma-Aldrich ®). After five days of cultivation, the medium was exchanged for the first time and then exchanged again every two days after that. The cultures were kept in a stove, with 5% of CO<sup>2</sup> tension in humid atmosphere. The cells were observed daily using an inverted optical microscope (Olympus IX70 ®) to study their morphology and proliferation. When the cells reached approximately 80% confluence, the cell decoupling was performed using the Acutase enzyme. First the cells were separated from the plates and plated again in cultivation bottles of 25 cm<sup>2</sup> (TPP®), and then separated into two bottles in geometric progression until the 30<sup>th</sup> day of cultivation.

#### **Cell characterization by flow cytometry**

The characterization, quantification and analysis of the viability of purified and differentiated CD133 + cells were performed using the flow cytometry technique with specific antibodies. The purified cells were analyzed immediately after their isolation, and the differentiated cells were

analyzed 30 days after cell dissociation. The technique was performed following Owens et al.<sup>13</sup>.

The marking was performed with  $2 \times 10^5$  cells that were incubated with various conjugated antibodies and fluorochromes. Isotypes identical to antibodies were used as controls. The acquisition of samples was performed using the FACSCalibur flow cytometer (BD, USA). FlowJo software (FlowJo, USA) was used to perform the analysis.

#### **Tests for evaluating the functionality of the expanded and differentiated cells**

##### *Analysis of the VEGF mRNA transcribed expression using RT-PCR*

The ribonucleic acid (RNA) of all of the CD133 + purified and differentiated cells was extracted using the RNeasy reagent kit (Qiagen), and following the manufacturer's recommendations. Then synthesis of complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) was performed.

The transcripts that encode for the VEGF were amplified by a polymerase chain reaction with reverse transcriptase (RT-PCR) using the cDNA and VEGF primer pair (F1 5CTACCTCCACCATGCCAAGTG3 R1 5TGCGCTGATAGAACATCCATGA3).

The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a constituent and stable gene expressed at high levels in nearly all tissues and cells, and was used as internal control. The amplification products were stained and analyzed by agarose gel electrophoresis at 2%, and the molecular weight marker (1KB Plus) (Invitrogen Life Technologies ®) was used. The images were captured by *UV Darkroom* (UVP Bioimaging Systems ®), with the Labworks analysis software.

##### *Test of capillary tubules formation in vitro*

At the end of 30 days of cultivation, the differentiated CD133+ cells were separated and seeded in 24 well-plates covered with 250 µL of Matrigel™ (BD-Biosciences ®). The cell density was 20,000 cells in 250 µL of supplemented IMDM and growth factors. The cells were incubated in a humidified stove with a tension of 5%, CO<sup>2</sup>, and were observed at two, six, twelve and twenty-four hours using an inverted microscope (Olympus IX 70), to verify the formation of capillary tubules in order to prove their in vitro functional capacity. During the examination of cells under the microscope, the images were obtained through the image capture system Spot Insight (Diagnostic).

## **RESULTS**

#### **Cell characterization by flow cytometry**

The purified CD133+ cells were immunophenotypically evaluated after isolation with immunomagnetic microbeads

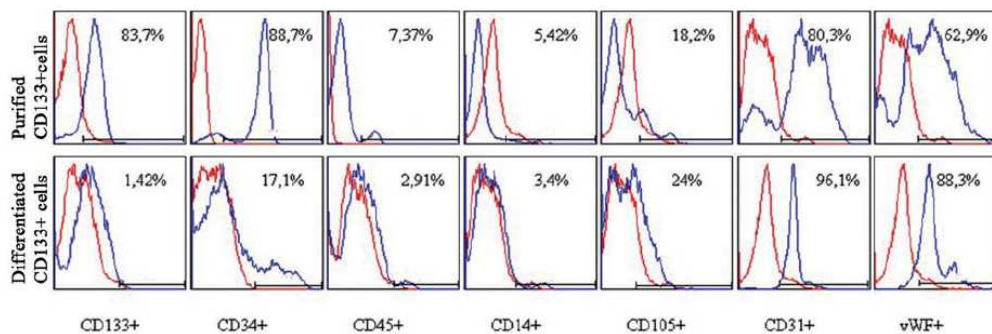


Fig. 1 - Phenotypic characterization by flow cytometry of purified and differentiated CD133 + cells. Cells were marked with anti-CD133, CD34, CD45, CD14, CD105, CD31 and vWF fluorescent human antibodies. Blue histograms identify the percentage of positive cells for each antibody and red histograms identify the isotype controls (negative)

coupled to anti-CD133 antibody and the differentiated cells after enzymatic dissociation at the end of the 30-day cultivation (results represented in Figure 1). Thus, it was possible to characterize each of these cell types independently.

#### Analysis of VEGF mRNA transcribed expression using RT-PCR

The analysis of VEGF mRNA expression was performed in purified and differentiated CD133+ cells by RT-PCR in five samples. The GAPDH expression was evaluated as internal control, which presented bands for the ten samples. In the purified cells, the presence of transcripts for VEGF mRNA was not verified. Transcriptions for VEGF in all analyzed differentiated cells (Figure 2) were noted. It was shown that only the cells after induction of differentiation began to express the VEGF mRNA transcripts.

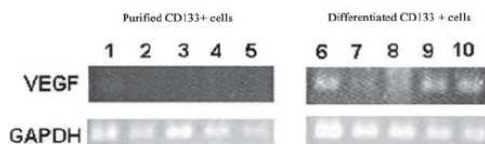


Fig. 2 - Agarose gel of the products of RT-PCR for VEGF and GAPDH. Samples 1 to 5: Purified CD133+ cells; samples 6 to 10: differentiated CD133+ cells

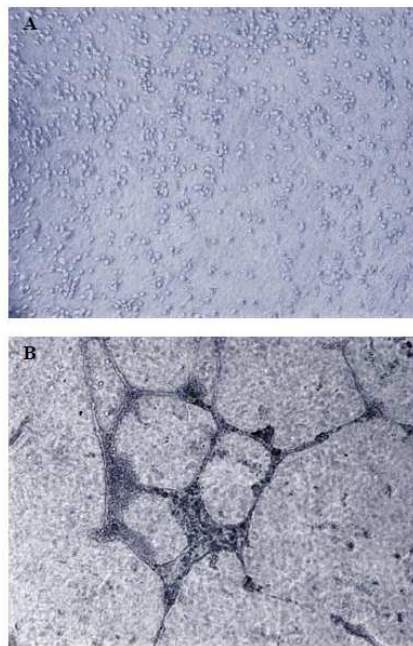


Fig. 3 - Test of capillary tubules formation of CD133+ cells differentiated in vitro. Photomicrography of: (A) cells immediately after plating, presenting rounded morphology and randomly scattered on the surface; (B) cells after 24 hours, showing structures similar to well-formed capillary tubules

#### Test of in vitro capillary tubule formation

To evaluate the function of differentiated CD133+ cells, the in vitro capacity of these cells to form capillary tubules when plated on Matrigel<sup>TM</sup> was tested. The cells were analyzed and photographed at two, six, twelve and twenty-four hours after plating. The analysis showed that, immediately after plating, the cells had rounded morphology and were randomly scattered on the surface without capillary tubule formation (Figure 3A). And, after 24 hours, they formed tubular structures similar to well-formed capillaries (Figure 3B). In all five experiments (independently performed, and each after 24 hours), the differentiated cells formed capillary tubules in vitro.

#### DISCUSSION

Apart from the source, EPCs are difficult to isolate because they represent a very small population when compared with the hematopoietic cells. In peripheral blood, only 0.01% of MCs are EPCs [14]. In bone marrow, less than 0.05% of the cells are EPCs [15]. In previous studies from the authors of this study [16], it was possible to obtain 0.64% of isolated EPCs from HUCB-MC, showing that the HUCB can be a better option as a source of EPCs. This finding is similar to that concluded by Eggermman et al. [15], who showed that the number of EPCs from HUCBs is higher than that found in adult peripheral blood. The exact number of cells needed to successfully induce neovascularization is still uncertain [17]. The possibility of obtaining a greater number of cells may inspire other researchers to complete new testing to determine the more appropriate number of cells needed for this type of therapy.

The cells had their phenotype characterized by flow cytometry. When the cells reached confluence around four weeks, the CD133+ cells were similar to the typical EC phenotype and increased positivity for markers (characteristics for such cells), such as CD31 and vWF [18]. There was a decrease in CD34+ cells. However, some of these cells still remained, according to studies from Gross et al. [14]. Such results also occurred with CD105. There was a significant decrease in CD133 cells, as described by Shmelkov et al. [19]. The number of CD45 and CD14 cells - from hematopoietic and monocytes lines, respectively - was not representative.

The RT-PCR technique clearly showed the presence of VEGF-mRNA transcripts in all five experiments independently performed with differentiated CD133+ cells. It is known that VEGF is decisive in neovascularization function due to its potent mitogenic property for ECs, promoting migration and proliferation of these cells. It also contributes to the remodeling of the extracellular matrix, as well as the formation of capillary tubules and the vascular network [20]. The verification of the presence of VEGF

mRNA transcripts is important for confirming that only the EPCs differentiated in vitro possess characteristics that can confirm that such cells are similar to adult EC.

Functional testing through tubular formation on Matrigel<sup>TM</sup> showed that the CD133+ cells differentiated in vitro present a formation of structures similar to capillaries, providing additional evidence that the cells proliferated and gave origin to cells similar to endothelial cells. The capacity of cell migration is essential for forming new vessels and capillaries, and it is a characteristic of ECs that are capable of an organization resulting in formation of three-dimensional in-vitro tubular structures [21].

In terms of the functionality of differentiated CD133+ cells, the results seem to be in accordance with a pre-clinical study of Kawamoto et al. [22]. In this study, the EPC differentiated in vitro infused in the ischemic area of rats with acute myocardial infarction were found (through postethanasia histological study) in the area of neovascularization. It was shown that these cells not only participate in the induction of paracrine factors - which may stimulate the proliferation of *in situ* cells - but also in the physical reconstruction of the lesioned area. In another study, Mukai et al. [23] confirmed the findings of this study, showing that cultivated EPCs could form blood vessels, unlike from EPCs without cultivation, which would promote angiogenesis through the migration and proliferation of mature ECs, suggesting that these two cell populations would have a different role in *in vivo* neovascularization.

According to Rocha et al. [24], the cells derived from HUCBs are not very immunogenic, which would allow for their use in allogeneic transplant. There is a need for further studies to confirm whether the EPCs differentiated in vitro have HLA antigen expression or not, and what their expression intensity. Even if these cells do not present HLA antigens, other histocompatibility tests must be performed in an attempt to prove whether the EPCs differentiated in vitro trigger an allogeneic immune response. In a study with mesenchymal cells, Cho et al. [25] described that allogeneic mesenchymal cells do not trigger an immune response in normal tissue, but in regions of inflammation; i.e., in the presence of cytokines such as IFN- $\gamma$ , where rejection can occur. Based on this information, there may be a more solid basis to make viable the use of the differentiated EPCs derived from HUCBs in clinical trials.

The use of EPCs derived from HUCBs can serve as a useful strategy in the study of the nature of these cells before using them in clinical trials. EPCs can be obtained and expanded from HUCBs, and also used for several functions, such as *ex vivo* expansion of cells similar to ECs for cellular and gene therapy, or, according to Quirici et al. [26], in *in vitro* co-cultures that can provide new perspectives for the treatment of ischemic heart disease. The results obtained by Melero-Martin et al. [27] reaffirm

the *in vivo* therapeutic potential of EPCs to form vascular networks that allow for the vascularization of ischemic tissues and organs.

The performed tests showed that the CD133+ cells differentiated *in vitro* are similar to ECs in terms of functionality and their potential use in therapeutic applications hereafter .

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Alessandra Melo Aguiar and Patricia Shigunov for performing the molecular biology techniques; to Dr. Vivian Ferreira do Amaral for coordinating the collection of human umbilical cord blood; to Márcia Olandoski for statistical analysis, and to Dr. Alejandro Correa for critical analysis of this study.

This study was supported by the Ministry of Health and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) - 552233/2005-06.

#### REFERENCES

- Schwartz Y, Kornowski R. Progenitor and embryonic stem cell transplantation for myocardial angiogenesis and functional restoration. *Eur Heart J*. 2003;24(5):404-11.
- Scorsin M, Guarita-Souza LC. O transplante celular no tratamento da insuficiência cardíaca. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2001;16(3):183-6.
- Fuchs S, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ. Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. *Cell Tissue Res*. 2006;326(1):79-92.
- Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med*. 2004;8(4):488-97.
- Dallan LAO, Gowdak LH, Lisboa LAF, Schettert I, Krieger JE, Cesar LAM, et al. Terapia celular associada à revascularização transmiocárdica laser como proposta no tratamento da angina refratária. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(1):43-52.
- Almeida RMS. Carta ao editor: Terapia celular associada à revascularização transmiocárdica a laser: uma nova proposta no tratamento da angina refratária aos métodos terapêuticos. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(2):292-4.
- Lee MS, Lill M, Makkar RR. Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med*. 2004;5(2):82-98.
- Chachques JC, Duarte F, Herreros J, Prosper F, Giamboni R, Julia P, et al. Cellular myogenic and angiogenic therapy for patients with cardiac or limb ischemia. *Basic Appl Myol*. 2003;13(1):29-37.
- Sant'Anna RT, Kalil RAK, Moreno P, Anflor LC, Correa DLC, Ludwig R, et al. Gene therapy with VEGF 165 for angiogenesis in experimental acute myocardial infarction. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2003;18(2):142-7.
- Kawasaki-Oyama RS, Braile DM, Caldas HC, Leal JCF, Goloni-Bertollo EM, Pavarino-Bertelli EC, et al. Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008; 23(1):29-34.
- Nieda M, Nicol A, Denning-Kendall P, Sweetenham J, Bradley B, Hows J. Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 1997;98(3):775-7.
- Zhang L, Yang R, Han ZC. Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells: a promising method of therapeutic revascularisation. *Eur J Haematol*. 2006;76(1):1-8.
- Owens M, Loken M. Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. Quality assurance for quantitative immunophenotyping. New York:Wiley-Liss;1995.
- Gross P, Herbrig K. Role of endothelial progenitor cells in cardiovascular pathology. *Rocz Akad Med Białymst*. 2004;49:174-7.
- Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin KM, et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation *in vitro*: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res* 2003;58(2):478-86.
- Senegaglia AC, Brofman PRS, Aita CAM. Células progenitoras endoteliais de sangue de cordão umbilical humano: purificação, expansão e diferenciação [Tese de doutorado]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná;2007. 125p.
- Zammaretti P, Zisch AH. Adult 'endothelial progenitor cells'. Renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(3):493-503.
- Hoyer LW. The factor VIII complex: structure and function. *Blood*. 1981;58(1):1-13.

SENEGAGLIA, AC ET AL - In vitro formation of capillary tubules from human umbilical cord blood cells with perspectives for therapeutic application

*Rev Bras Cir Cardiovasc* 2008; 23(4): 467-473

- 
19. Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, et al. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood*. 2004;103(6):2055-61.
20. Shen BQ, Lee DY, Cortopassi KM, Damico LA, Zioncheck TF. Vascular endothelial growth factor KDR receptor signaling potentiates tumor necrosis factor-induced tissue factor expression in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276(7):5281-6.
21. Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol*. 1985;101(6):2330-4.
22. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103(5):634-47.
23. Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, et al. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res*. 2008;314(3):430-40.
24. Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med*. 2000;342(25):1846-54.
25. Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, Chi N, Goldman SN, Lo DP, et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood*. 2008;111(1):430-8.
26. Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol*. 2001;115(1):186-94.
27. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. *In vivo* vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*. 2007; 109(11):4761-8.

## ANEXO F – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA

Biochemical and Biophysical Research Communications 378 (2009) 456–461



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents

Carmen K. Rebelatto<sup>a</sup>, Alessandra M. Aguiar<sup>b,c</sup>, Alexandra C. Senegaglia<sup>a</sup>, Carlos M. Aita<sup>d</sup>, Paula Hansen<sup>a</sup>, Fabiane Barchiki<sup>a</sup>, Crisciele Kuligovski<sup>b,c</sup>, Márcia Olandoski<sup>a</sup>, José A. Moutinho<sup>a</sup>, Bruno Dallagiovanna<sup>b,c</sup>, Samuel Goldenberg<sup>b,c</sup>, Paulo S. Brofman<sup>a</sup>, Lia S. Nakao<sup>d</sup>, Alejandro Correa<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Núcleo de Cardiomioplastia Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215-901, Brazil

<sup>b</sup>Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Rua Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba 81350-010, Brazil

<sup>c</sup>Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Rua Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba 81350-010, Brazil

<sup>d</sup>Núcleo de Investigação Molecular Avançada, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215-901, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 November 2008

Available online 24 November 2008

#### Keywords:

Mesenchymal stem cells

Nitric oxide

Differentiation

Muscle markers

VEGF

### ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) have received special attention for cardiomyoplasty because several studies have shown that they differentiate into cardiomyocytes both *in vitro* and *in vivo*. Nitric oxide (NO) is a free radical signaling molecule that regulates several differentiation processes including cardiomyogenesis. Here, we report an investigation of the effects of two NO agents (SNAP and DEA/NO), able to activate both cGMP-dependent and -independent pathways, on the cardiomyogenic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) and adipose tissue-derived stem cells (ADSCs). The cells were isolated, cultured and treated with NO agents. Cardiac- and muscle-specific gene expression was analyzed by indirect immunofluorescence, flow cytometry, RT-PCR and real-time PCR. We found that untreated (control) ADSCs and BM-MSCs expressed some muscle markers and NO-derived intermediates induce an increased expression of some cardiac function genes in BM-MSCs and ADSCs. Moreover, NO agents considerably increased the pro-angiogenic potential mostly of BM-MSCs as determined by VEGF mRNA levels.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Stem cell therapy shows great promise for regeneration of damaged myocardial tissue [1]. The functional outcomes in injured heart is improved by this treatment [2], possibly due to muscle tissue regeneration and induction of neovascularization [3].

Of the various types of adult stem cells, mesenchymal stem cells (MSCs) have received most attention for cardiomyoplasty. Indeed, several studies report that MSCs differentiate into cardiomyocyte *in vivo* [4–6]. However, MSCs are heterogeneous populations so their differentiation capacity raises concerns about uncontrolled differentiation in patients. *In vitro* MSC differentiation to cardiomyocyte-like phenotypes has been described following 5-azacytidine treatment [6,7], coculture with cardiomyocytes [8,9], growth in a cardiomyogenic medium containing insulin, dexamethasone and ascorbic acid [10], and in a conditioned medium of cardiomyocytes after hypoxia/reoxygenation [11].

Nitric oxide (NO) is a free radical signaling molecule [for a review, see 12]. NO and/or its metabolites induce several differenti-

ation processes [13–15], including cardiomyogenesis [16–18]. Treatment of embryonic stem (ES) cells with *S*-nitroso-*N*-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) or 2-(*N,N*-diethylamino)-diazene-2-oxide (DEA/NO), or the transduction with the iNOS gene increases both the number of spontaneously contracting cell clusters and the expression of cardiac myosin light chain (MLC) protein, an effect abolished by NOS inhibitors [16].

In view of (i) MSCs being multipotent cells able to differentiate into cardiomyocytes, (ii) NO being important in heart development and (iii) embryonic stem cells differentiating into cardiomyocytes after exposure to NO agents or endogenously produced NO, we investigated the effects of NO agents on cardiomyogenic differentiation of MSCs.

In particular, we investigated the effects of two NO agents (the nitrosothiol SNAP and the NO donor DEA/NO) on the cardiomyogenic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) and adipose tissue-derived stem cells (ADSCs). We report that exposure to these compounds induced an increased expression of some muscle genes and vascular endothelial growth factor (VEGF). The low expression of muscle markers and the considerable induction of VEGF suggest that, rather than a direct differentiation to the cardiac phenotype, MSCs treated with NO

\* Corresponding author. Address: Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Rua Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba 81350-010, Brazil. Fax: +55 41 3316 3267.

E-mail addresses: [alejandro@teepar.br](mailto:alejandro@teepar.br), [alejandrocroreadominguez@gmail.com](mailto:alejandrocroreadominguez@gmail.com) (A. Correa).

agents may improve cardiac function acting pro-angiogenically, possibly through paracrine signaling.

## Materials and methods

**Isolation, culture and characterization of adherent cells from BM and AT.** Human bone marrow (BM) was obtained from the iliac crest of ten patients, aged between 40 and 74 years ( $60.4 \pm 9.9$ ) and suffering from dilated cardiomyopathy. Subcutaneous abdominal adipose tissue (AT) was obtained from ten patients, aged between 19 and 60 years ( $38.0 \pm 12.6$ ), undergoing elective bariatric surgery and dermolipectomy procedures.

Adherent cells were obtained from BM and AT, cultured and characterized as described by Rebelatto and colleagues [19]. All samples were collected after informed consent following guidelines on research involving human subjects, as approved by the Ethics Committee of Pontifícia Universidade Católica de Paraná (approval number 597).

**Cell treatment with NO agents.** To explore whether NO promoted the differentiation of BM-MSCs and ADSCs into cardiomyocytes or cardiomyocyte-like cells, BM-MSCs and ADSCs biological replicates were exposed to NO by exogenous supplementation of *S*-nitroso-*N*-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) (Calbiochem, CA, USA) and 2-(*N,N*-diethylamino)-diazene-2-oxide (DEA/NO) (Calbiochem, CA, USA). Confluent cultures of BM-MSCs and ADSCs maintained in 5% fetal calf serum (FCS) were exposed to NO by exogenous supplementation with 0.4 mM SNAP and 0.1  $\mu$ M DEA/NO. NO agents were added to cell cultures on day 0, replaced on day 2 and maintained until day 4. Thereafter, cultures were continued in medium without NO agents. Medium was replenished every 2 days until day 20 [41, modified]. After 20 days, BM-MSCs and ADSCs were analyzed for cardiac and muscular-specific gene expression by indirect immunofluorescence, flow cytometry, RT-PCR and real-time PCR. Non-induced cell cultures were used as negative controls. Treatments were performed in biological triplicate.

**Flow cytometry.** BM-MSCs and ADSCs were basically treated as previously described [19, modified]. Briefly, cells were stained with the following anti-human monoclonal antibodies: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD44; phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD34; allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD29; and peridinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated anti-CD45. All antibodies were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). For intracellular staining, cells were first permeabilized with the Fix&Perm Cell permeabilization kit (Caltag Laboratories, CA, USA) and incubated separately with the following primary anti-human anti-

bodies: anti-cardiac troponin T (1/100), anti-ventricular myosin heavy chain (VMHC) (1/10) (both from Chemicon International, CA, USA), anti-myosin (skeletal, slow) (1/2000) (Sigma-Aldrich, MO, USA), anti-cardiac (fetal) actin (1/10) (Fitzgerald, MA, USA) and anti-connexin-43 (1/20) (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA). The cells were washed then stained with a secondary goat anti-mouse IgG (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA). Controls for the flow cytometry setup procedure included cells incubated with FITC-, PE-, PerCP- and APC-conjugated isotype antibodies (all from BD Biosciences Pharmingen). Cytometric evaluation was performed in FACSCalibur equipment (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Data were analyzed by FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Results are expressed as the ratio between immunopositive treated and immunopositive untreated cells. Values are the mean of two independent experiments.

**Indirect immunofluorescence.** For indirect immunofluorescence analysis, BM-MSCs and ADSCs were treated as previously described [20]. In brief, treated and untreated cells were washed with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde for 2 h and permeabilized with 0.2% Triton X-100. After blocking with 1% BSA, the cells were incubated for 3 h at room temperature with primary mouse anti-human cardiac troponin T (1/100) (Chemicon International, CA, USA), VMHC (1/10) (Chemicon), cardiac (fetal) actin (1/10) (Fitzgerald, MA, USA),  $\alpha$ -actinin (sarcomeric) (1/250) (Sigma-Aldrich, MI, USA), myosin (skeletal, slow) (1/2000) (Sigma-Aldrich), connexin-43 (1/20) (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA); goat anti-human troponin I (1/50) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and rabbit anti-human desmin (1/10) (Sigma-Aldrich). The cells were incubated with secondary antibodies: rabbit anti-goat IgG Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) at dilution 1:100, goat anti-rabbit IgG at dilution 1:100 and goat anti-mouse IgG Texas Red at dilution 1:1500 both from Molecular Probes (Oregon, USA). Nuclei were counterstained by 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Slides were examined on a Nikon E-600 microscope. Reaction controls involved incubating the cells with the secondary antibody only, and all do not showed nonspecific staining. Digital images were captured using CoolSNAP-PRO<sup>cf</sup> (Media Cybernetics) camera controlled by an Image Pro-Plus software system from Diagnostic Instruments. Indirect immunofluorescence was done at least in three independent experiments and technical duplicate.

**Total RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction.** Total RNA extraction, RT-PCR and qPCR (real-time quantitative PCR) were all performed as described by Rebelatto and colleagues [19]. Primer sets used for RT-PCR and qPCR analyses are shown in Table 1. Three independent experiments were performed

**Table 1**

Primer sets used for RT-PCR and qPCR analyses. Abbreviations: MLC-A, myosin light chain atrium; MLC-V, myosin light chain ventricle; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Target	Reference	NCBI seq	Amplicon (bp)	TM (°C)	Primer sequence
GAPDH	[39]	2597	150	55	F: 5'-GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC-3' R: 5'-TCGTTACACCCATGACCA-3'
Alpha cardiac actin	[40]	NM_005159	226	55	F: 5'-GCAAGGACCTGTATGCCAACAATG-3' R: 5'-GCCTCATCGTACTCTTTCCTGCTA-3'
Conexina-43	[41]	M65188	154	60	F: 5'-CCTTCTTGCTGATCCAGTGGTAC-3' R: 5'-ACCAAGGACACCACCAT-3'
MLC-A	[42]	BC027915	239	62	F: 5'-GCTCTTTGGGAGAAAGCTCA-3' R: 5'-CGTCTCCATGGGTGATGATG-3'
MLC-V	[42]	BC031006	200	62	F: 5'-GGCGCGTGAACGTGAAAAAT-3' R: 5'-CAGCATTTCCCGAACCTAAT-3'
Cardiac troponin	[42]	BC002653	152	62	F: 5'-GGCAGCGGAAGAGGTGCTGAA-3' R: 5'-GAGGCACCAAGTTGGCATGAACGA-3'
VEGF	[42]	M27281	101	60	F: 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGTG-3' R: 5'-TGCGCTGATAGACATCCATGA-3'

for each stem cell source. GAPDH was used as an internal house-keeping control for expression.

## Results

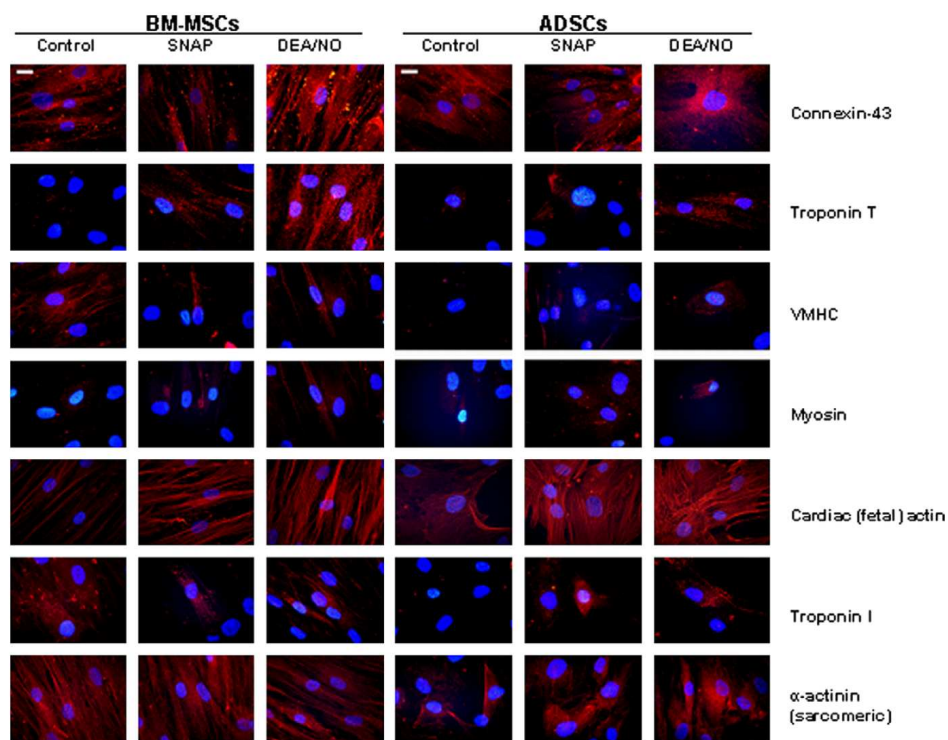
Human BM-MSCs and ADSCs were previously isolated and characterized by our group [19] and shown that these cells are similar in morphology, immunophenotype and differentiation capacity. Here, we investigated by flow cytometry, cellular immunofluorescence, RT-PCR and real-time PCR analysis if exposure of these cells to the NO agents SNAP and DEA/NO induces the expression of cardiac function genes.

In order to define an efficient, but non-lethal concentration of the NO agents, cells were treated with 4, 0.4 and 0.04 mM SNAP and 1, 0.1 and 0.01  $\mu$ M DEA/NO. Cells were exposed to the NO agents for 4 days and left in culture in the absence of the compounds for up to 20 days. The time points analyzed were 2 (i.e., during the NO agents treatment), 7 and 20 days. Expression of various cardiac markers was assayed by RT-PCR (Table 1) in two biological samples of BM-MSCs and ADSCs. The highest concentration of SNAP was cytotoxic. Overall, cells cultured for 20 days, treated with 0.4 mM of SNAP and 0.1  $\mu$ M of DEA/NO expressed  $\alpha$ -cardiac actin, cardiac troponin T and connexin-43 in both BM-MSCs and ADSC more consistently than the other tested conditions (data not shown). Thus, these concentrations and time of treatment were chosen for further analyses.

Indirect immunofluorescence analysis showed that both NO agents induced the expression of some cardiac and muscle markers by day 20; some markers were observed in a few isolated cells and others in most of the cells (Fig. 1). Interestingly, connexin-43, cardiac (fetal) actin and  $\alpha$ -actinin (sarcomeric) were detected even in non-treated cells, suggesting that MSCs spontaneously express these markers after 20 days in culture. The findings for BM-MSCs and ADSCs exposed to SNAP and DEA/NO were similar.

The percentage of immunopositive cells for muscle markers was determined in duplicate by flow cytometry. The number of cells expressing muscle markers, putatively differentiated cells or in the process of differentiation, never exceeds 20% of the total number of treated cells. Because some markers were spontaneously expressed, results are reported as the ratio of immunopositive treated to immunopositive non-treated cells on day 20 (Table 2). The percentage of CD34-positive cells increased in BM-MSCs treated with both SNAP and DEA/NO and in ADSCs treated with SNAP. CD44 increased slightly in ADSCs treated with both NO agents. Overall, expression of muscle markers showed a tendency to increase, and mainly in BM-MSCs, following exposure to NO agents (Table 2).

The expression of some muscle marker genes and of VEGF was also assessed by RT-PCR and qPCR (Table 1). RT-PCR results were highly dispersed. MLC-V expression was detected in only one ADSC sample treated with SNAP whereas expression of the genes for connexin-43, VEGF and troponin T was detected in most of the samples analyzed (Fig. 2). When qPCR was performed, it was



**Fig. 1.** Indirect immunofluorescence showing the expression of muscular and cardiac markers. BM-MSCs (A) and ADSCs (B) were treated with SNAP and DEA/NO. On day 20, indirect immunofluorescence analyses were performed for the markers indicated on the right (Texas Red). DAPI stain (blue) show the nuclei. Representative results of three independent experiments are shown. VMHC, ventricular myosin heavy chain. Scale bar = 20  $\mu$ M.



**Table 2**

Quantification by flow cytometry of immunopositive cells. Results are expressed as the ratio between immunopositive treated and immunopositive untreated cells for the indicated markers. Values are mean of two independent experiments. Abbreviations: BM-MSC, bone marrow mesenchymal stem cell; ADSC, adipose derived stem cell; VMHC, ventricular myosin heavy chain.

	CD44	CD34	CD45	CD29	Connexin-43	Troponin T	VMHC	Myosin	Cardiac actin
<i>Mean ratio ADSC</i>									
SNAP/control	1.9	3.5	0.8	1.2	0.7	1	0.8	0.6	1.4
DEA/NO/control	2.1	0.8	0.8	1.2	1.2	1.2	0.8	0.9	1.4
<i>Mean ratio BM-MSC</i>									
SNAP/control	1	6.2	1.6	1	0.8	2	1.8	1.4	1.6
DEA/NO/control	1	4.3	1.3	1	1.2	1.6	1.3	1.6	2

possible to detect an increased of connexin-43 expression in BM-MSCs treated with NO agents. More interestingly, the mRNA levels of the potent angiogenic factor VEGF were considerably increased in all BM-MSCs samples following treatment with either SNAP or DEA/NO. Only one ADSC sample gave results in agreement with these data (Fig. 3).

## Discussion

Our study shows that the expression of some muscle markers in MSC is increased by treatment with NO agents. However, unlike ES cells [16], MSCs exposed to the NO agents did not fully differentiate into cardiomyocyte-like cells, confirming that the potential of MSCs to differentiate is more restricted than that of ES cells. The results of flow cytometry and immunofluorescence were consistent concerning the relative increases in expression, i.e., the differ-

ences between NO-treated and untreated cells after 20 days in culture.

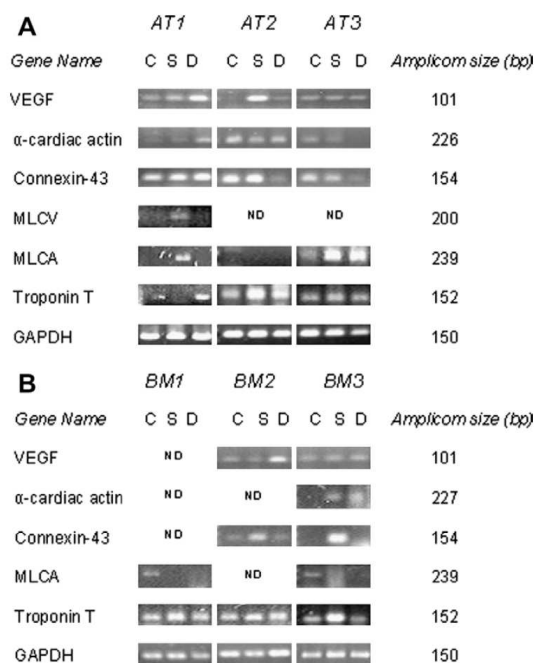
One interesting finding was that untreated (control) ADSCs and BM-MSCs expressed some muscle markers at mRNA and protein levels. Spontaneous expression of muscle markers by MSCs has also been observed at the molecular level by other groups [7,21–23]. Tondreau and colleagues [24] suggested that expression of certain proteins by MSCs depends on time in culture, rather than on specific induction factors. These studies, combined with the findings reported by Verfaillie's group, support the idea that MSCs are, at the molecular level, "pluridifferentiated" cells [4]. Although the corresponding mRNAs are present in untreated ADSCs and BM-MSCs, they might be functionally inactive or the proteins they encode might have non-canonical functions [25].

BM-MSCs seem to be more promising than ADSCs for cardiomyoplasty, as assessed by qPCR analysis. This may be a consequence of the pre-commitment of these cells for the cardiomyogenic lineage, because all the BM donors were dilated cardiomyopathy patients. Local or systemic production of inflammatory mediators might influence not only MSC migration to injured tissues [26,27], but also MSC proliferation, differentiation [28] and engraftment [29].

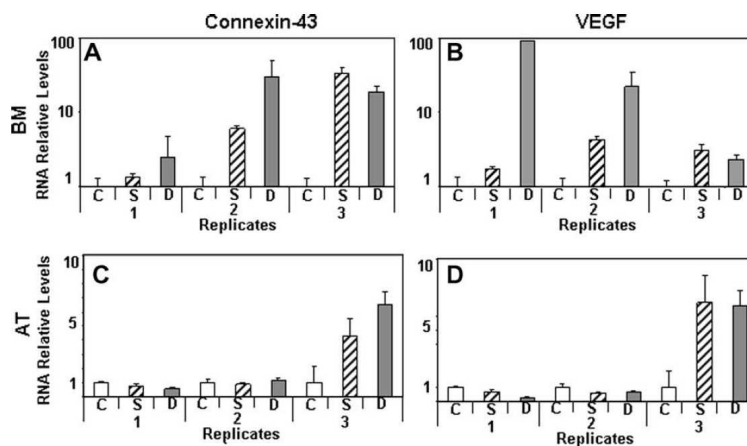
There is recent evidence that mesenchymal progenitor cells might have beneficial effects on post-infarcted myocardium scarring through paracrine factor-stimulated angiogenesis, rather than by cardiomyogenic differentiation itself [20,30,31]. The increased expression of connexin-43 observed in cardiomyocytes was attributed to secretion of paracrine factors by transplanted mesenchymal progenitor cells from BM [32]. Through this indirect mechanism, MSC transplantation could lead to the recovery of cardiac performance and to induction of neovascularization [20], although some degree of differentiation into cardiomyocytes may also take place. Our qPCR results are consistent with this possibility. We show that untreated BM-MSCs and ADSCs produce the mRNAs for connexin-43 and VEGF and, more importantly, their expressions were greatly increased after exposure to NO agents, most substantially with DEA/NO. VEGF is a critical angiogenic factor which may both contribute to endothelial lineage cell survival through VEGF-mediated phosphorylation of protein kinase B and endothelial nitric oxide synthase [33–35] and also accelerate development of microvessels and enhance regional blood flow in ischemic tissue [36].

We determined the percentages of immunopositive cells by flow cytometry and found an increase of CD34 expression in BM-MSCs exposed to both NO agents and in ADSCs exposed to SNAP. CD34 has been considered to be a marker of activated stem cells [37], and CD34<sup>+</sup> cell levels are significantly correlated to VEGF levels in healthy controls [38].

In conclusion, this work indicates that NO and/or its derivatives increase the expression of various muscle markers and VEGF in BM-MSCs and ADSCs, and is consistent with the putative pro-angiogenic role of MSCs. Thus, NO agents treated-MSCs transplantation may have beneficial effects in cardiac patients.



**Fig. 2.** Analysis of VEGF and cardiac markers mRNA levels by RT-PCR. Three independent experiments of AT (A) and BM (B) are shown. Non-induced cells were used as negative controls. GAPDH was used as an internal control. Abbreviations: BM, bone marrow; AT, adipose tissue; C, control; S, SNAP; D, DEA/NO; ND, not detected.



**Fig. 3.** qPCR for connexin-43 and VEGF mRNAs. Expression of connexin-43 (A, C) and VEGF (B, D) in BM (A, B) and AT (C, D). Three independent experiments are shown. qPCR values are expressed as means  $\pm$  SD of technical triplicates. GAPDH was used as an internal housekeeping control for expression. Abbreviations: C, control; S, SNAP; D, DEANO.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from Ministério da Saúde and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (552234/2005-2). We thank Patricia Shigunov, Andressa Vaz Schittini and Joana Martins for technical assistance. AC is recipient of a Fiocruz-CNPq visiting researcher fellowship and SG is a research fellow from CNPq.

#### References

- [1] S.A. Shepler, A.N. Patel, Cardiac cell therapy: a treatment option for cardiomyopathy, *Crit. Care Nurs.* 30 (2007) 74–80.
- [2] B.E. Strauer, M. Brehm, C.M. Schannwell, The therapeutic potential of stem cells in heart disease, *Cell Prolif.* 41 (Suppl. 1) (2008) 126–145.
- [3] Y.S. Yoon, A. Wecker, L. Heyd, J.S. Park, T. Tkebuchava, K. Kusano, A. Hanley, H. Scadova, G. Qin, D.H. Cha, K.L. Johnson, R. Aikawa, T. Asahara, D.W. Losordo, Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 326–338.
- [4] Y. Jiang, B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad, M. Reyes, C.M. Verfaillie, Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain, *Exp. Hematol.* 30 (2002) 896–904.
- [5] C. Toma, K.S. Pittenger, K.S. Cahill, B.J. Byrne, P.D. Kessler, Human mesenchymal stem cells differentiate of a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart, *Circulation* 105 (2002) 93–98.
- [6] P.V. Kruglyakov, I.B. Sokolova, N.N. Zin'kova, S.K. Viide, G.V. Aleksandrov, N.S. Petrov, D.G. Polyntsev, In vitro and in vivo differentiation of mesenchymal stem cells in the cardiomyocyte direction, *Bull. Exp. Biol. Med.* 142 (2006) 503–506.
- [7] P. Antonitsis, E. Ioannidou-Papagiannaki, A. Kaidoglou, C. Papakonstantinou, In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine, *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 6 (2007) 593–597.
- [8] T. Wang, Z. Xu, W. Jiang, A. Ma, Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell, *Int. J. Cardiol.* 109 (2006) 74–81.
- [9] N. Nishiyama, S. Miyoshi, N. Hida, T. Uyama, K. Okamoto, Y. Ikegami, K. Miyado, K. Segawa, M. Terai, M. Sakamoto, S. Ogawa, A. Umezawa, The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro, *Stem Cells* 25 (2007) 2017–2024.
- [10] W.S. Shim, S. Jiang, P. Wong, J. Tan, Y.L. Chua, Y.S. Tan, Y.K. Sin, C.H. Lim, T. Chua, M. Teh, T.C. Liu, E. Sim, Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (2004) 481–488.
- [11] X.J. Xie, J.A. Wang, J. Cao, X. Zhang, Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by myocardial medium under hypoxic conditions, *Acta Pharmacol. Sin.* 27 (2006) 1153–1158.
- [12] S. Moncada, Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine, *J. R. Soc. Med.* 92 (1999) 164–169.
- [13] R. Covacu, A.I. Danilov, B.S. Rasmussen, K. Hallén, M.C. Moe, A. Lobell, C.B. Johansson, M.A. Svensson, T. Olsson, L. Brundin, Nitric oxide exposure diverts neural stem cell fate from neurogenesis towards astroglialogenesis, *Stem Cells* 24 (2006) 2792–2800.
- [14] Z. Liu, Y. Jiang, H. Hao, K. Gupta, J. Xu, L. Chu, E. McFalls, J. Zweier, C. Verfaillie, R.J. Bache, Endothelial nitric oxide synthase is dynamically expressed during bone marrow stem cell differentiation into endothelial cells, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293 (2007) H1760–H1765.
- [15] L. Chu, Y. Jiang, H. Hao, Y. Xia, J. Xu, Z. Liu, C.M. Verfaillie, J.L. Zweier, Z. Liu, Nitric oxide enhances Oct-4 expression in bone marrow stem cells and promotes endothelial differentiation, *Eur. J. Pharmacol.* 591 (2008) 59–65.
- [16] S. Kanno, P.K. Kim, K. Sallam, J. Lei, T.R. Billiar, L.L. Shears, Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12277–12281.
- [17] Q. Feng, W. Song, X. Lu, J.A. Hamilton, M. Lei, T. Peng, S.P. Yee, Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase, *Circulation* 106 (2002) 873–879.
- [18] W. Bloch, B.K. Fleischmann, D.E. Lorke, C. Andressen, B. Hops, J. Hescheler, K. Addicks, Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis, *Cardiovasc. Res.* 43 (1999) 675–684.
- [19] C.K. Rebelatto, A.M. Aguiar, M.P. Moretão, A.C. Senegaglia, P. Hansen, F. Barchiki, J. Oliveira, J. Martins, C. Kuligovski, F. Mansur, A. Christofis, V.F. Amaral, P.S. Brofman, S. Goldenberg, L.S. Nakao, A. Correa, Dissimilar differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, umbilical cord blood and adipose tissue, *Exp. Biol. Med.* 233 (2008) 901–913.
- [20] E. Harlow, D. Lane, *Antibodies, A laboratory manual*, CSH Press, New York, USA, 1988.
- [21] B. Seshi, S. Kumar, D. King, Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis, *Blood Cells Mol. Dis.* 31 (2003) 268–285.
- [22] R. Gonzalez, C.B. Maki, J. Pacchiarotti, S. Csontos, J.K. Pham, N. Slepko, A. Patel, F. Silva, Pluripotent marker expression and differentiation of human second trimester mesenchymal stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007) 491–497.
- [23] W.C. Lee, J.L. Sepulveda, J.P. Rubin, K.G. Marra, Cardiomyogenic differentiation potential of human adipose precursor cells, *Int. J. Cardiol.* (2008), doi: 10.1016/j.ijcard.2007.11.068.
- [24] T. Tondreau, L. Lagneau, M. Dejenef, M. Massy, C. Mortier, A. Delforge, D. Bron, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation, *Differentiation* 72 (2004) 319–326.
- [25] P. Sampath, B. Mazumder, V. Seshadri, C.A. Gerber, L. Chavatte, M. Kinter, S.M. Ting, J.D. Dignam, S. Kim, D.M. Driscoll, P.L. Fox, Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation, *Cell* 119 (2004) 195–208.
- [26] C. Ries, V. Egea, M. Karow, H. Kolb, M. Jochum, P. Neth, MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines, *Blood* 109 (2007) 4055–4063.
- [27] C.H. Wang, W.J. Cheng, N.I. Yang, L.T. Kuo, C.M. Hsu, H.I. Yeh, Y.J. Lan, C.H. Yeh, W.L. Stanford, Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 54–60.

- [28] M. Girgenrath, S. Weng, C.A. Kostek, B. Browning, M. Wang, S.A. Brown, J.A. Winkles, J.S. Michaelson, N. Allaire, P. Schneider, M.L. Scott, Y.M. Hsu, H. Yagita, R.A. Flavell, J.B. Miller, L.C. Burkly, T.S. Zheng, TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration, *EMBO J.* 25 (2006) 5826–5839.
- [29] T.M. Coyne, A.J. Marcus, D. Woodbury, I.B. Black, Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia, *Stem Cells* 24 (2006) 2483–2492.
- [30] S. Davani, A. Marandini, N. Mersin, B. Royer, B. Kantelip, P. Hervé, J.P. Etievant, J.P. Kantelip, Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model, *Circulation* 108 (Suppl. 1) (2003) II253–II258.
- [31] W. Dai, S.L. Hale, B.J. Martin, J.Q. Kuang, J.S. Dow, L.E. Wold, R.A. Kloner, Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects, *Circulation* 112 (2005) 214–223.
- [32] E.J. Suuronen, J. Price, J.P. Veinot, K. Ascah, V. Kapila, X.W. Guo, S. Wong, T.G. Mesana, M. Ruel, Comparative effects of mesenchymal progenitor cells, endothelial progenitor cells, or their combination on myocardial infarct regeneration and cardiac function, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 134 (2007) 1249–1258.
- [33] A. Besse, F. Trimoreau, V. Praloran, Y. Denizot, Effect of cytokines and growth factors on the macrophage colony-stimulating factor secretion by human bone marrow stromal cells, *Cytokine* 12 (2000) 522–525.
- [34] H. Kamihata, H. Matsubara, T. Nishiue, S. Fujiyama, Y. Tsutsumi, R. Ozono, H. Masaki, Y. Mori, O. Iba, E. Tateishi, A. Kosaki, S. Shitani, T. Murohara, T. Imaizumi, T. Iwasaka, Implantation of bone-marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines, *Circulation* 104 (2001) 1046–1052.
- [35] K. Amano, H. Matsubara, O. Iba, M. Okigaki, S. Fujiyama, T. Imada, H. Kojima, Y. Nozawa, S. Kawashima, M. Yokoyama, T. Iwasaka, Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression, *Hypertension* 41 (2003) 156–162.
- [36] H. Su, R. Lu, Y.W. Kan, Adeno-associated viral vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer induces neovascular formation in ischemic heart, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 13801–13806.
- [37] T. Sato, J.H. Laver, M. Ogawa, Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells, *Blood* 94 (1999) 2548–2554.
- [38] A.M. Leone, S. Rutella, G. Bonanno, A.M. Contemi, D.G. de Ritis, M.B. Giannico, A.G. Rebuzzi, G. Leone, F. Crea, Endogenous G-CSF and CD34<sup>+</sup> cell mobilization after acute myocardial infarction, *Int. J. Cardiol.* 111 (2006) 202–208.
- [39] K.G. Gaustad, A.C. Boquest, B.E. Anderson, A.M. Gerdes, P. Collas, Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314 (2004) 420–427.
- [40] H. Zaehres, M.W. Lensch, L. Daheron, S.A. Stewart, J. Itskovitz-Eldor, G.Q. Daley, High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells, *Stem Cells* 23 (2005) 299–305.
- [41] Z. Chen, W.H. Evans, S.C. Pflugfelder, D.Q. Li, Gap junction protein connexin 43 serves as a negative marker for a stem cell-containing population of human limbal epithelial cells, *Stem Cells* 24 (2006) 1265–1273.
- [42] B.S. Yoon, S.J. Yoo, J.E. Lee, S. You, H.T. Lee, H.S. Yoon, Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment, *Differentiation* 74 (2006) 149–159.

## ANEXO G – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA

**Original Research****Are purified or expanded cord blood-derived CD133<sup>+</sup> cells better at improving cardiac function?**

Alexandra C Senegaglia<sup>1</sup>, Laura A Barboza<sup>1</sup>, Bruno Dallagiovanna<sup>2</sup>, Carlos A M Aita<sup>1</sup>, Paula Hansen<sup>1</sup>, Carmen L K Rebelatto<sup>1</sup>, Alessandra M Aguiar<sup>2</sup>, Nelson I Miyague<sup>1</sup>, Patrícia Shigunov<sup>2</sup>, Fabiane Barchiki<sup>1</sup>, Alejandro Correa<sup>2</sup>, Marcia Olandoski<sup>1</sup>, Marco A Krieger<sup>2</sup> and Paulo R S Brofman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Institute for Health and Biological Sciences, Rua Imaculada Conceição, 1155 Curitiba, Paraná, 80215901; <sup>2</sup>Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Rua Prof. Algacyr Munhoz Maeder, 3775 Curitiba, Paraná 81350010, Brazil

Corresponding author: Alexandra C Senegaglia, Rua Guilherme Pugsley 1760, Apartment 501, Curitiba, Paraná, 80620000, Brazil. Emails: alexandra.senegaglia@pucpr.br; acsenegaglia@hotmail.com

**Abstract**

Endothelial progenitor cells (EPCs), which express the CD133 marker, can differentiate into mature endothelial cells (ECs) and create new blood vessels. Normal angiogenesis is unable to repair the injured tissues that result from myocardial infarction (MI). Patients who have high cardiovascular risks have fewer EPCs and their EPCs exhibit greater *in vitro* senescence. Human umbilical cord blood (HUCB)-derived EPCs could be an alternative to rescue impaired stem cell function in the sick and elderly. The aim of this study was to purify HUCB-derived CD133<sup>+</sup> cells, expand them *in vitro* and evaluate the efficacy of the purified and expanded cells in treating MI in rats. CD133<sup>+</sup> cells were selected for using CD133-coupled magnetic microbeads. Purified cells stained positive for EPC markers. The cells were expanded and differentiated in media supplemented with fetal calf serum and basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and vascular endothelial growth factor (VEGF). Differentiation was confirmed by lack of staining for EPC markers. These expanded cells exhibited increased expression of mature EC markers and formed tubule-like structures *in vitro*. Only the expanded cells expressed VEGF mRNA. Cells were expanded up to 70-fold during 60 days of culture, and they retained their functional activity. Finally, we evaluated the therapeutic potential of purified and expanded CD133<sup>+</sup> cells in treating MI by intramyocardially injecting them into a rat model of MI. Rats were divided into three groups: A (purified CD133<sup>+</sup> cells-injected); B (expanded CD133<sup>+</sup> cells-injected) and C (saline buffer-injected). We observed a significant improvement in left ventricular ejection fraction for groups A and B. In summary, CD133<sup>+</sup> cells can be purified from HUCB, expanded *in vitro* without losing their biological activity, and both purified and expanded cells show promising results for use in cellular cardiomyoplasty. However, further pre-clinical testing should be performed to determine whether expanded CD133<sup>+</sup> cells have any clinical advantages over purified CD133<sup>+</sup> cells.

**Keywords:** umbilical cord blood, endothelial progenitor cells, transplantation, myocardial infarction

*Experimental Biology and Medicine* 2010; 235: 119–129. DOI: 10.1258/ebm.2009.009194

**Introduction**

Reperfusion therapy is associated with significantly reduced mortality rates and improved clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (MI).<sup>1</sup> However, normal angiogenesis is usually unable to supply the greater demand for oxygen and nutrients required following MI. In addition, it is unable to prevent hypertrophied cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling.<sup>2</sup> Cell therapy may provide a novel therapeutic strategy to modify left

ventricular remodeling processes and prevent postinfarction heart failure.<sup>3</sup> Different cell populations have been tested in this regard in both preclinical and clinical settings. Recently, isolated CD34<sup>+</sup> cells demonstrated increased potency and safety for therapeutic neovascularization after MI, as compared with total mononuclear cells (MNCs).<sup>4</sup>

Endothelial progenitor cells (EPCs) are precursor cells that can differentiate into mature endothelial cells (ECs) and create new blood vessels.<sup>5</sup> Generally, EPCs can be identified based

on their expression of CD133, CD34, KDR and/or VE-cadherin cellular markers.<sup>6</sup> The similar phenotype of hematopoietic and EPCs strongly supports the existence of a common precursor cell, which has been called the hemangioblast. This cell has been identified in *in vitro* studies using embryonic stem cells from postnatal bone marrow and cord blood.<sup>7</sup>

EPCs represent less than 1% of all bone marrow cells and less than 0.01% of peripheral blood MNCs.<sup>8</sup> Human umbilical cord blood (HUCB) is a viable source of stem cells due to its large CD34 and CD133-expressing cell populations. These cells exhibit robust proliferative capacity, low immunogenicity and low infection contamination (including virions). Furthermore, the diverse representation of human leukocyte antigen (HLA) genotypes in unrelated, banked HUCB allows the use of HUCB-derived cells in allogeneic transplantations.<sup>9</sup> Promising results were obtained using purified HUCB stem cells as cellular therapies in animal models, and these results support their potential application in cardiovascular medicine.<sup>10,11</sup> Independently or in combination with biomaterials, such as collagen matrix, HUCB-derived stem cells seem to improve the efficiency of cellular cardiomyoplasty in mice. Thus, this strategy has emerged as a novel therapy.<sup>12</sup>

Results from preclinical studies have suggested that it would take more than 10 L of autologous peripheral blood to produce a sufficient number of EPCs to induce angiogenesis in one patient.<sup>13</sup> Furthermore, patients with increased cardiovascular risk have fewer EPCs, as compared with healthy subjects, and their EPCs demonstrate increased *in vitro* senescence.<sup>14</sup> The use of CD133<sup>+</sup> cells derived from purified and expanded HUCB could be used to rescue stem cell function in the sick and elderly. EPCs can be expanded *in vitro* to increase their potential therapeutic use. However, all current protocols involving short-term culture would not yield sufficient numbers of cells for systemic therapy in humans. On the other hand, long-term culture may introduce changes in the EPC's phenotype, which could reduce their therapeutic efficacy.<sup>15</sup>

The aim of this study was to isolate and purify CD133<sup>+</sup> cells from HUCB and to expand the cells *in vitro* by exposing them to an appropriate growth factor cocktail. We evaluated the effectiveness of the purified and expanded CD133<sup>+</sup> cells in improving the cardiac function in a rat model of MI.

## Materials and methods

This study was reviewed and approved by the Local Ethics Committee (Pontificia Universidade Católica do Paraná: numbers 1366 and 180). Signed informed consent was obtained from each mother prior to HUCB collection. All animal experiments were carried out in accordance with: 'The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' published by the National Institute of Health (NIH publication 85-23, 7th edn, revised 1996).

### Purification of CD133<sup>+</sup> cells

MNCs were isolated from HUCB. Thirty-seven HUCB samples (approximately 78.53 ± 4.63 mL each) were

collected from fresh placentas with the umbilical cord still attached, and acid-citrate-dextrose was used as anticoagulant. MNCs were isolated by centrifugation for 30 min at 400 g using Ficoll density gradients (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). CD133<sup>+</sup> cells were selected using CD133-coupled magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany), following the manufacturer's instructions. Briefly, MNCs were incubated with the CD133/1 monoclonal antibody, which was directly conjugated to microbeads, for 30 min. The samples were washed, filtered through a 50- $\mu$ m nylon mesh to remove clumps and added to a column in the midi MACS cell separator (Miltenyi Biotec). The labeled cells were separated using a high-gradient magnetic field and eluted from the column after being separated from the magnet. At the end of the separation, the cell purity and viability were determined using an anti-CD133 antibody (PE conjugated; Miltenyi Biotec) and 7AAD (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), respectively. The samples were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

### Proliferation assay on CD133<sup>+</sup> cells

A cell proliferation assay was performed to establish the optimal culture conditions for CD133<sup>+</sup> cells. A cell suspension of 50  $\mu$ L ( $1 \times 10^5$  cells/mL) in Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) (Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen), was seeded into 96-well plates (Corning, Oneonta, NY, USA). Various concentrations of growth factors were added: 0.5, 1.0 and 2.0 ng/mL of basic fibroblast growth factor (b-FGF) (Invitrogen); 1.0, 2.0 and 3.0 ng/mL of insulin-like growth factor-I (IGF-I) (Sigma-Aldrich); and 25, 50 and 75 ng/mL of vascular endothelial growth factor (VEGF) (Sigma-Aldrich). Media with a constant amount of 1 ng/mL b-FGF and 2 ng/mL IGF-I with increasing VEGF concentrations (25, 50 and 75 ng/mL) was used. The cells were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. After five days, 1  $\mu$ Ci of [*methyl*-3H] thymidine (5.0 Ci/mmol) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) was added to each well. Six hours later, the culture media and cells were removed, and the cell-associated radioactivity was measured using a scintillation counter (Beckman Coulter<sup>®</sup>, Fullerton, CA, USA). Responses to each concentration were assayed in triplicate, and results were expressed as the mean of 12 independent experiments.

### Culture and expansion of CD133<sup>+</sup> cells

After establishing the optimal culture conditions,  $2 \times 10^5$  CD133<sup>+</sup> cells in 50  $\mu$ L were plated into 12-well culture plates coated with human fibronectin (Becton Dickinson) and cultured in IMDM supplemented with 50 ng/mL VEGF, 1 ng/mL b-FGF, 2 ng/mL IGF-I, 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin. All cultures were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. Additional feeding was performed depending on the rate of cell proliferation; the supernatant was removed by gentle pipetting and fresh

medium was added. Cells were cultured to approximately 80% confluence, detached using Accutase (US Bio-Technologies, Pottstown, PA, USA) digestion and replated in T-25 tissue culture flasks for 60 d. On day 60, the cells were assessed for viability, rate of expansion and phenotype.

#### Phenotypic characterization of cells

Immunophenotypic analysis was performed by staining  $2 \times 10^5$  of MNCs, purified and expanded CD133<sup>+</sup> cells. MNCs and purified cells were analyzed after isolation, whereas expanded cells were analyzed after 60 days of culture. The cells were incubated with various conjugated and unconjugated monoclonal antibodies against the following human antigens: CD133 (PE conjugated; Miltenyi Biotec), CD34 (APC conjugated; BD Pharmingen), CD45 (PerCP conjugated; BD Pharmingen), CD14 (fluorescein isothiocyanate [FITC] conjugated; BD Pharmingen), CD31 (BD Pharmingen), CD105 (BD Pharmingen) and von Willebrand Factor (vWF; Dako, Glostrup, Denmark). All incubations were performed at 4°C for 30 min. For CD31 and CD105 detection, cells were further incubated with an isotype-specific FITC-conjugated goat anti-mouse antibody (Caltag, Burlingame, CA, USA). For intracellular detection of vWF, cells were permeabilized using FIX & PERM cell permeabilization reagents (Caltag, Carlsbad, CA, USA) and further incubated with an isotype-specific FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (Sigma-Aldrich). Isotype-identical antibodies (BD Pharmingen) were served as controls. After incubation, the cells were washed with PBS containing 2% FBS and fixed with PBS containing 1% paraformaldehyde. Quantitative analyses were performed using a FACSCalibur flow cytometer and FlowJo software (Flowjo, Ashland, OR, USA).

#### Immunofluorescence microscopy

Expanded CD133<sup>+</sup> cells were cultured on chamber slides (Erie Scientific Company, Portsmouth, NH, USA) to confluence. Cells were washed twice with PBS and fixed for 20 min with cold methanol. Slides were incubated for 30 min with a polyclonal rabbit anti-human vWF antibody (1:200) (Caltag), followed by an isotype-specific FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:80) (Sigma-Aldrich). Cells were washed with PBS and then stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (1:5) (Sigma-Aldrich). The negative control was obtained by omitting the primary antibody incubation. Slides were examined and imaged using a fluorescent microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

#### Reverse transcription-polymerase chain reaction

To evaluate VEGF expression, total RNA was extracted from purified and expanded CD133<sup>+</sup> cells using the RNeasy kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). RNA was treated with DNase I (QIAGEN) in a column, according to the manufacturer's instructions. The total RNA (1 µg) was converted to cDNA by adding 10 nmol/L of oligo-dT primer (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) and 1 µL of reverse transcriptase (RT) (IMPROV II, Promega, Fitchburg, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. Polymerase

chain reaction (PCR) reactions contained 20 ng of cDNA as a template with 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L KCl, 10 pmol of forward and reverse primers for VEGF and 5 pmol for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 62.5 µmol/L dNTPs (deoxyribonucleotide triphosphates) and 1 U Taq polymerase (Invitrogen). The oligonucleotide primers used for PCR (Midland Certified Reagent Company, Midland, TX, USA) were as follows: VEGF (Accession Number: M27281) forward (5' CTACCTCCACC ATGCCAAGTG 3') and reverse (5' TGGCTGATAGAC ATCCATGA 3'), which yielded a 101-base pair (bp) product; and GAPDH (Accession Number 2597) forward (5' GCGGATGCTGGCGCTGAGTAC 3') and reverse (5' TGGTTCACACCCATGACGA 3'), which yielded a 150-bp product. PCR conditions were: 94°C for two minutes, followed by 30 cycles of 94°C for 15 s, 62°C for VEGF and 55°C for GAPDH for 30 s, and 72°C for 40 s followed by a final extension step of 72°C for three minutes. All reactions were performed in a Bio-Cycler II thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Amplified PCR products were separated by electrophoresis on 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. Bands were imaged using ultraviolet illumination (UV White Darkroom, UVP Bioimaging Systems, Upland, CA, USA). Relative gene expression was normalized to GAPDH.

#### Capillary-like tubule formation assay

The Matrigel<sup>®</sup> basement membrane matrix (Becton Dickinson) was used to assess EC tube formation. Matrigel was thawed overnight at 4°C and added (250 µL) to each well of a 24-well plate. The Matrigel matrix was allowed to polymerize at room temperature for 20 min. A suspension of  $2 \times 10^4$  CD133<sup>+</sup> cells/well in 250 µL of IMDM containing 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin, and a suspension of expanded CD133<sup>+</sup> cells/well in 250 µL of IMDM containing 50 ng/mL VEGF, 1 ng/mL b-FGF, 2 ng/mL IGF-I, 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin were added to the wells. All assays were performed in triplicate. Cells were incubated for 24 h at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator and observed at 2, 6, 12 and 24 h using an IX70 Olympus microscope.

#### Rat model of MI

Seventy male Wistar rats (200–400 g) were subjected to MI, as previously described.<sup>16</sup> Briefly, rats were anesthetized by intramuscularly injecting ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The animals were intubated with a 14-gauge, 2.54-cm angiocatheter under direct vision and ventilated with a Harvard rodent ventilator model 683 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) with minute ventilations of 150 mL/min. The heart was exposed via a left anterolateral thoracotomy incision at the fourth intercostal space. The ribs were retracted to open the chest cavity. After removing the pericardium, the left anterior descending (LAD) branch of the left coronary artery was identified and then permanently ligated by passing a 7-0 polypropylene suture (Premio<sup>®</sup> Peters Surgical, Bobigny, France)

under the LAD at the level of the distal margin of the retracted left atrial appendage. The chest wall, muscle layers and skin were closed with interrupted 3-0 silk sutures.

### Cell transplantation

Rats with ejection fractions (EF) lower than 40% were randomly assigned to three groups: purified CD133<sup>+</sup> cells group A; expanded CD133<sup>+</sup> cells group B and control group C. Seven days after the MI, the animals were anesthetized and ventilated as described above. Groups A and B were treated with  $2 \times 10^5$  cells in 0.3 mL of PBS injected using a tuberculin syringe with a 13  $\times$  0.38 needle into one point of the myocardium (left ventricle [LV]), specifically in the center of the scar covering the whole infarcted and peri-infarcted area. An equal volume of PBS was injected into the heart of control animals.

### Echocardiography analysis

Transthoracic echocardiography was performed in all animals five days after MI (baseline echocardiogram) and 30 days after the transplant. The evaluated variables were LV ejection fraction (LVEF), LV end-systolic volume and LV end-diastolic volume. Echocardiograms were performed using a commercially available echocardiography system equipped with a 12-MHz phased-array transducer (Hewlett-Packard Sonos 5500; Andover, MA, USA; <http://www.hp.com>). Under sedation, the transducer was positioned in the left anterolateral portion of the thorax, and the heart was visualized using the two-dimensional mode with the axial view of the LV, with the mitral and aortic valves and the apex within the same image. The LV end-diastolic and LV end-systolic volumes were calculated using Simpson's rule. All measurements were averaged over three consecutive cardiac cycles and were determined by an experienced cardiologist who was blinded to the treatment group. Only animals with left ventricular dysfunction (i.e. LVEF lower than 40% during the first echocardiographic evaluation) were included in the study. Animals were euthanized after the second echocardiographic evaluation.

### Statistical analysis

Continuous variables were presented as mean  $\pm$  standard deviation, and categorical variables were presented as frequency and percentage. After statistical evaluation, the outliers, which were samples with values greater than 1.5 times the interquartile interval, were removed from the final analysis. Cell proliferation and immunophenotyping data were both evaluated using Friedman's non-parametric test. The normality distribution of the data was evaluated using the Shapiro-Wilks test, and the homogeneity condition was assessed by the Lévene test. Multiple comparisons were analyzed using the LSD test, and comparisons between two evaluations were assessed by the Student's *t*-test for paired samples. Values of  $P < 0.05$  were considered to be statistically significant. Analysis was performed using the SPSS V.14 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

## Results

### Purification and phenotypical characterization of HUCB-derived CD133<sup>+</sup> cells

CD133<sup>+</sup> cells were positively selected using anti-CD133-coupled magnetic microbeads. The mean number of cells obtained after magnetic CD133<sup>+</sup> cell sorting was  $0.55 \times 10^6 \pm 0.04$ , corresponding to 0.64% of the MNC population. As determined by flow cytometry, the mean purity of selected CD133<sup>+</sup> cells was  $74.8 \pm 15.82\%$ , and the viability was  $80.87 \pm 10.55\%$ . As shown by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analyses, the major contaminants in the CD133-enriched population were cells of the hematopoietic (CD45<sup>+</sup>) and monocytic (CD14<sup>+</sup>) lineages.

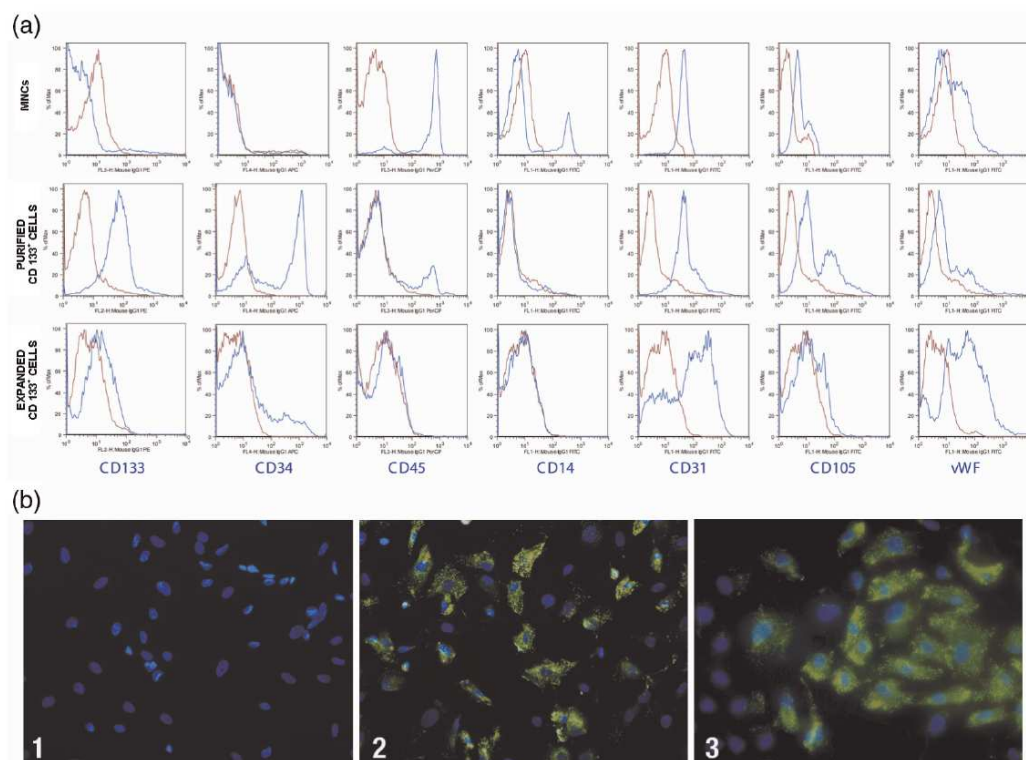
Flow cytometry analysis was performed to characterize the cell populations contributing to the MNCs, as well as the purified and expanded CD133<sup>+</sup> cells. The staining patterns of cells for specific markers are provided in Figure 1a. The cell population profiles showed that most of the MNCs stained positive for CD45 ( $88.69 \pm 10.19\%$ ). Some cells stained positive for CD14 ( $19.49 \pm 10.4\%$ ), CD31 ( $26.09 \pm 6.22\%$ ), CD105 ( $33.97 \pm 5.88\%$ ) and vWF ( $34.25 \pm 24.12\%$ ). A small number of MNCs stained positive for CD133 ( $3.37 \pm 2.3\%$ ) and CD34 ( $3.25 \pm 1.97\%$ ). After the CD133 purification, a large number of cells stained positive for CD133 ( $74.8\% \pm 15.82$ ) and CD34 ( $62.15 \pm 16.09\%$ ). A greater number of purified CD133<sup>+</sup> cells co-stained for CD31 ( $86.27 \pm 18.37\%$ ) and CD105 ( $69.16 \pm 31.95\%$ ). A similar number of cells stained positive for vWF ( $35.24 \pm 9.78\%$ ), and a considerably reduced number were positive for CD45 ( $9.03 \pm 5.07\%$ ) and CD14 ( $3.18 \pm 4.1\%$ ).

### Proliferation assays on growth factor-treated CD133<sup>+</sup> cells

We evaluated the effects of using different concentrations of three growth factors (b-FGF, IGF-I and VEGF) on CD133<sup>+</sup> cell proliferation. Proliferation was assessed after five days of treatment, which included thymidine incorporation for six hours. Three concentrations of each growth factor were independently used, in addition to media with a constant concentration of b-FGF and IGF-I and varying VEGF concentrations. The proliferation rate was calculated by dividing the mean cell count at each growth factor concentration by the mean cell count of the control. The only statistically relevant effect for b-FGF was observed when 1.0 ng/mL was added to the cultures ( $P = 0.04$ ). There were no significant differences in proliferation observed when various concentrations of IGF-I or VEGF were independently used. Constant concentrations of b-FGF (1.0 ng/mL) and IGF-I (2.0 ng/mL) were added along with varying concentrations of VEGF. Incubating the cells with 50 ng/mL VEGF increased their proliferation ( $P = 0.004$ ).

### CD133<sup>+</sup> cells actively proliferate and differentiate into endothelial-like cells

CD133<sup>+</sup> cells were grown on fibronectin-coated chamber slides in the presence of VEGF, b-FGF and IGF-I to induce the differentiation of putative purified EPCs into



**Figure 1** Phenotypic characterization by flow cytometry and fluorescence microscopy. (a) Human umbilical cord blood (HUCB)-derived mononuclear cells, purified and expanded CD133<sup>+</sup> cells were labeled with fluorescent human antibodies against CD133, CD34, CD45, CD14, CD31, CD105 and von Willebrand factor (vWF). Blue histograms indicate the percentage of positive cell populations for each antibody, whereas red histograms indicate isotype-control antibodies. Histograms represent one experiment. The X-axis represents the fluorescence intensity. (b) Fluorescent images ( $\times 400$ ) labeled with anti-human vWF isotype-specific fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit antibody (green) and 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (blue). 1: Negative control, expanded CD133<sup>+</sup> cells (labeled with FITC-conjugated secondary antibody and DAPI). 2: Positive control; coronary artery-derived endothelial cells. 3: HUCB-derived expanded CD133<sup>+</sup> cells after 60 days of culture

endothelial-like cells. Adherent cells formed a monolayer, predominantly consisting of small-sized cells, during the first 10 days of culture. No significant proliferation was noted during this culture period. Cells began to form clusters in some areas of the chamber on day 14 of culture. After this, several cells (increased on a daily basis) became spindle-shaped and tended to form cell lines. We also observed an increased population density, suggesting that the culture was actively proliferating. Adherent cells were still actively growing between days 30 and 60; therefore, cultures needed to be expanded on average every five days. At this point, morphological analysis of the cells revealed large flat cells with a cobblestone appearance, which is characteristic of ECs (Figure 2). Growth curves exhibited up to a 17-fold increase in the cell number by day 30 (passage 1) and up to a 70-fold increase after 60 days of culture (passage 4) and a viability of  $85.32 \pm 8.36\%$  (Figure 3).

We analyzed the expanded CD133<sup>+</sup> cells after 60 days of culture. Very few cells stained positive for CD133 ( $2.21 \pm 1.65\%$ ), CD45 ( $3.36 \pm 2.1\%$ ) and CD14 ( $2.03 \pm 1.36\%$ ).

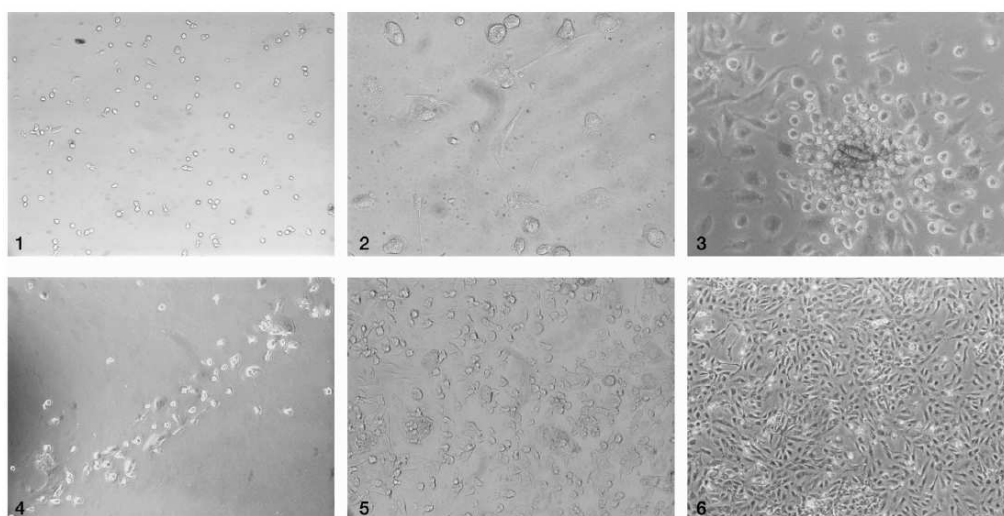
The number of cells expressing CD31 ( $63.58 \pm 16.3\%$ ) decreased over time but still represented a large population. The CD105 ( $14.14 \pm 14.14\%$ ) and CD34 ( $11.52 \pm 7.09\%$ ) positive populations decreased, and most of these cells were also positive for vWF ( $79.59 \pm 8.33\%$ ). The mean viability for MNCs, purified CD133<sup>+</sup> cells and expanded CD133<sup>+</sup> cells was greater than 92%, 80% and 87%, respectively.

Immunofluorescence microscopy analysis using anti-vWF antibody was performed to characterize the expanded CD133<sup>+</sup> cells in culture and to confirm our flow cytometry data. At day 60, most cells exhibited strong staining and clear cytoplasmic localization of vWF, which is a characteristic of ECs (Figure 1b).

#### Expanded CD133<sup>+</sup> cells express VEGF mRNA and form capillary-like tubes

VEGF mRNA was not detected in purified CD133<sup>+</sup> cells by RT-PCR; however, high VEGF mRNA levels were observed in all five biological replicates of cells induced to



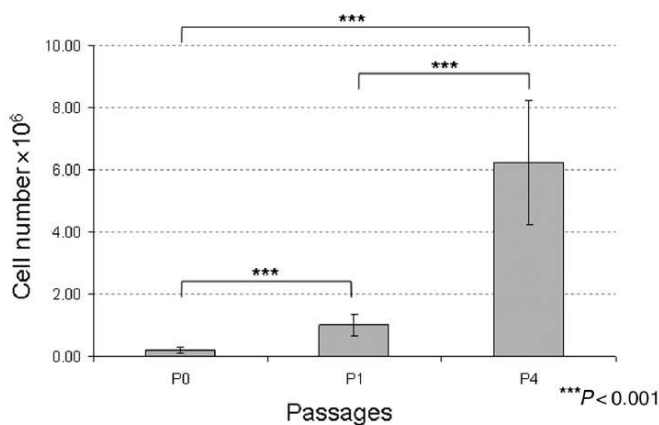


**Figure 2** CD133<sup>+</sup> cell culture in the presence of growth factors (basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and vascular endothelial growth factor). (1) Small-sized round cells at day 5 ( $\times 100$ ). (2) Small-sized round and flat elongated cells at day 14 ( $\times 200$ ). (3) Cluster formation at day 15 ( $\times 200$ ). (4) Cell lines at day 21 ( $\times 100$ ). (5) Proliferation enhanced at day 21 ( $\times 200$ ). (6) Confluent cells with cobblestone appearance at day 27 ( $\times 200$ )

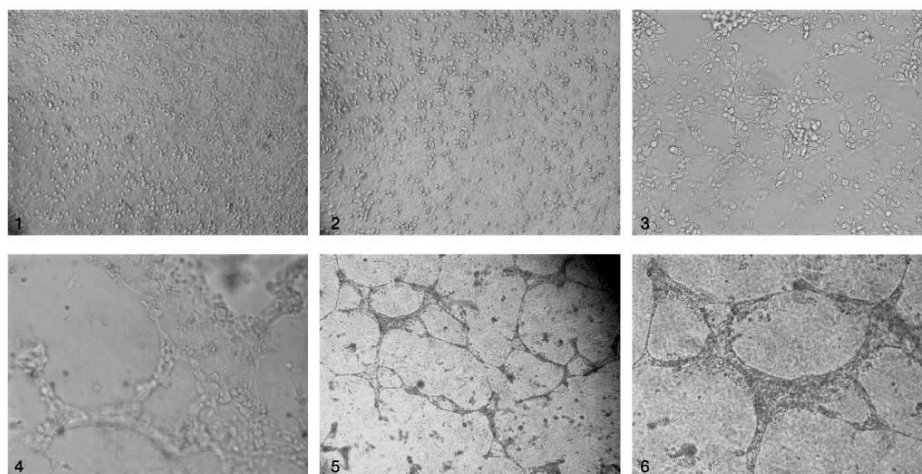
differentiate. Thus far, the data suggest that CD133<sup>+</sup> cells are indeed EPCs, and expanded CD133<sup>+</sup> cells are endothelial-like cells. Based on these conclusions, we characterized the function of expanded CD133<sup>+</sup> cells by studying their ability to form tubule-like structures on a Matrigel layer. Only expanded CD133<sup>+</sup> cells, not purified CD133<sup>+</sup> cells, formed a branched network of tubule-like structures after 24 h of culture on Matrigel (Figure 4). Thus, the *in vitro* data indicated that expanded CD133<sup>+</sup> cells clearly exhibit EC-like characteristics.

#### Purified and *in vitro* expanded CD133<sup>+</sup> cells improved LVEF in a rat model of MI

To confirm the *in vivo* functional activity of purified and expanded HUCB-derived CD133<sup>+</sup> cells and their potential use as a cell therapy, the cells were implanted in a rat model of MI. Seventy rats were infarcted and 11 animals died after this procedure. Twenty-seven rats showed left ventricular dysfunction (EF below 40%) in the first echocardiographic evaluation. Four rats died during or immediately following cell transplantation. The remaining 23 rats were divided into



**Figure 3** Proliferation rates. Eleven samples were used to evaluate the increase in cell number at three time points. P0, day 0: purified CD133<sup>+</sup> cells were grown on fibronectin-coated chamber slides (mean =  $0.19 \times 10^6$ ). P1, day 30: first passage; cells reached 80% confluence, and the morphological analysis showed spindle-shaped cells without a differentiated phenotype. The cell number increased up to 17-fold (mean =  $1 \times 10^6$ ). P4, day 60: fourth passage; the morphological analysis revealed large flat cells with a cobblestone appearance, which is characteristic of expanded endothelial cells, and the cell number increased up to 70-fold (mean =  $6.23 \times 10^6$ )



**Figure 4** Capillary-like tubule formation assay of human umbilical cord blood-derived CD133<sup>+</sup> cells cultured for 24 h on a Matrigel<sup>®</sup> layer. (1) Purified cells after 24 h of culture ( $\times 40$ ). Expanded CD133<sup>+</sup> cells formed tubules in response to basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and vascular endothelial growth factor after (2) 2 h ( $\times 40$ ); (3) 6 h ( $\times 200$ ); (4) 12 h ( $\times 200$ ); (5) 24 h ( $\times 40$ ) and (6) 24 h ( $\times 100$ )

three groups: group A, purified CD133<sup>+</sup> cells-injected rats (7 rats); group B, expanded CD133<sup>+</sup> cells-injected rats (6 rats), and group C, saline buffer-injected rats (10 rats). Three rats in group C died after surgery (12, 16 and 24 days). There were no deaths in groups A and B. After statistical evaluation, the outliers in each group were discarded. There was one outlier in group A, one in group B and two in group C.

Echocardiography measurements were applied to evaluate whether purified and/or *in vitro* expanded HUCB-derived CD133<sup>+</sup> cells could restore cardiac function in a rat model of MI 30 days after cell injection. Five days after MI, the LVEF measurements for the groups A, B and C were  $22.51 \pm 7.48\%$ ,  $20.75 \pm 5.42\%$  and  $25.99 \pm 5.03\%$ , respectively. In comparison to the second echocardiography (30 days after cell injection), the LVEF had increased by 10.16% for group A and by 6.8% for group B. The control group (group C) exhibited a 7.09% reduction in the LVEF. However, these data were not statistically significant. At this point, the LVEF values for groups A, B and C were  $32.67 \pm 14.37\%$ ,  $27.55 \pm 5.42\%$  and  $20.46 \pm 4.05\%$ , respectively. When we compared the difference between the first and second echocardiographic evaluations, we observed an improvement in the LVEF for the cell injection groups (A and B). The LVEF for group A (purified CD133<sup>+</sup> cell injection) was improved, as compared with the control group ( $P = 0.001$ ). Group B (expanded CD133<sup>+</sup> cell injection) also exhibited a significant improvement in the LVEF, as compared with the control group ( $P = 0.011$ ). There was no statistical difference observed between groups A and B (Figure 5).

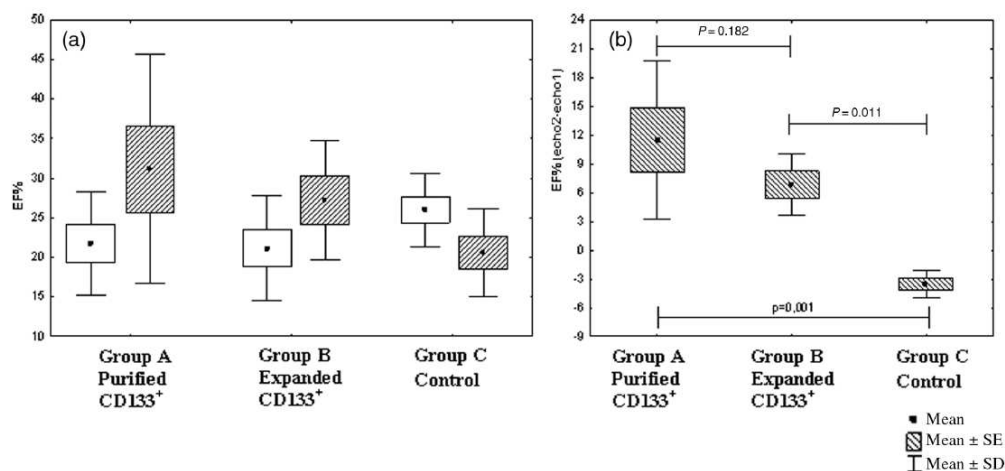
## Discussion

Neovascularization within the infarcted tissue is an integral component of the remodeling process; however, the capillary network is unable to support the increased

requirements of the hypertrophied myocardium, resulting in a progressive loss of viable tissue, infarct extension and fibrous replacement.<sup>17</sup> Limitations of the current strategy for inducing angiogenesis in ischemic tissues has led to the exploration of cell therapy as a means of stimulating neovascularization.<sup>18-20</sup> Most clinical assays use autologous bone marrow-derived MNCs for revascularization cell therapy.<sup>21-24</sup> In spite of bone marrow-derived MNCs showing positive effects in the treatment of heart disease in humans,<sup>2,25</sup> it has been suggested that using a specific fraction of progenitor cells (such as EPCs) could be more effective in rescuing the ischemic-induced injured areas of the heart.<sup>26,27</sup> Overall, the available clinical data indicate that cell therapy with EPCs is safe, feasible and associated with improved heart function.<sup>28,29</sup> The outcomes of clinical trials have been mixed and not as robust as they were in the animal models, partly because of the conflicts regarding the definition of human EPCs and the heterogeneity of the cell populations used in the treatments.<sup>30</sup>

However, EPCs isolated from patients with increased cardiovascular risk factors such as hypertension, atherosclerosis, smoking, family history and diabetes mellitus, as compared with those isolated from healthy subjects, are reduced in number and demonstrate increased *in vitro* senescence.<sup>14,31-33</sup> In patients either at high risk for future cardiovascular events or who have documented coronary disease, the body's endogenous stem cell supply and bone marrow response may be inadequate.<sup>9</sup> Impairment may be due to age-related diminution of vascular EC number and function. This may limit the efficacy of patient-derived progenitor cells in mediating neovascularization;<sup>14</sup> therefore, the use of stem cells for myocardial tissue repair might be limited among the elderly and sick because their cell supply is depleted and/or exhausted.<sup>34</sup>

Cord blood-derived EPCs may have a potentially powerful therapeutic advantage in ischemic diseases, especially



**Figure 5** Echocardiographic evaluation. (a) Comparison of the left ventricle ejection fraction (LVEF) in two evaluations: echo 1, five days after myocardial infarction (white box); and echo 2, 30 d after cell transplantation (striped box). (b) Differences in the LVEF between echocardiography evaluations 1 and 2, comparing the groups in pairs and all together

MI and stroke.<sup>35</sup> HUCB has been previously described as a potential source of EPCs,<sup>36</sup> but little is known about the optimal culture conditions and differentiation of these cells.<sup>15</sup> Previous studies have demonstrated that circulating CD34<sup>+</sup> cells co-expressing the CD133 maker can be isolated from MNCs.<sup>6,37</sup> Using a similar methodology, we purified CD133<sup>+</sup> cells from HUCB, resulting in a cellular fraction of approximately 75% purity. The frequency of EPCs in bone marrow-derived MNCs is 0.01%.<sup>38</sup> In this study, we obtained approximately 0.64% EPCs from HUCB-derived MNCs, confirming that HUCB is a better source for EPCs.<sup>15</sup>

After deciding on an EPC source, we attempted to establish the optimal conditions for cell expansion. VEGF was one of the growth factors chosen for cultivation, because it has been established to be involved in the first steps of hemoangioblast differentiation and is associated with faster endothelium growth.<sup>20</sup> VEGF could also be important in stimulating growth in relation to neovascularization,<sup>39,40</sup> as it is considered to be an important mitogen for ECs.<sup>41</sup> FGF is a regulator of proliferation; it influences EC growth, differentiation and migration both *in vivo* and *in vitro*.<sup>39</sup> ECs cultivated without b-FGF undergo apoptosis.<sup>42</sup> In clinical trials, co-administration of VEGF and b-FGF led to a faster and more efficient neovascularization than if either growth factor was independently used. It has been proposed that these growth factors promote the differentiation of EPCs into EC-like cells *in vitro*. IGF-I was also chosen, as it is a mitogen that regulates cellular proliferation and differentiation.<sup>43</sup>

There is no consensus regarding the optimal dose for stem cell administration.<sup>44</sup> Extrapolating from the data available on the injected EPC number required to obtain therapeutic efficacy in mice,<sup>37</sup> the number of EPCs required for clinical therapy in humans would exceed the output of most published protocols.<sup>15</sup> We expanded CD133<sup>+</sup> cells in the presence of three growth factors, b-FGF, IGF-I and VEGF.

Cellular proliferation assays obtained with each growth factor showed that the optimal and most statistically significant concentration of b-FGF was 1.0 ng/mL. Different IGF-I and VEGF concentrations were not statistically significant when individually used. When VEGF was analyzed with co-administration of b-FGF and IGF-I (at a constant concentration), a VEGF dose of 50 ng/mL was found to be the most effective and statistically significant. Eighty milliliters of cord blood, a volume that can be routinely extracted from one cord, yields about  $6.23 \times 10^6$  EPCs after expansion. According to Forraz *et al.*,<sup>45</sup> HUCB-derived EPCs exhibit a high proliferative capacity and also demonstrate rapid self-renewal. We found this same result in our study. Growth curves showed up to a 17-fold increase on day 30, and cells had the typical morphology of undifferentiated EPCs. After this point and until the fourth passage (approximately 60 days), the cell population increased up to 70-fold, and they acquired similar morphological and functional phenotypes to ECs, suggesting that the cells lost expression of EPC markers. At this point, the cells continued to proliferate at least until the fourth passage, suggesting that a few undifferentiated cells were still present. The cell number increased by 17-fold at P1, so at this point, these cells could be clinically used, since there is a reasonable number of undifferentiated EPCs that have been passaged for a relatively short period of time.

EPCs are subdivided into two groups: early and late EPCs. Both can induce neovascularization in animals and can synergistically interact with each other.<sup>46</sup> Early EPCs appear within 4–7 days of *in vitro* culture; they are spindle-shaped and express CD14.<sup>14,47</sup> Late EPCs develop after 2–3 weeks of culture; they have a cobblestone pattern, are very proliferative and do not express CD14.<sup>48</sup> Our culture was maintained for 60 days, and the cells continued to significantly expand without any signs of senescence. EC-like colonies appeared around the third week, and they had

the appearance of a cobblestone monolayer. These results were consistent with those reported by Ingram and colleagues,<sup>49</sup> i.e. the expanded cell population was characteristic of late EPCs.

We used flow cytometry to characterize the cell phenotype. Immunophenotyping of MNCs showed the typical phenotype for the hematopoietic lineage, i.e. cells were positive for CD45<sup>50</sup> and CD14, which is characteristic of monocytes.<sup>51</sup> There were practically no cells positive for CD133<sup>52-54</sup> and CD34.<sup>55</sup> Some cells expressed both endothelial and hematopoietic markers<sup>56</sup> and were CD31+.<sup>57</sup> We also observed the presence of CD105-positive cells, which is characteristic of HUCB-derived cells and proliferating ECs.<sup>58</sup> Purified EPCs expressed predominantly CD133, CD34, CD31 and CD105. There was a small percentage of contamination from hematopoietic lineage cells (CD45+). The cells reached confluence after four weeks of culture and displayed a typical EC phenotype, including vWF expression<sup>59</sup> and CD31 enhancement. We observed a reduction in CD34+ and CD105+ cells in the population; however, some cells remained, which was consistent with the previous study by Gross and Herbrig.<sup>38</sup> Our results presented a similar loss of CD133 cells, as previously described by Shmelkov and colleagues.<sup>60</sup> EPCs adopted a more mature endothelial phenotype during their *in vitro* culture and expansion, which was consistent with a previous study.<sup>15</sup>

We evaluated the functional phenotype of CD133+ cells. One important finding is that CD133+ cells only form capillary tubes and express VEGF after induction of differentiation, suggesting that only these cells have the potential to induce vascular regeneration. Samadja and colleagues<sup>61</sup> have demonstrated that bone morphogenetic proteins 2 and 4, which play a key role in endothelial colony-forming cell commitment and outgrowth during neovascularization, were selectively expressed by late EPCs but not by early and circulating EPCs.

During *in vitro* expansion, stem cells experience a long replicative history; thus, they are subject to damage from intracellular and extracellular insults.<sup>62</sup> Therefore, expanded and purified CD133+ cells could show different biological properties when transplanted *in vivo*. We decided to test both populations in terms of their ability to repair myocardial tissue after inducing MI in a rat model.

The rats that received purified CD133+ cells (Group A) and expanded CD133+ cells (Group B) showed a significant improvement in their LVEF, as compared with the control group. The smaller improvement observed for Group B, as compared with Group A, may be related to the lower proliferation rate of these differentiated cells. The high proliferation rate of purified CD133+ cells suggests that these cells would continue to proliferate after injection into the heart. Despite the ventricular enlargement, the results suggest that LV systolic dilation is reduced. Leor and colleagues<sup>11</sup> obtained similar results using  $1.2-2 \times 10^6$  purified HUCB-derived CD133+ cells intravenously injected seven days after permanent coronary artery ligation in athymic nude rats. The cells showed functional recovery as there was abrogation of scar thinning and LV systolic dilation. We used approximately 6-10 times less cells in our

experiments and obtained the same improvement. The direct infusion of the cells into the myocardial scar could explain our results.

The therapeutic effects of EPCs have been recently demonstrated in preclinical studies of hindlimb ischemia,<sup>15,63</sup> strokes<sup>64</sup> and MI.<sup>11</sup> One disadvantage of using HUCB-derived EPCs in clinical trials is the inherent risk of rejection. Previous studies suggest that HUCB-derived cells are not very immunogenic,<sup>65-67</sup> so these cells may be a useful source for cell therapy. In addition, a previous Eurocord study demonstrated that unrelated HLA-mismatched umbilical cord blood transplantation in children with acute leukemia produces comparable results to HLA-matched transplantation with other stem cell sources.<sup>68</sup> However, the reduced immunogenicity of HUCB cells is unproven and warrants further investigation. According to Cho and colleagues,<sup>69</sup> umbilical cord tissue derived cells are major histocompatibility complex (MHC) class I dim and negative for MHC class II. A single injection of MHC-mismatched UTC-derived cells did not induce a detectable immune response. However, when these cells were injected into an inflamed region, repeatedly injected into the same region, or stimulated with interferon  $\gamma$  prior to injection, they were immunogenic. The reported successes of CD133+ and mesenchymal cell allograft-xenografts in animal models encouraged further experiments to test the efficacy of clinical-grade HUCB CD133+ cells in promoting cardiac regeneration using more accurate immunogenicity studies.<sup>70</sup> In summary, the cells from HUCB-compatible MHC donors in cord blood banks have the potential for therapeutic application.

In conclusion, we purified and expanded CD133+ cells *in vitro* up to 70-fold. After 60 days of cultivation, the cells were functionally active *in vitro* and expressed cellular differentiation markers. We observed a significant improvement in the LVEF and attenuation of ventricular remodeling after transplantation of the purified and expanded HUCB-derived CD133+ cells, suggesting that both purified and expanded cells are promising candidates for use in cellular cardiomyoplasty. However, further pre-clinical trials should be performed to elucidate whether expanded CD133+ cells have any clinical advantages over purified CD133+ cells.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Ministry of Health of Brazil and CNPq (552233/2005-6). We would like to thank Marco Stimamiglio for assisting us with the statistical analysis and Dr Vivian Ferreira do Amaral for supervising the harvesting of human umbilical cord bloods. The authors have no competing financial interests.

#### REFERENCES

- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;**348**:1309-21
- Lee MS, Lill M, Makkar RR. Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med* 2004;**5**:82-98

- 3 Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 2005;**115**:572–83
- 4 Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyama A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Zak V, Asahara T, Losordo DW. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation* 2006;**114**:2163–9
- 5 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, Witzensbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;**275**:964–7
- 6 Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;**95**:952–8
- 7 Orlie D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;**410**:701–5
- 8 Smadja DM, Comet A, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P. Endothelial progenitor cells: characterization, *in vitro* expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol* 2007;**23**:223–39
- 9 Goldberg JL, Laughlin MJ, Pompili VJ. Umbilical cord blood stem cells: implications for cardiovascular regenerative medicine. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**42**:912–20
- 10 Hu CH, Li ZM, DU ZM, Zhang AX, Yang DY, Wu GF. Human umbilical cord-derived endothelial progenitor cells promote growth cytokines-mediated neovascularization in rat myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 2009;**122**:548–55
- 11 Leor J, Guetta E, Feinberg MS, Galski H, Bar I, Holbova R, Miller L, Zarin P, Castel D, Barbash IM, Nagler A. Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells* 2006;**24**:772–80
- 12 Cortes-Morichetti M, Frati G, Schussler O, Van Huyen JP, Lauret E, Genovese JA, Carpentier AF, Chachques JC. Association between a cell-seeded collagen matrix and cellular cardiomyoplasty for myocardial support and regeneration. *Tissue Eng* 2007;**13**:2681–7
- 13 Iwaguro H, Asahara T. Endothelial progenitor cell culture and gene transfer. *Methods Mol Med* 2005;**112**:239–47
- 14 Hill JM, Finkel T, Quyyumi AA. Endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction. *Vox Sang* 2004;**87**(Suppl. 2):31–7
- 15 Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin KM, Waltenberger J, Beltinger C. Endothelial progenitor cell culture and differentiation *in vitro*: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res* 2003;**58**:478–86
- 16 Etzion S, Battler A, Barbash IM, Cagnano E, Zarin P, Granot Y, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:1321–30
- 17 Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;**7**:430–6
- 18 Li TS, Hamano K, Hirata K, Kobayashi T, Nishida M. The safety and feasibility of the local implantation of autologous bone marrow cells for ischemic heart disease. *J Card Surg* 2003;**18**(Suppl. 2):S69–75
- 19 Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2003;**58**:390–8
- 20 Menasche P. Cell transplantation in myocardium. *Ann Thorac Surg* 2003;**75**:S20–8
- 21 Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;**108**:2212–8
- 22 Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006;**113**:1287–94
- 23 Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;**361**:45–6
- 24 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wemet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;**106**:1913–8
- 25 Kim EJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Tomita S, Sakai T, Yau TM. Angiogenesis by endothelial cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;**122**:963–71
- 26 Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med* 2004;**8**:488–97
- 27 Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:3422–7
- 28 Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation* 2005;**112**:1178–83
- 29 Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thome T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KE, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007;**115**:3165–72
- 30 Mund JA, Ingram DA, Yoder MC. Case J. Endothelial progenitor cells and cardiovascular cell-based therapies. *Cytotherapy* 2009;**11**:103–13
- 31 Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 2004;**8**:498–508
- 32 Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;**89**:E1–7
- 33 Fritzenwanger M, Lorenz F, Jung C, Fabris M, Thude H, Barz D, Figulla HR. Differential number of CD34+, CD133+ and CD34+/CD133+ cells in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Eur J Med Res* 2009;**14**:113–7
- 34 Scheubel RJ, Zom H, Silber RE, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, Simm A. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol* 2003;**42**:2073–80
- 35 El-Badri NS. Endothelial progenitor cells from cord blood: a new therapeutic promise? *Stem Cells Dev* 2005;**14**:237–8
- 36 Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000;**105**:1527–36
- 37 Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;**95**:3106–12
- 38 Gross P, Herbrig K. Role of endothelial progenitor cells in cardiovascular pathology. *Rocz Akad Med Białymst* 2004;**49**:174–7
- 39 Peters KG, Werner S, Chen G, Williams LT. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development* 1992;**114**:233–43
- 40 Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol* 1999;**154**:355–63
- 41 Shen BQ, Lee DY, Cortopassi KM, Damico LA, Zioncheck TF. Vascular endothelial growth factor KDR receptor signaling potentiates tumor necrosis factor-induced tissue factor expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;**276**:5281–6

- 42 Hartnett ME, Garcia CM, D'Amore PA. Release of bFGF, an endothelial cell survival factor, by osmotic shock. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2945-51
- 43 Zumstein P, Stiles CD. Molecular cloning of gene sequences that are regulated by insulin-like growth factor I. *J Biol Chem* 1987;262:11252-60
- 44 Henning RJ, bu-Ali H, Balis JU, Morgan MB, Willing AE, Sanberg PR. Human umbilical cord blood mononuclear cells for the treatment of acute myocardial infarction. *Cell Transplant* 2004;13:729-39
- 45 Forraz N, Pettengell R, Deglesne PA, McGuckin CP. AC133<sup>+</sup> umbilical cord blood progenitors demonstrate rapid self-renewal and low apoptosis. *Br J Haematol* 2002;119:516-24
- 46 Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, Kim TY, Cho HJ, Kang HJ, Chae IH, Yang HK, Oh BH, Park YB, Kim HS. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 2005;112:1618-27
- 47 Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:288-93
- 48 Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004;104:2752-60
- 49 Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 2005;105:2783-6
- 50 Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:85-116
- 51 Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science* 1988;239:497-500
- 52 Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Wamke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997;90:5013-21
- 53 Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood 'endothelial progenitor cells' are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164-9
- 54 Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004;8:294-300
- 55 Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother* 1992;1:115-29
- 56 Garcia-Porrero JA, Manai A, Jimeno J, Lasky LL, eterlen-Lievre F, Godin IE. Antigenic profiles of endothelial and hemopoietic lineages in murine intraembryonic hemogenic sites. *Dev Comp Immunol* 1998;22:303-19
- 57 Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997;100:525-9
- 58 Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003;17:984-92
- 59 Hoyer LW. The factor VIII complex: structure and function. *Blood* 1981;58:1-13
- 60 Shmelkov SV, Jun L, St CR, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, Costa C, Zhang F, Guo X, Rafii S. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood* 2004;103:2055-61
- 61 Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Cornet A, Laurendeau I, Duong-Van-Huyen JP, Emmerich J, Vidaud M, Aiach M, Gaussem P. Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2137-43
- 62 Lepperdinger G. Aging stem cells and regenerative biomedicine: concepts, opportunities and technological advances. *Exp Gerontol* 2008;43:967
- 63 Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex vivo* expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003;107:1322-8
- 64 Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* 2004;35:2385-9
- 65 Goldstein G, Toren A, Nagler A. Transplantation and other uses of human umbilical cord blood and stem cells. *Curr Pharm Des* 2007;13:1363-73
- 66 Laham RJ, Oettgen P. Bone marrow transplantation for the heart: fact or fiction? *Lancet* 2003;361:11-2
- 67 Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, Gluckman E. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 2000;342:1846-54
- 68 Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, Messina C, Ortega J, Badell-Serra I, Plouvier E, Souillet G, Jouet JP, Pasquini R, Ferreira E, Garnier F, Gluckman E. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood* 1999;93:3662-71
- 69 Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, Chi N, Goldman SN, Lo DP, Harris IR, Popma SH, Sachs DH, Huang CA. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood* 2008;111:430-8
- 70 Bonanno G, Mariotti A, Procoli A, Corallo M, Rutella S, Pessina G, Scambia G, Mancuso S, Pierelli L. Human cord blood CD133<sup>+</sup> cells immunoselected by a clinical-grade apparatus differentiate *in vitro* into endothelial- and cardiomyocyte-like cells. *Transfusion* 2007;47:280-9

(Received June 24, 2009, Accepted November 3, 2009)

## ANEXO H – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA

**EBM***Experimental Biology and Medicine***Human cardiac explant-conditioned medium: soluble factors and cardiomyogenic effect on mesenchymal stem cells**

Andressa V Schittini, Paola F Celedon, Marco A Stimamiglio, Marco Krieger, Paula Hansen, Francisco Diniz Affonso da Costa, Samuel Goldenberg, Bruno Dallagiovanna and Alejandro Correa

*Experimental Biology and Medicine* 2010, 235:1015-1024.  
doi: 10.1258/ebm.2010.010003Updated information and services can be found at:  
<http://ebm.rsmjournals.com/content/235/8/1015>This article cites 42 articles, 15 of which can be accessed free at:  
<http://ebm.rsmjournals.com/content/235/8/1015#BIBL>

© 2008 Society for Experimental Biology and Medicine

## Original Research

# Human cardiac explant-conditioned medium: soluble factors and cardiomyogenic effect on mesenchymal stem cells

Andressa V Schittini<sup>1</sup>, Paola F Celedon<sup>1</sup>, Marco A Stimamiglio<sup>1</sup>, Marco Krieger<sup>1</sup>,  
Paula Hansen<sup>2</sup>, Francisco Diniz Affonso da Costa<sup>3</sup>, Samuel Goldenberg<sup>1</sup>,  
Bruno Dallagiovanna<sup>1</sup> and Alejandro Correa<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Carlos Chagas Institute, R Prof Algacyr Munhoz Mader, 3775, FIOCRUZ; <sup>2</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná; <sup>3</sup>Banco de Homoenxertos Valvares da Santa Casa de Curitiba; <sup>4</sup>Molecular Biology Institute of Paraná, Curitiba, PR, Brazil  
Corresponding author: Alejandro Correa, Carlos Chagas Institute, R Prof Algacyr Munhoz Mader, 3775, FIOCRUZ, Curitiba, PR 81350-010, Brazil. Email: alejandro@tecpar.br

### Abstract

The use of conditioned medium (CM) from human cardiac explants (HCEs) as a potential source of paracrine factors for adult stem cell signaling has never been evaluated. We hypothesized that HCEs might provide a source of soluble factors triggering the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) into cardiomyocyte-like cells. By using two-dimensional electrophoresis (2-DE) gels/mass spectrometry and antibody macroarray assays, we found that HCEs release macromolecules, including cytokines, growth factors and myocardial and metabolism-related proteins into the culture medium. We identified a total of 20 proteins in the HCE-CM. However, as shown by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and 2-DE, these 20 proteins account for only a fraction of the total number of proteins present in the HCE-CM. We also found that CM increased the proliferation of bone marrow-derived-MSCs (BM-MSCs) *in vitro*. Unlike the other effects, this effect was most evident after 48 h of culture. Moreover, we examined the effect of HCE-CM on levels of mRNA and protein for specific cardiac markers. We showed that a surprisingly big fraction of BM-MSCs (3.4–5.0%) treated *in vitro* with HCE-CM became elongated and began to express cardiac markers, consistent with their possible differentiation into cardiomyocyte-like cells. Our *in vitro* model may be useful not only *per se*, but also for studies of the mechanisms of action of soluble factors involved in cell differentiation, paving the way for possible new protein-based treatments in the future.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, conditioned medium, human cardiac explant, cytokines, growth factors

*Experimental Biology and Medicine* 2010; 235: 1015–1024. DOI: 10.1258/ebm.2010.010003

### Introduction

Following myocardial infarction, human cardiomyocytes undergo mitosis to repair the damage. It has also been shown that endogenous or transplanted stem cells contribute to the regeneration of damaged cardiac tissue.<sup>1–4</sup> Nonetheless, major myocardial infarctions lead to replacement of the functional tissue by a fibrotic non-contractile tissue. The proliferative potential of the cardiomyocytes and the number of stem cells capable of differentiating into cardiac myocytes are limited, restricting the potential for complete, functional regeneration after injury. In particular, the regenerative potential is too low to prevent the progression of postinfarction cardiac dysfunctions.<sup>5</sup> Efforts are therefore being made to identify strategies for increasing the myocardial mass after injury.

It has been shown that bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) can differentiate into cardiomyocytes

*in vitro* or *in vivo*.<sup>6,7</sup> Several methods have been used to promote the differentiation of stem cells into specific cell types, including cardiomyocyte-like cells. These methods include the co-culture of stem cells with differentiated somatic cells,<sup>8</sup> treatment with cardiac tissue extracts,<sup>9</sup> treatment of MSCs with chemicals such as 5-azacytidine<sup>10</sup> and the treatment of embryonic or adult stem cells with nitric oxide donors.<sup>11,12</sup> Most of these methods are inefficient, resulting in the generation of only a small percentage of differentiated cells after treatment.

In a very different model designed to promote chondrogenic differentiation, it has recently been shown that cartilage explants release soluble signaling factors into the culture medium and that these factors induce the differentiation of adult rat marrow stromal cells into chondrocyte-like cells.<sup>13</sup> The use of conditioned medium (CM) from human cardiac explants (HCEs) as a potential source of



paracrine factors for adult stem cell signaling has never been evaluated. We hypothesized that HCEs might provide a source of soluble factors triggering the differentiation of MSCs into cardiomyocyte-like cells. This system could also be used as a model of cardiac repair *in vitro*.

We identified some of the soluble growth factors and cytokines released by cardiac explants. We also showed that the treatment of BM-MSCs with explants-CM induced the expression of cardiac markers, in terms of both mRNA and protein production, consistent with the putative differentiation of these MSCs into cardiomyocyte-like cells.

## Materials and methods

### Ethical issues

All human samples used in this work were collected in accordance with guidelines for research involving human subjects and the 1975 Helsinki Declaration. The study was approved by the ethics committee of the Oswaldo Cruz Foundation (approval number 419/07).

### Isolation of HCEs and preparation of CM

Cardiac tissue was obtained from the material discarded during valve dissection. Pericardium/epicardium and endocardium were removed and the myocardium (auricle and ventricle) was processed. We cut 600 mg of cardiac tissue into 1 mm<sup>3</sup> pieces, transferred them to a sterile tube and washed them three times with phosphate-buffered saline (PBS) to remove cellular debris. Tissue fragments were dispersed in equal quantities into 75 cm<sup>2</sup> culture flasks (150 mg/flask) containing 20 mL of Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) without fetal calf serum (FCS) and cultured as explants. Explants were cultured for six days, with complete replacement of the medium every other day. The medium was collected, passed through a filter with 0.70 μm pores (BD Falcon cell strainer) and then through a filter with 0.22 μm pores (thiamine pyrophosphate). The final filtrate was stored at -20°C until use.

### Protein sample preparation for two-dimensional electrophoresis

Just before the assay, samples were thawed on ice. Protease inhibitor (1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride and 10 μmol/L *N*-α-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone) was added and total protein was concentrated by precipitation with a 95% saturated solution of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and re-suspended in 500 μL of ultra-pure water (18.2 MΩ grade). Excess salts were removed and the buffer was changed by dialyzing the sample for 30 h against focusing buffer (7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 10 mmol/L Tris-HCl [pH 8] and 10 mmol/L dithiothreitol [DTT]), using a mini-dialysis kit (GE Healthcare, WI, USA) with a cutoff point of 1 kDa. Before electrophoresis in the first dimension, disulfide bonds were reduced by incubation with 10 mmol/L DTT (45 min at 60°C) and alkylated by incubation with 55 mmol/L iodoacetamide and 10 mmol/L DTT (30 min at

room temperature). Protein concentration was determined with the 2D-Quant Kit (GE Healthcare).

### Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

We solubilized 150 μg of protein in 100 μL of focusing buffer supplemented with 0.5% immobilized pH gradient (IPG) buffer (pH 4-7) (GE Healthcare) and 10% isopropanol. Samples were cup-loaded onto an IPG strip (18 cm, pH 4-7, GE Healthcare) and focused under the following conditions: 50 V-1 h, 100 V-1 h, 300 V-1 h, 500 V-1 h, 1000 V-1 h, 2000 V-1 h, 4000 V-2 h and 6000 V-10 h. For the second dimension, strips were treated for 20 min with equilibration buffer (6 mol/L urea, 30% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate [SDS], 50 mmol/L Tris-HCl [pH 8]) supplemented with 2% DTT and then for 20 min in the same buffer supplemented with 2.5% iodoacetamide. Gels were silver-stained, as described by Blum *et al.*<sup>14</sup>

### Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight/time of flight analysis

Protein spots were manually extracted for mass spectrometry analysis in the 10-70 kDa range. The more intensely stained and well-resolved spots were selected for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight/time of flight (MALDI-TOF/TOF) analysis. Gel pieces were de-stained, and proteins were reduced (20 mmol/L DTT), alkylated (55 mmol/L iodoacetamide) and digested with 10 ng/μL trypsin (Promega, WI, USA) in 50 mmol/L ammonium bicarbonate. Peptides were extracted (50% acetonitrile, 1% trifluoroacetic acid [TFA]), dried on a Speed Vac and re-suspended in 1 μL of 0.1% TFA for analysis. Peptide sample was mixed 1:1 (v/v) with crystallization solution (5 mg/L 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile, 0.1% TFA) and immediately spotted onto a MALDI plate. Mass spectra were obtained by MALDI-TOF/TOF in a mass spectrometer (Autoflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) operating in positive mode. The Xml extension files containing mass lists were generated with FlexAnalysis software v 2.0 (Bruker Daltonics, MA, USA) and proteins were identified with the Mascot search engine and public databases (NCBI).

### Antibody array and analysis

For identification of the growth factors and cytokines released from the HCEs, 1 mL of HCE-CM without FCS (HCE-CM) or non-conditioned IMDM FCS-free (NCM) was assayed with the RayBio™ growth factor and cytokine array (Raybiotech, GA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, the membranes were blocked by incubation for 30 min in 5% bovine serum albumin (BSA) in 0.01 mol/L Tris buffer supplemented with 0.15 mol/L NaCl (pH 7.6) and then incubated for two hours in 1 mL of HCE-CM or NCM at room temperature. The membranes were washed and incubated with biotin-coupled anticytokine and antigrowth factor antibodies for two hours, washed again and incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin for two hours. We incubated each

membrane with 1 mL of detection reagent (prepared by mixing equal volumes of detection buffers A and B) for 5–10 min and then placed it against X-ray film. Films were developed after various durations of exposure to the membrane (5, 10 and 40 s).

The films were scanned and the data were input into ScanAnalyze 2.5 software ([www.graphics.stanford.edu/software/scanalyze](http://www.graphics.stanford.edu/software/scanalyze)) for obtaining the raw intensity values of each spot. The normalized intensity of each spot was determined with the Raybio<sup>®</sup> Analysis Tool. Values were calculated with respect to positive controls and statistical analysis was carried out with GraphPad Prism 5 software. All values are expressed as means  $\pm$  standard errors of mean and we compared variables between groups by two-way analysis of variance. Values of  $P < 0.05$  were considered significant.

#### Isolation and culture of MSCs

The MSCs used in this study have been isolated from BM and characterized previously by Rebelatto *et al.*<sup>15</sup> Cells were cultured with IMDM (Gibco, NY, USA) supplemented with 15% FCS, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. All experiments were performed with MSCs in passage 3.

#### Culture of MSCs with cardiac explant-CM

Biological triplicates of BM-MSCs were cultured into six-well/plates ( $8 \times 10^4$  cells) and 24-well/plates ( $4 \times 10^4$  cells). The cells were maintained in IMDM supplemented with 15% FCS until they reached 80% confluence. To maintain the same culture conditions for the three biological triplicates of BM-MSCs used in this experiment, the HCE-CM samples were pooled and both media (pooled HCE-CM and NCM) were then supplemented with 5% FCS. After that, BM-MSCs were cultured with a 1 mL pool of either HCE-CM or NCM in six-well plates and a 500  $\mu$ L pool of HCE-CM or NCM in 24-well plates. The BM-MSCs were cultured for up to three weeks at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every three days. Viable cells were counted, following trypan blue staining, in a Neubauer chamber, for comparison of the numbers of BM-MSCs cultured in HCE-CM and NCM media.

#### Cell proliferation assay

Cell proliferation assay was performed by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (100  $\mu$ mol/L BrdU for 24 h) and labeling according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen, NY, USA) with minor modifications. Briefly, the proliferative activity of BM-MSCs was evaluated before and after 48 h of incubation with NCM or HCE-CM. BrdU incorporation was detected using anti-BrdU antibody labeled with Alexa Fluor 488 and analyzed in a FACSCalibur device (BD Bioscience, CA, USA) equipped with CellQuest software. Cell proliferation assays were carried out in duplicate.

#### Total RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from cultured MSCs with the RNeasy kit (QIAGEN, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA was treated with DNase I (QIAGEN) and its concentration was determined with a nanodrop device (ND-100-UNISCIENCE spectrophotometer). We synthesized the first-strand cDNA from 1  $\mu$ g of total RNA, using 1  $\mu$ L of 10 mmol/L oligo-dT primer (USB Corporation, OH, USA) and 1  $\mu$ L of reverse transcriptase (IMRPOM II, Promega) according to the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out with 20 ng of cDNA as the template, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L KCl, 10 pmol of primers, 5 mmol/L of MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mmol/L of dNTPs and 0.6 U *Taq* polymerase (Invitrogen). PCR primer sequences are listed in Table 1. We subjected 20  $\mu$ L of reverse transcription (RT)-PCR products to electrophoresis in a 2% agarose gel. The bands obtained were visualized by ethidium bromide staining and photographed under ultra-violet transillumination (UV White Darkroom, UVP Biomaging Systems, CA, USA).

#### Immunofluorescence

Cultured MSCs were washed three times with PBS and fixed by incubation for 5 min in 4% paraformaldehyde. The cells were then permeabilized by incubation for 30 min in 0.5% Triton X-100 in PBS and blocked by incubation for 60 min with 5% PBS-BSA. Blocked cells were

Table 1 Primer sets used for RT-PCR analyses

Gene	Sequence (5'–3')	Accession number	Amplicon size (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
GAPDH	F: GGCGATGCTGGCGTGAGTAC R: TGGTTCACACCCATGACGA	NM 2597	150	55
Cx43	F: CCTTCTTGCTGATCCAGTGGTAC R: ACCAAGGACACCACAGCAT	NM 65188	154	62
cTnI	F: GGGGGCCCGGGCTAAGGAGTC3 R: AGGGCAGGGCAGTAGGCAGGAAG	NM 000363.4	183	60
cTnT	F: AGGAGAAGTTCAAGCAGCAGA R: GCGAGCGAGGAGCAGAT	NM 000364.2	155	55
Nkx2.5	F: GGTCTATGAACTGGAGCGGC R: ATAGGCGGGTAGGCGTTAT	AB021133	322	60
VEGF	F: CTACCTCCACCATGCCAAGTG R: TGCGCTGATAGACATCCATGA	M27281	101	60

RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Cx43, connexin 43; cTnI, cardiac troponin I; cTnT, cardiac troponin T; Nkx2.5, NK2 transcription factor-related, locus 5; VEGF, vascular endothelial growth factor

incubated for one hour at 37 °C with goat anti-human troponin I, goat anti-human troponin T, mouse anti-human  $\alpha$ -actinin and mouse anti-human connexin-43 polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluted 1:200. The secondary antibodies, Alexa 488-conjugated anti-goat IgG antibody (Invitrogen) diluted 1:400 and Alexa 456-conjugated anti-mouse IgG antibody (Invitrogen), diluted 1:400, were added to the cells, which were then incubated for 30 min. Nuclei were stained by incubation with 4',6-diamidino-2'-phenylindole (DAPI) for five minutes at room temperature. All the antibodies were diluted in PBS-BSA. Samples were photographed with a Nikon E-600 optical immunofluorescence microscope. For a semi-quantitative analysis of differentiation, the percentages of cells positive for troponins I and T were calculated from 10 random fields (20X), with ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

## Results

### HCE-CM contains cytokines, growth factors, structural and metabolic proteins

Proteins present in the HCE-CM were precipitated and initially analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), which

showed the sample to be highly complex, containing a wide range of proteins of various sizes, from small polypeptides to high-molecular weight proteins (Figure 1). Despite the thorough washing of the explants before culture, we suspected that some, possibly even most of the proteins seen in the CM, might be the products of explant manipulation and necrosis and/or apoptosis of the pieces of tissue during culture time. A more complete view of the proteome was obtained by subjecting protein samples to two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and analyzing some of the spots obtained by MALDI-TOF/TOF. Gels with narrower pH ranges (4 to 7) gave the best resolution. Most of the significant identifications ( $EV < 10^{-3}$ ) corresponded to structural and metabolism-related proteins (Table 2). The loading of larger amounts of sample would have decreased the resolution, making it harder to identify proteins due to the large number of proteins with molecular weights of up to 70 kDa.

In addition to 2-DE/MALDI-TOF/TOF, we also carried out antibody array analyses to identify the cytokines and growth factors released by the human cardiac tissue. A comparison, by eye, of the HCE-CM and NCM membranes clearly demonstrated that some cytokines and growth factors were present on the HCE-CM membrane, but not on the NCM membrane (Figure 2a). Reproducibility was high for the four samples analyzed. Statistical

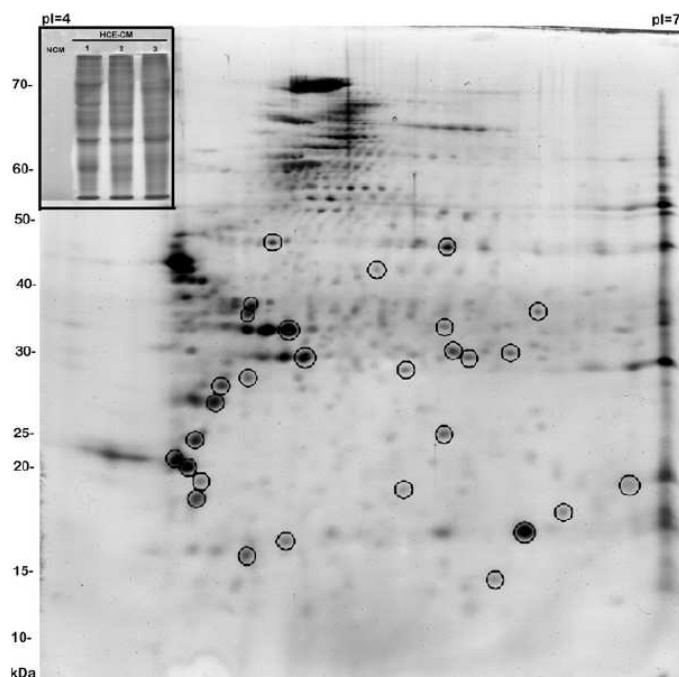


Figure 1 Separation of the proteins present in HCE-CM by SDS-PAGE and 2-DE. The proteins present in HCE-CM were precipitated and analyzed by SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel). Numbers 1, 2 and 3 correspond to the biological replicates (inserted top left panel). The proteins in the HCE-CM were also analyzed by 2-DE. Assays were performed in two different pI ranges (3–10 and 4–7). A representative gel is shown for the pI 4–7 range. Indicated spots (circled spots) were excised and subjected to in-gel digestion with trypsin. The resulting peptides were identified by MALDI-TOF/TOF (see Table 2). NCM, non-conditioned medium; HCE-CM, human cardiac explant-conditioned medium; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; 2-DE, two-dimensional electrophoresis

Table 2 Proteins identified in the CM by 2-DE

Protein	EV	Gene ID
TPH1	5.60E - 13	7167
ACTN3	3.50E - 08	89
MDH1	8.00E - 05	4190
DCI	3.80E - 04	1632
MyBPC	4.20E - 04	4607
ACTA2	5.50E - 05	59
SOD2, mitochondrial	5.70E - 04	6648
ACTC1	1.00E - 03	70
MYL4	4.00E - 03	4635
MYLK	5.90E - 03	4638

CM, conditioned medium; 2-DE, two-dimensional electrophoresis; EV, expected value; TPH1, triose phosphate isomerase 1; ACTN3, actinin, alpha 3; MDH1, malate dehydrogenase 1; DCI, dodecenoyl-coenzyme A delta isomerase; MyBPC, cardiac myosin binding protein C; ACTA2, actin, alpha 2, smooth muscle; SOD2, superoxide dismutase 2; ACTC1 actin, alpha, cardiac muscle 1; MYL4, myosin, light chain 4; MYLK myosin light chain kinase

analysis showed that four of the 23 detectable cytokines on the antibody arrays were present in significant amounts in the CM ( $P \leq 0.05$ ). These cytokines were as follows: growth-regulated oncogene (GRO), interleukin-6 (IL-6), IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Figure 2b). Six of the 41 growth factors detectable on the antibody arrays were present in significantly larger amounts ( $P \leq 0.01$ ) in the HCE-CM. These growth factors were: basic-fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-2 and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Figure 2c). The fluorescence intensity of the spots on the HCE-CM membranes ranged from approximately 1.5 to approximately 12 times the background signal (NCM). For example, IL-6 signal intensity on HCE-CM membranes was almost 10 times that on NCM membranes, whereas IL-8 signal intensity on HCE-CM membranes was only 1.5 times higher than the background signal, although this difference was nonetheless significant ( $P < 0.05$ ).

These results suggest that HCE-CM is a source of paracrine factors, such as cytokines, growth factors and other proteins and unidentified molecules.

#### HCE-CM increases the proliferation of BM-MSCs in culture and induces the differentiation of these cells into cardiomyocyte-like cells *in vitro*

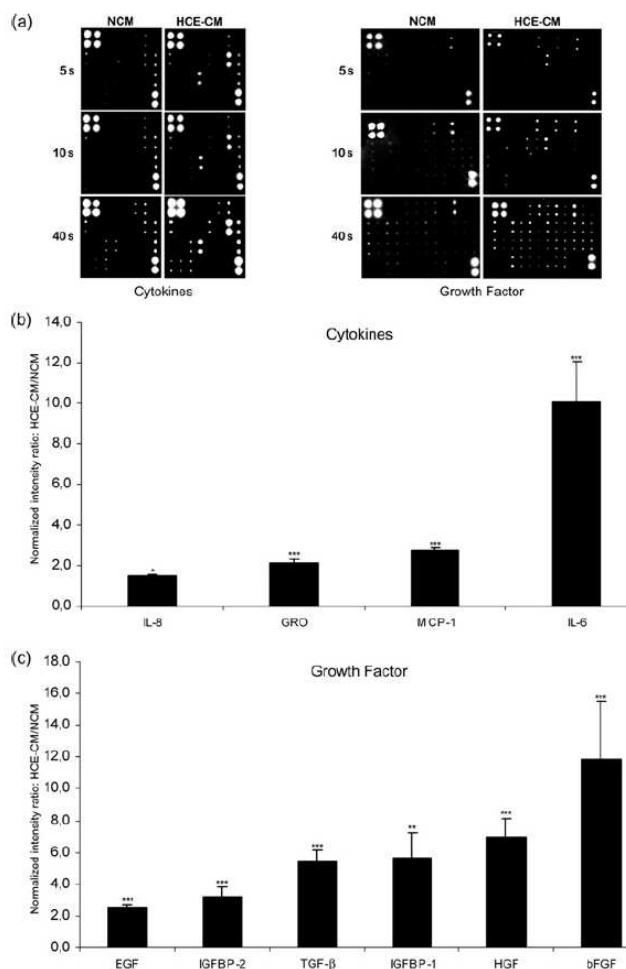
The total number of viable BM-MSCs was higher in the HCE-CM-treated cultures than in the NCM-treated cultures as established by trypan blue staining and counting in Neubauer chamber. To determine if this increase in cell number was caused, at least in part, by an increase in cell proliferation, BrdU incorporation experiments were carried out. Following the treatment of BM-MSCs with HCE-CM for 48 h, the percentage of proliferating BM-MSCs was 1.5- to 1.8-fold higher than in the NCM-treated cells (Figure 3). The result from two BM-MSCs samples were plotted individually due to the different cell cycle kinetics seen between patients

(Figure 3a). Proliferation increase in HCE-CM-treated cells is quite evident after 48 h in the representative FACS histograms (Figure 3b) and also in microscopy images of the cultures (Figure 3c).

We also examined the effect of HCE-CM, during the first and third weeks of treatment, on levels of mRNA and protein for specific cardiac markers (troponins I and T,  $\alpha$ -actinin, Nkx 2.5, connexin-43) and an angiogenic factor (vascular endothelial growth factor [VEGF]) in BM-MSCs. Most of the effects of CM on BM-MSCs were evident after one week of culture, but were much more marked at the third week, for the three BM-MSCs replicates analyzed. RT-PCR was used to determine mRNA levels. Troponin T, troponin I, Nkx 2.5, connexin-43 and VEGF transcript levels were higher in all HCE-CM-treated samples than in NCM-treated cells. However, BM-MSCs spontaneously expressed some of the genes analyzed, to some extent (Figure 4).

Indirect immunofluorescence analyses of protein distribution in BM-MSC cultures demonstrated clear differences between treated and untreated samples. After one week of culture, a subpopulation of cells positive for troponin I (Figure 5a and e), troponin T (Figure 5c and g) and  $\alpha$ -actinin (Figure 5d and h) was detected in all the HCE-CM-treated samples but not in the NCM-treated samples. Most of the cells positive for these cardiac markers were spindle shaped, with elongated nuclei, as shown by DAPI staining (Figure 5). As stated above, cardiac markers were more strongly expressed after three than after one week, whether we considered the absolute numbers of cells expressing these markers or the fluorescence intensity of the elongated cells (Figure 5i, k, l, m, o and p). Again, the control cultures (treated with NCM) also included cells positive for these markers, but in much smaller numbers than for the HCE-CM-treated cultures. Differently to these markers, connexin-43 was present in most of the NCM- and HCE-CM-treated cells. Nevertheless, connexin-43 staining was seen in the boundaries between adjacent elongated cells in the cultures treated with HCE-CM for three weeks.

A semi-quantitative analysis of cells positive for troponins T and I showed that HCE-CM-treated BM-MSC cultures contained four times as many positive, spindle-shaped cells with elongated nuclei than NCM-treated cells. The percentage of cells reacting with antibodies against troponins I and T was determined by analyzing 10 random fields from each sample and for each marker. After one week, the mean percentages of cells positive for troponins I and T were 3.4 ( $\pm 1.3$ ) and 3.9 ( $\pm 1.7$ ), respectively. After three weeks of treatment with HCE-CM, the mean percentages of cells immunopositive for troponins I and T were 4.7 ( $\pm 1.7$ ) and 5.0 ( $\pm 2.2$ ), respectively. The ratio of the proportion of positive HCE-CM- to NCM-treated cells was about 4.0 in all cases, with no significant differences between markers or weeks of treatment. These results suggest that the stronger effects of HCE-CM after three weeks than after one week result from a larger absolute number of positive cells rather than an increase in the percentage of immunopositive cells.



**Figure 2** Growth factors and cytokines present in HCE-CM. (a) Antibody array analysis. Membranes were placed against X-ray film for various durations (5, 10 and 40 s). The film was then developed and the image was scanned and input into Scanalyze software for analysis. Values for each spot were calculated and normalized by subtracting the background signal from blank spots and dividing by the mean value for positive controls. Eight values were generated for each factor, from four biological replicates and four technical duplicates. Error bars indicate the standard error for the four biological replicates. (b) Graphical representation of cytokines and (c) growth factors present in significant amounts ( $P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ) in HCE-CM, as determined by comparison with the background signal generated for NCM membranes (y-axis = normalized intensity ratio: HCE-CM/NCM). Error bars represent the standard error for the four biological replicates. HCE-CM, human cardiac explant-conditioned medium; NCM, non-conditioned medium; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; IL, interleukin; GRO, growth-regulated oncogene; MCP, monocyte chemoattractant protein; EGF, epidermal growth factor; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; HGF, hepatocyte growth factor; bFGF, fibroblast growth factor

## Discussion

We found that HCE release macromolecules, including cytokines, growth factors and myocardial and metabolism-related proteins into the culture medium. We identified a total of 20 proteins in the cardiac explant-CM. However, as shown by SDS-PAGE and 2-DE, these 20 proteins account for only a fraction of the total number of proteins present in the HCE-CM. A high-throughput approach is required for full characterization of the CM. We are currently working on a proteomics project aiming to generate

an exhaustive list of the proteins present. We also found that CM increased the number of treated BM-MSCs *in vitro* at least partially due to induced proliferation. It remains unclear as to whether HCE-CM also has a cytoprotective/antiapoptotic effect. Furthermore, we showed that a fraction of BM-MSCs treated *in vitro* with HCE-CM became elongated and began to express cardiac markers, consistent with their possible differentiation into cardiomyocyte-like cells.

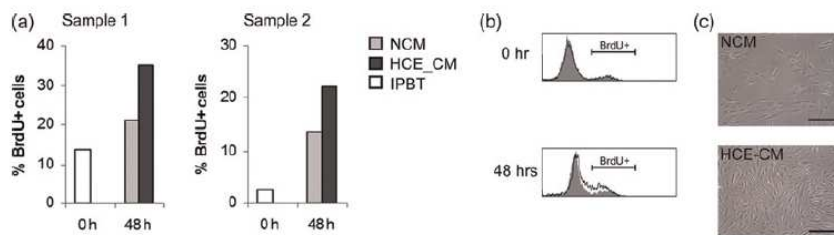


Figure 3 Effect of conditioned medium on MSC proliferation. (a) Graphs showing the percentage of BrdU-positive proliferating cells on two different samples of BM-MSC cultured in HCE-CM or NCM for 48 h. The open bar represents the proliferation rate of the initial cell population (0 h) of both BM-MSCs before NCM or HCE-CM treatment (IPBT). (b) Representative histograms of BrdU-positive proliferating cells cultured in HCE-CM (open histogram) or NCM (gray area) at 0 and 48 h. (c) Representative images (differential interference contrast (DIC) microscopy) of BM-MSCs cultured with NCM and HCE-CM for 48 h. Scale bar: 30  $\mu$ m. MSC, mesenchymal stem cells; BrdU, bromodeoxyuridine; BM, bone marrow; HCE-CM, human cardiac explant-conditioned medium; NCM, non-conditioned medium; IPBT, initial population before treatment

The heart is a complex organ consisting of several different cell types and tissues. Cardiomyocytes are the main cellular component of the heart, but non-muscle cells such as endothelial cells, mesenchymal cells, fibroblasts, smooth muscle cells and leukocytes are also present. All these cells are potential sources of paracrine factors that might help to repair cardiac tissue after injury (cell growth and differentiation). Adult, resident stem cells have also been found in the heart. These undifferentiated cells reside, in extremely small numbers, among the differentiated cells in mature organs or tissues.<sup>16</sup> They have been shown to produce and secrete a wide range of cytokines, chemokines and growth factors potentially involved in cardiac repair.<sup>17</sup> In this context, we hypothesized that cardiac explants might release a set of factors participating in cardiac repair.

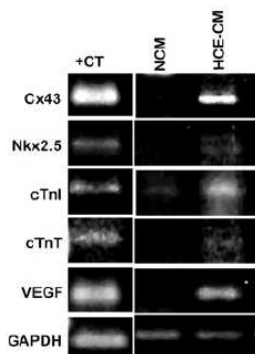
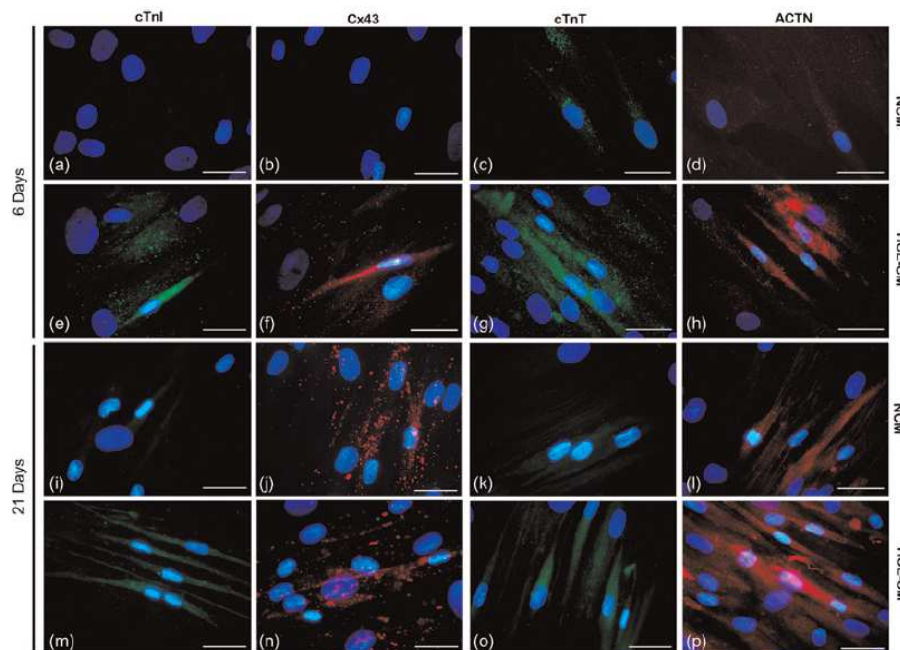


Figure 4 Gene expression profiling by RT-PCR. RT-PCR analysis of mRNA levels for cardiac markers. Representative results of three independent experiments, after 21 d of culture, are shown. We used mRNA isolated from NCM-treated cells as a negative control and mRNA isolated from cardiac tissue as positive control (+CT). GAPDH was used as an internal control. Cx43, connexin 43; Nkx2.5, NK2 transcription factor-related, locus 5; cTnI, cardiac troponin I; cTnT, cardiac troponin T; VEGF, vascular endothelial growth factor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; NCM, non-conditioned medium; HCE-CM, human cardiac explant-conditioned medium

Using explant culture, a technique for the isolation of cells from fragments of body tissue, Barile *et al.*<sup>18</sup> showed that left atrial or ventricular biopsy specimens could generate a layer of migratory cells. In this study, we used tissue fragments exclusively as a source of paracrine factors. We cultured the explants for six days to condition the medium, and we observed no cell migration from them. Cell migration from cardiac explants takes at least two weeks of culture.<sup>4</sup> However, we nonetheless continued to culture the explants for four weeks, to check that they were viable. In fact, all the explants used to condition the medium in this study were viable and different cells had migrated from them after two weeks of culture (data not shown).

Structural (cMyBP-C and  $\alpha$ -actin) and metabolic (triose phosphate isomerase and malate dehydrogenase) proteins were detected by 2-DE/MALDI-TOF/TOF. Despite thorough washing of the explants before culture, these proteins were probably present as a result of the mechanical dissociation required to obtain cardiac explants or due to the normal necrotic/apoptotic process occurring during culture. Several studies have identified candidate biomarkers for the analysis of proteins released into the blood after myocardial injury. Structural myocardial proteins, such as the cardiac troponins, have been detected in the bloodstream and are currently used as serum markers for myocardial cell necrosis and/or myocardial ischemia. Moreover, the concentrations of these proteins in the serum are associated with the severity of the injury.<sup>19–21</sup> MyBP-C has been detected in mouse hearts subjected to ischemia reperfusion,<sup>22</sup> in dog hearts subject to low-flow rate ischemia<sup>23</sup> and in the plasma of mice with acute myocardial infarction.<sup>24</sup> The study on mice with myocardial infarction anticipated cMyBP-C as an excellent new candidate biomarker of infarction, due to the high levels of this protein found in the bloodstream after injury and the rapidity of the response. The presence of cMyBP-C and other non-secreted proteins in HCE-CM suggests that our experimental model may be of potential value for use in studies of cardiac injury and repair mechanisms.

Antibody array analysis demonstrated the presence of many secreted cytokines and growth factors in HCE-CM.



**Figure 5** Indirect immunofluorescence analysis. Indirect immunofluorescence analysis of the expression of cardiac markers. BM-MSCs were treated with NCM (a–d; i–l) and HCE-CM (e–h; m–p) for six days (a–h) and 21 d (i–p). Immunofluorescence analyses were performed for the markers indicated at the top. Days of treatment are shown on the left and the medium used for MSC culture is shown on the right (HCE-CM or NCM). Cell nuclei are stained with DAPI (blue). Representative results from three independent experiments are shown. Scale bar = 30  $\mu$ m. Cx43, connexin 43; cTnI, cardiac troponin I; cTnT, cardiac troponin T; ACTN,  $\alpha$ -actinin; BM-MSC, bone marrow-derived mesenchymal stem cells; NCM, non-conditioned medium; HCE-CM, human cardiac explant-conditioned medium; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole (A color version of this figure is available in the online journal)

One of these molecules, IL-6, has been shown to be released in response to the stress caused by myocardial injury.<sup>25</sup> In the acute phase of myocardial infarction, inflammatory activation is enhanced, with a predominantly proinflammatory response and high serum concentrations of IL-6.<sup>26</sup> IL-6 is a pleiotropic cytokine responsible for many different processes, including the regulation of cell growth, apoptosis, survival and differentiation in various cell types and organs, including the heart.<sup>27</sup> The local or systemic production of inflammatory mediators may influence not only MSC migration to injured tissues,<sup>28–30</sup> but also MSC proliferation, differentiation<sup>31</sup> and engraftment.<sup>32</sup>

Moreover, cytokines, such as IL-6, can induce the secretion of important chemokines involved in the regulation of angiogenesis.<sup>33</sup> The IL-8, GRO and MCP-1 chemokines are also detected in the HCE-CM. The healing of the myocardium after infarction involves changes in the adhesive interactions between endothelial cells in the pre-existing vasculature and extracellular matrix, under the control of locally produced factors (cytokines, chemokines). These changes lead to endothelial cell migration, proliferation, re-organization and microvessel formation.<sup>34</sup> Indeed, the IL-6 released into the HCE-CM may induce the secretion of MCP-1, IL-8 and GRO into the medium. Kocher *et al.*<sup>34</sup> found that the production of IL-8 and GRO by endothelial cells regulated the ability of chemokines to induce

myocardial neovascularization, and mediated protection against cardiomyocyte apoptosis and the recovery of cardiac function. The cytokines present in HCE-CM may therefore work together to repair the myocardial injury caused by the cutting of cardiac tissue, by increasing the number of cells or inducing cardiomyocyte differentiation.

Growth factors, such as bFGF, EGF, HGF, IGFBP-1 and -2 and TGF- $\beta$ , were also present in HCE-CM. Some of these factors play a role in tissue repair and, as reported previously, are also crucial for cardiomyocyte specification during development. It has also been shown that FGF, EGF, TGF and IGFBP play a role not only in embryo development, but also in the cardiogenic potential of embryonal carcinoma cells in culture.<sup>35,36</sup> TGF- $\beta$  is a multipotent factor associated with neovascularization, decreasing inflammatory signals and inducing MSC differentiation. Li *et al.*<sup>37</sup> reported the induction by TGF- $\beta$  of the differentiation of BM-MSC into immature cardiomyocytes, and Abarbanell *et al.*<sup>38</sup> reported a correlation between prolonged exposure to TGF- $\beta$  and HGF *in vitro* with cardiac surface marker expression on BM-MSCs. Similarly, we showed that HCE-CM containing TGF- $\beta$ , HGF, bFGF and IGFBP-1 and -2 induced an increase in cardiac marker expression, as indicated by RT-PCR and immunofluorescence assays. Zhu *et al.*<sup>36</sup> have shown that IGFBP-4 induces cardiomyocyte differentiation by antagonizing Wnt/ $\beta$ -catenin and,

other members of the IGFBP family, such as IGFBP-1 and -2, are genetically redundant with IGFBP-4. Accordingly, we are currently studying how IGFBP-1 and -2 might affect proliferation and cardiomyocyte differentiation of BM-MSCs in culture.

NCM-treated BM-MSCs also produced mRNA and protein for some cardiac markers. The spontaneous expression of muscle markers by MSCs has been reported before,<sup>10,39–41</sup> and Verfaillie's group described MSCs as 'pluridifferentiated' cells.<sup>42</sup> Alternatively, as it was observed in this work, it might be due to the spontaneous differentiation of a small fraction of cells.

In conclusion, this study demonstrates that HCEs release cytokines and growth factors into the medium and that these molecules induce the proliferation and differentiation of human BM-MSCs into cardiomyocyte-like cells. Moreover, our *in vitro* model may be useful for studies of the mechanisms of action of soluble factors involved in cell differentiation, paving the way for possible new protein-based treatments in the future.

**Author contributions:** AVS and AC conceived and designed the experiments and wrote the paper; AVS performed the experiments; AVS, PFC and MK performed the 2-DE experiments; AVS, MAS and AC interpreted the studies and analyzed the data; FDAC and PH supplied biological samples and assisted with BrdU experiments; and SG and BD analyzed the data and reviewed the manuscript.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Maurilio Soares, Criscielle Kuligovski, Alessandra Mello de Aguiar, Patricia Shigunov and Jaiesa Zych for technical assistance. We also thank the staff of the *Banco de Homoeoxertos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba* and the *Laboratório Experimental de Cultivo Celular/PUC-PR* for sample collection. MK and SG are research fellows of the CNPq. This work was funded in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### REFERENCES

- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763–76
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone-marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701–5
- Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:8692–7
- Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Casca Pera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:14068–73
- Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 2007;87:521–44
- Yuasa S, Fukuda K. Cardiac regenerative medicine. *Circ J* 2008;72 (Suppl. A):A49–55
- Strauer BE, Schultheiss HP. Inflammatory diseases of the heart. *Der Internist* 2008;49:5–6
- Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol* 2006;109:74–81
- Liu XN, Yin Q, Zhang H, Zhang H, Zhu SJ, Wei YJ, Hu SS. Tissue extracts from infarcted myocardium of rats in promoting the differentiation of bone marrow stromal cells into cardiomyocyte-like cells. *Biomed Environ Sci* 2008;21:110–7
- Antonitis P, Papagiannaki EL, Kaidoglou A, Papakonstantinou C. *In vitro* cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact Cardiovasc Thoracic Surg* 2007;6:593–7
- Kanno S, Kim PK, Sallam K, Lei J, Billiar TR, Shears LL. Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:12277–81
- Rebelatto CK, Aguiar AM, Senegaglia AC, Aita CM, Hansen P, Barchiki F, Kuligovski C, Olandoski M, Moutinho JA, Dallagiovanna B, Goldenberg S, Brofman PS, Nakao LS, Correa A. Expression of cardiac function genes in adult stem cells in increased by treatment with nitric oxid agents. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378:456–61
- Ahmed N, Dreier R, Göpferich A, Grifka J, Grässel S. Soluble signalling factors derived from differentiated cartilage tissue affect chondrogenic differentiation of rat adult marrow stromal cells. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:665–78
- Blum H, Beier H, Gross H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987;8:93–9
- Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med* 2008;233:901–13
- Stastna M, Abraham MR, Van Eyk JE. Cardiac stem/progenitor cell, secreted proteins, and proteomics. *FEBS Lett*. 2009;583:1800–7
- Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008;103:1204–9
- Barile L, Messina E, Giacomello A, Marbán E. Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis* 2007;50:31–48
- Babuín L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ* 2005;173:1191–202
- Collinson PO, Gaze DC, Morris F, Morris B, Price A, Goodacre S. Comparison of biomarker strategies for rapid rule out of myocardial infarction in the emergency department using ACC/ESC diagnostic criteria. *Ann Clin Biochem* 2007;44:94–5
- Inbar R, Shoenfeld Y. Elevated cardiac troponins: the ultimate marker for myocardial necrosis, but not without a differential diagnosis. *Isr Med Assoc J* 2009;11:50–3
- Sadayappan S, Osinska H, Klevitsky R, Lorenz JN, Sargent M, Molkenin JD, Seidman CE, Seidman JG, Robbins J. Cardiac myosin binding protein C phosphorylation is cardioprotective. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:16918–23
- Yuan C, Guo Y, Ravi R, Przyklenk K, Shilkofski N, Diez R, Cole RN, Murphy AM. Myosin binding protein C is differentially phosphorylated upon myocardial stunning in canine and rat hearts – evidence for novel phosphorylation sites. *Proteomics* 2006;6:4176–86
- Jacquet S, Yin X, Sicard P, Clark J, Skanaganayagam GS, Mayr M, Marber MS. Identification of cardiac myosin binding protein C as a candidate biomarker of myocardial infarction by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:2687–99
- Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol* 2003;65:81–101
- Karpiński Ł, Plaksej R, Derzhko R, Orda A, Witkowska M. Serum levels of interleukin-6, interleukin-10 and C-reactive protein in patients with myocardial infarction treated with primary angioplasty during a 6-month follow-up. *Pol Arch Med Wewn* 2009;119:115–21
- Banerjee I, Fuseler JW, Intwala AR, Baudino TA. IL-6 loss causes ventricular dysfunction, fibrosis, reduced capillary density, and dramatically alters the cell populations of the developing and adult heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H1694–704



- 28 Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 2007;109:4055-63
- 29 Wang CH, Cheng WJ, Yang NI, Kuo LT, Hsu CM, Yeh HI, Lan YJ, Yeh CH, Stanford WL. Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury. *Arterioscler.Thromb Vasc Biol* 2008;28:54-60
- 30 Girgenrath M, Weng S, Kostek CA, Browning B, Wang M, Brown SA, Winkles JA, Michaelson JS, Allaire N, Schneider P, Scott ML, Hsu YM, Yagita H, Flavell RA, Miller JB, Burkly LC, Zheng TS. TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. *EMBO J* 2006;25:5826-39
- 31 Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells* 2006;24:2483-92
- 32 Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004;94:1543-53
- 33 Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 2008;58:88-111
- 34 Kocher AA, Schuster MD, Bonaros N, Lietz K, Xiang G, Martens TP, Kurlansky PA, Sondermeijer H, Witkowski P, Boyle A, Homma S, Wang SF, Itescu S. Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:455-64
- 35 Pandur P. What does it take to make a heart? *Biol Cell* 2005;97:192-210
- 36 Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature* 2008;454:345-9
- 37 Li TS, Komota T, Ohshima M, Qin SL, Kubo M, Ueda K, Hamano K. TGF-beta induces the differentiation of bone marrow stem cells into immature cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:1074-80
- 38 Abarbanell AM, Coffey AC, Fehrenbacher JW, Beckman DJ, Herrmann JL, Weil B, Meldrum DR. Proinflammatory cytokine effects on mesenchymal stem cell therapy for the ischemic heart. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1036-43
- 39 Gonzalez R, Maki CB, Pacchiarotti J, Csontos S, Pham JK, Slepko N, Patel A, Silva F. Pluripotent marker expression and differentiation of human second trimester mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:491-7
- 40 Lee WC, Sepulveda JL, Rubin JP, Marra KG. Cardiomyogenic differentiation potential of human adipose precursor cells. *Int J Cardiol* 2009;133:399-401
- 41 Seshi B, Kumar S, King D. Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis. *Blood Cells Mol Dis* 2003;31:268-85
- 42 Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30:896-904

(Received January 5, 2010, Accepted April 18, 2010)

## ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA

Experimental and Molecular Pathology 90 (2011) 149–156



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexmp](http://www.elsevier.com/locate/yexmp)

## Transplantation of SNAP-treated adipose tissue-derived stem cells improves cardiac function and induces neovascularization after myocardium infarct in rats

Gel R.M. Berardi<sup>a</sup>, Carmen K. Rebelatto<sup>a</sup>, Heloísa F. Tavares<sup>b</sup>, Max Ingberman<sup>c</sup>, Patrícia Shigunov<sup>d</sup>, Fabiane Barchiki<sup>a</sup>, Alessandra M. Aguiar<sup>d</sup>, Nelson I. Miyague<sup>a</sup>, Julio C. Francisco<sup>b</sup>, Alejandro Correa<sup>d</sup>, Alexandra C. Senegaglia<sup>a</sup>, Paula Hansen Suss<sup>a</sup>, José A. Moutinho<sup>a</sup>, Vanessa S. Sotomaíor<sup>b</sup>, Lia S. Nakao<sup>b,c,\*</sup>, Paulo S. Brofman<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Núcleo de Tecnologia Celular Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215-901, Brazil

<sup>b</sup> Núcleo de Investigação Molecular Avançada Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215-901, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Brazil

<sup>d</sup> Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Rua Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba 81350-010, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 August 2010

Available online 25 November 2010

#### Keywords:

Adipose-derived stem cells

SNAP

Nitric oxide

Ejection fraction

Neovascularization

Cardiomyogenesis

### ABSTRACT

Stem cell therapy has been considered a promise for damaged myocardial tissue. We have previously shown that S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) increases the expression of several muscular markers and VEGF in mesenchymal stem cells, indicating that transplantation of SNAP-treated cells could provide better functional outcomes. Here, we transplanted SNAP-treated adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) in rat infarcted myocardium. After 30 days, we observed a significant improvement of the ejection fraction in rats that received SNAP-treated ADSCs, compared with those that received untreated cells ( $p=0.008$ ). Immunohistochemical reactions showed an increased expression of troponin T-C and von Willebrand factor, and organized vascular units in the infarcted area of tissue transplanted with treated ADSCs. SNAP exposure induced intracellular S-nitrosation, a decreased GSH/GSSG ratio, but did not increase cGMP levels. Collectively, these results indicate that SNAP alters the redox environment of ADSCs, possibly associated with a pre-differentiation state, which may improve cardiac function after transplantation.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Heart failure is the main cause of hospitalization in the United States. Despite the decline of mortality its prevalence continues to increase, mainly due to effectiveness of clinical treatment and aging of the population (Schocken et al., 2008).

In recent years several studies have demonstrated the potential of stem cells in tissue regeneration with the possibility of cardiac function improvement after transplantation (Al-Radi et al., 2003; Anversa et al., 2003; Orlic et al., 2002; Pittenger et al., 1999; Pittenger and Martin, 2004). The mechanisms by which these cells promote repair of myocardial damage are not well known. However, the idea that stem cells could promote myocardium regeneration by means of the transdifferentiation seems insufficient. For this reason complementary mechanisms should be considered such as paracrine events and neovascularization (Korbling and Estrov, 2003).

Conceptually, a variety of stem cells can be used for myocardium regeneration (Boyle et al., 2006). Mesenchymal stem cells (MSCs) were first described by Friedenstein et al. (1970). Their main function is maintenance and renewal of adult mesenchymal tissue. These cells can be harvested from diverse sources (Fukuda, 2005; Korbling and Estrov, 2003; Wollert and Drexler, 2005) and although the similarities described, differences in the expression of some genes and in differentiation potential (Dominici et al., 2006; Rebelatto et al., 2008) should be considered to choose the best source for each determined transplant (Dai et al., 2005).

Adipose-derived stem cells (ADSCs) show similar characteristics to bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). Furthermore, they are easily obtained, are present at a high frequency (0.5%), and are able to differentiate into various lineages (Zuk et al., 2002). Planat-Benard et al. (2004) observed that these cells can spontaneously differentiate and express transcription factors of cardiac cells. The ADSCs also express cardiac tissue proteins and have the ability to repair myocardial infarction (Strem et al., 2005), emphasizing the possibility of their use in cellular therapy (Jiang et al., 2002).

The *in vitro* differentiation of ADSCs in cardiomyocytes requires the addition of an inductive agent of differentiation. Nitric oxide (NO) induces the differentiation of embryonic stem cells in cardiomyocytes (Kanno

\* Corresponding author. Departamento de Patologia Básica, room 153, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81531-980, Brazil. Fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: [lia.nakao@ufpr.br](mailto:lia.nakao@ufpr.br) (L.S. Nakao).

et al., 2004). We have recently demonstrated that NO donors, such as DEA/NO (2-(N,N-diethylamino)-diazene-2-oxide) and SNAP (S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine), increase the expression of muscular and cardiac markers, VEGF and CD34 in BM-MSCs and ADSCs (Rebelatto et al., 2009), which might improve their effects in cellular therapy.

Here, we show that transplantation of SNAP-treated ADSCs in a rat model of myocardial infarction improves the cardiac ejection fraction when compared to transplantation of untreated ADSCs. The expression of troponins and von Willebrand factor, as well as the number of blood vessels in the infarcted area, are also increased in SNAP-treated cells transplantation. *In vitro* experiments indicate that SNAP triggers an early intracellular protein S-nitrosation and an oxidative redox state in ADSCs, which may be involved in observed beneficial effects.

## Material and methods

### Experimental animals and study design

All procedures were performed after approval by the Human and Animal Ethics Committees of *Pontifícia Universidade Católica of Paraná* (approval numbers 597 and 202, respectively). Myocardial infarction was induced in 60 male Wistar rats (200–230 g). Echocardiography was performed 7 days later for determination of ventricular function. On the eighth day, 33 rats presented ventricular ejection fraction below 40%. Eight rats died after randomization, and the remainder myocardial-infarcted animals underwent cell transplantation ( $n=21$ ) or injection of medium (control,  $n=4$ ). Five additional rats died after transplantation, and the rest were kept alive for 4 weeks, without immunosuppression. Some animals were transplanted with ADSCs previously transduced with *GFP* gene.

### Infarct induction

All rats that underwent myocardial infarction were given general anesthesia of intramuscular ketamine (50 mg/kg, Ketamine™, Laboratórios König SA, Brazil) and xylazine (10 mg/kg, Sintec, Rhobiofarma, Brazil). These animals were endotracheally intubated with a flexible catheter (Abocath), and mechanically ventilated by using a small animal ventilator (HARVARD®, Inc., model 683, Massachusetts, USA). A left lateral thoracotomy was performed via the fourth intercostal space to expose the heart. The anterior descending coronary artery was localized, and ligated with a 7.0 non-absorbable Prolene suture (Ethicon, Brazil) just proximal to the bifurcation of the left coronary. The infarction was verified by the observed myocardial blanching distal to the ligation. The thorax was then sutured and the animals were monitored until they fully recovered from the anesthesia.

### Echocardiography

Echocardiography was performed on the seventh day post-infarction and on the thirtieth day after cell transplantation. After anesthesia, by intramuscular injection, a two-dimensional transthoracic echocardiography was performed with an echocardiography system equipped with a 12-MHz phased-array transducer HP Sonos 5500 (Hewlett Packard, USA) with the use of a specific transducer for small animals (S 12.5–12 MHz linear 15 L6 7–15 MHz) in the anterolateral portion of the left lateral chest wall. The images were observed in two dimensions and ventricular chambers observed in two sections, longitudinal and transverse. Ejection fraction, end systolic and diastolic volume of the left ventricle, and the end systolic and diastolic area of left ventricle were analyzed by the Simpson's method. The study included animals that presented an ejection fraction of below 40% on the echocardiography on the seventh day after infarction. All measurements were performed on the same equipment and repeated three times by the same observer. The results are presented as the mean of three independent measurements.

### Cell culture

ADSCs were isolated using the technique described by Puissant et al. (2005) with modifications. Primary human ADSCs were isolated and characterized as MSC as described elsewhere (Rebelatto et al., 2008) from subjects undergoing elective bariatric surgery and dermolipectomy procedures at the *Instituto de Cirurgia e Medicina do Paraná*. Patient consent was acquired prior to surgery. A cohort of 3 samples was used for cell culture and transplantation.

### Transduction of ADSCs by lentivirus and flow cytometry

Four days prior to transplantation, ADSCs were transduced by a third-generation lentivirus containing the green fluorescent protein (*GFP*) gene. The lentiviral particles were kindly provided by the Institute of Molecular Biology of Parana (IBMP, Curitiba-PR, Brazil). Transductions were performed by a single exposure of lentivirus in the presence of 5 µg/ml of polybrene and a multiplicity of infection (MOI) of 5. Twenty-four hours after transduction the medium with the exceeding viruses was removed and the cells were maintained in standard culture media until transplanted.

The percentage of positive cells for the *GFP* gene was assessed by flow cytometry. Cells were trypsinized, washed twice with PBS solution and fixed in 300 µL of 1% paraformaldehyde (PFA) (Merck, Darmstadt, Germany) in PBS. The evaluation was immediately performed in a FACS Calibur equipment (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and data were analyzed by FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

### ADSCs treatment with nitric oxide donor SNAP

This work employed two types of experiments with ADSCs. 1) For the transplantation, following the establishment in culture of a homogeneous population of ADSCs (fourth passage), 0.4 mM SNAP (Calbiochem, CA, USA) was added in the first and third days and maintained until the fourth day. After this period, the cells remained for a further 16 days with medium without addition of SNAP. The medium was changed every two days until the twentieth day, when cells were prepared for the transplantation. 2) To analyze the effects of SNAP exposure to the ADSCs, cells were seeded at a density  $1 \times 10^5/cm^2$ . After adhesion, they were grown in medium containing 1% fetal calf serum for 24 h and then treated with 0.2 mM SNAP in medium containing 5% fetal calf serum (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, USA) during 40 min.

### Cell transplantation

Cell transplantation was performed 24 h after the determination of ventricular function by echocardiography. Rats underwent general anesthesia, a median thoracotomy was performed, and  $1 \times 10^6$  ADSCs were resuspended in 300 µL of DMEM-F12 medium and injected using a tuberculin syringe with a needle into one point of the myocardium (left ventricle), specifically in the center of the scar covering the whole infarcted and peri-infarcted area. The animals were divided into three experimental groups: (A) 4 animals transplanted with medium (control group); (B) 11 rats transplanted with ADSCs treated with SNAP, and (C) 10 rats transplanted with ADSCs.

### Animal euthanasia, perfusion-fixation of the heart

After 30 days of the transplant, the animals were euthanized under sedation, as described above. Briefly, the left ventricle was cannulated with a catheter connected to an infusion pump, and approximately 100 mL of a saline solution, followed by 400 mL of 2% PFA were infused. At the end of the infusion, the heart was removed and

sectioned into four pieces from the apex to the base. The segment with the infarcted region was fixed with 4% PFA for 24 h. Subsequently, the sections were immersed in three solutions of sucrose (Biotec, Paraná, Brazil) 10%, 20% and 30% in phosphate buffer (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, USA) 0.1 M, pH 7.4, embedded and frozen in a block of cryopreservation medium of optimal cutting temperature (OCT) (Sakura Finetek, Zoeterwoude, The Netherlands) in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, cryosections of 5–7  $\mu\text{m}$  were obtained. Tissue sections were washed three times with a solution of 10 mM TBS (Invitrogen, CA) containing 0.1% triton for 5 min. The specimens were blocked with 10 mM TBS containing 0.1% triton (Nuclear, São Paulo) and 5% goat serum (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, USA) for 1 h. Subsequently, sections were incubated for 2 h with primary antibodies mouse anti-GFP conjugated with FITC (1/50), goat anti-human troponin I (1/50) and goat anti-troponin T-C (1/50), all from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), rabbit anti-human desmin (1/10) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and rabbit anti-human von Willebrand factor (1/200) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). The sections were washed with TBS + 0.1% triton, blocked with 10 mM TBS containing 0.1% triton and 5% goat serum for 40 min and incubated with secondary antibodies rabbit anti-goat IgG Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (1/100), goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Oregon, USA) (1/400) for 1 h and 30 min at room temperature. Nuclei were stained with 4',6-diamino-2 phenylindole (DAPI) and the slides were mounted using fluorescence mounting medium (Dako, CA, USA). The anti-GFP was used in the sections of animals that were transplanted with cells transduced with the GFP gene. The controls of the immunohistochemical reaction were made using only the secondary antibody. Slides were analyzed in the E-600 Nikon microscope and images captured using the camera-CoolSNAP PRO cf (Media Cybernetics) and Image Pro-Plus software (Diagnostic Instruments).

#### Indirect immunofluorescence

After the short SNAP exposure, cells were fixed with 4% PFA and then incubated with anti-nitrosocysteine (1/400) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ , in a humidified chamber. The secondary antibody used was anti-rabbit IgG-Alexa 488 (1/600) (Molecular Probes, Oregon, USA), in PBS containing 0.01% saponin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), during 40 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Actin was labeled with phalloidin conjugated with Texas red (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). In some experiments, 2 mM  $\text{HgCl}_2$  was added to the cells for 30 min, before the fixation step, to analyze the specificity of the anti-nitrosocysteine to the nitrosocysteine epitope. Images were captured by a confocal microscopy (Nikkon, Eclipse 800 equipped with a Biorad camera, Radianna 2100).

#### GSH and GSSG determination

Cells (treated in T75 flasks) were pelleted and stocked at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. For the GSH and GSSG determination, the light-protected pellets were thawed in ice, and suspended in 80  $\mu\text{L}$  of a buffer consisting of 50 mM phosphate pH 2.7, 50  $\mu\text{M}$  sodium octanosulfonate (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Cells were lysed by 3 freeze-thaw cycles in liquid nitrogen/water bath. Lysates were centrifuged (10,000 rpm at  $4^{\circ}\text{C}$  for 5 min) and the supernatants were 0.22  $\mu\text{m}$ -filtered. Thirty microliters of the supernatants were injected in an HPLC Shimadzu system consisting of a quaternary pump (LC20AD) controlled by the LC Solution software, a manual injector (Rheodyne 7125), and a coulometric detector (ESA Chelmsford), operating at 470 and 910 mV, for GSH and GSSG detection, respectively.

#### Intracellular levels of cGMP

Cells were treated as described in 24 wells plates (TPP, Trasadingen, Switzerland). Cyclic GMP levels were assessed by a commercial kit (GE Healthcare), according to the manufacturer.

#### Statistical analysis

This work has a primary outcome based on analysis of immunohistochemistry for *in vivo* evaluation of expression of neovascularization and muscle markers and secondary in the evaluation of ventricular function with the data obtained from an ejection fraction of the left ventricle. Statistical analysis was performed by a non-parametric Kruskal Wallis test for the assessment of ejection fraction of the three study groups and by non-parametric Wilcoxon test to compare pre and post ejection fraction within each group. The data were analyzed with the software Statistica 8.0. The GSH/GSSG ratios were analyzed by one way ANOVA, using GraphPad Prism software.

#### Results

The myocardial-infarcted animals were divided into three groups: (A) control; animals that were transplanted with medium ( $n=4$ ) (B) animals that received ADSCs treated with SNAP ( $n=9$ ) and (C) animals that received untreated ADSCs ( $n=7$ ). Some ADSCs samples were transduced with the GFP gene. A total of eight rats from groups B and C were transplanted with GFP-transduced cells. The efficiency of transduction with GFP gene was 28 and 31% for SNAP-treated and untreated ADSCs, respectively (data not shown).

There was a significant difference between groups with respect to absolute difference in the pre and post transplant ejection fraction. A significant difference between B and C ( $p=0.008$ ) was found, while groups A and C ( $p=0.249$ ) presented similar behavior (Fig. 1). This data suggests that SNAP exposure to the ADSCs had a role in the final functional outcome. The ventricular remodeling occurred in all groups measured by the increment of ventricular size. On average, this variation was 18.8% in group A, 16.4% in group B and 17.1% in group C ( $p=0.907$ ). Although group B presented the lowest increment of ventricular size, no significant difference was observed between groups. In addition, there was no difference between groups regarding

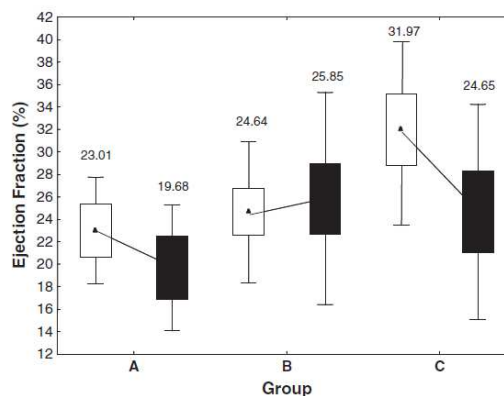


Fig. 1. Mean pre- and post-transplant ejection fraction. Myocardial infarcted rats were divided in groups A (control), B (animals transplanted with ADSCs treated with SNAP) and group C (animals transplanted with untreated ADSCs). Their mean cardiac ejection fractions (annotated above the bars) were determined by echocardiography one day before (white bars) and thirty days after (black bars) the cell transplant. Ejection fractions are presented as mean  $\pm$  SE in the box area and mean  $\pm$  SD in Whisker plot.

the absolute difference in the end diastolic volume of the left ventricle ( $p = 0.999$ ; data not shown).

The ejection fractions of animals in groups B and C that were transplanted with *GFP*-transduced cells were compared to determine if *GFP* transduction could have negatively influenced the ejection fraction by providing an early cell death of transplanted ADSCs. Although some *GFP* expression could be detected in the infarcted region of all transplanted rats (Fig. 2), no difference in ejection fraction was found between these two transplanted groups ( $p = 0.518$ ), indicating that transplanted cells were integrated to the injured tissue and that cardiac function was independent on *GFP* expression.

To investigate if SNAP-treated cells were more prone to differentiate into cardiac cells in the infarcted area, we analyzed the expression of desmin, troponin T-C and troponin I by immunohistochemistry. Positive cells to desmin were observed in both groups, B and C in regions with and without myocardial infarct, i.e., with and without transplanted cells (data not shown). These results indicate that desmin is a nonspecific marker and could not be considered appropriate for analysis of expression of cardiac proteins in transplanted cells. The presence of troponin I was observed in the infarcted area of both B and C groups (Fig. 3a, b). A specific marker to cardiac cells, troponin T-C, was predominantly present in the infarcted region of the animals in group B (Fig. 3c, d). The anti-von Willebrand, specific for endothelial cells, was observed in cells around blood vessels in infarcted and non-infarcted (data not shown) regions in both groups B and C, but more prominently in SNAP-treated cells (Fig. 3e, f). It was not observed unspecific staining by secondary antibodies. A semi-quantitative analysis was carried out to evaluate the number of vessels in the infarcted region of animals from groups B and C. Sixty-eight random fields were counted in both groups, and a greater number of vessels ( $n = 81$ ) was observed in group B when

compared with group C ( $n = 63$ ) which might reflect the more extensive von Willebrand factor staining in group B.

So far, the results demonstrate that transplantation of SNAP-treated ADSCs, compared with transplantation of untreated ADSCs, induces an improvement in cardiac ejection fraction, an increased cardiac expression of troponin T-C and von Willebrand factor, and an increased neovascularization. Next, we aimed to analyze the early events triggered by SNAP in ADSCs, which could be associated with the above effects. Since NO activates guanylate cyclase (GC), leading to the production of cGMP, we measured its intracellular level 40 min after exposure to SNAP. No significant difference between control (untreated) and SNAP-treated ADSCs was found (676 versus 710 fmol/well, respectively,  $n = 2$ ). We employed 1  $\mu\text{M}$  DEA/NO, a compound that spontaneously releases NO, as a positive control. With this NO donor, cGMP levels increased to 976 fmol/well. This result demonstrates that SNAP does not induce cGMP production in ADSCs under our experimental conditions. Thus, an alternative pathway to NO signaling is a cGMP-independent mechanism, relying on protein S-nitrosation. Indeed, the images obtained with anti-nitrosocysteine antibody show an intense immunostaining, with a granular pattern dispersed in the cytoplasm, as determined by the extension of actin labeling with phalloidin (Fig. 4). Control cells, i.e., not exposed to SNAP, showed no anti-nitrosocysteine immunostaining (Fig. 4). To investigate whether the observed reaction was due to nitrosocysteine residues recognition, we incubated the fixed treated cells with  $\text{HgCl}_2$ , to disrupt the nitrosocysteine bond. Indeed, no staining was observed after this incubation (data not shown), confirming the antibody specificity to nitrosocysteine epitopes.

Since NO-derived species are able to alter the redox environment of the cell, we assessed whether SNAP exposure could alter the cellular redox state, determined by the GSH/GSSG ratio. Our results indicate that SNAP decreases the GSH/GSSG ratio in ADSCs by ca. 50% compared to the untreated cells (Fig. 5).

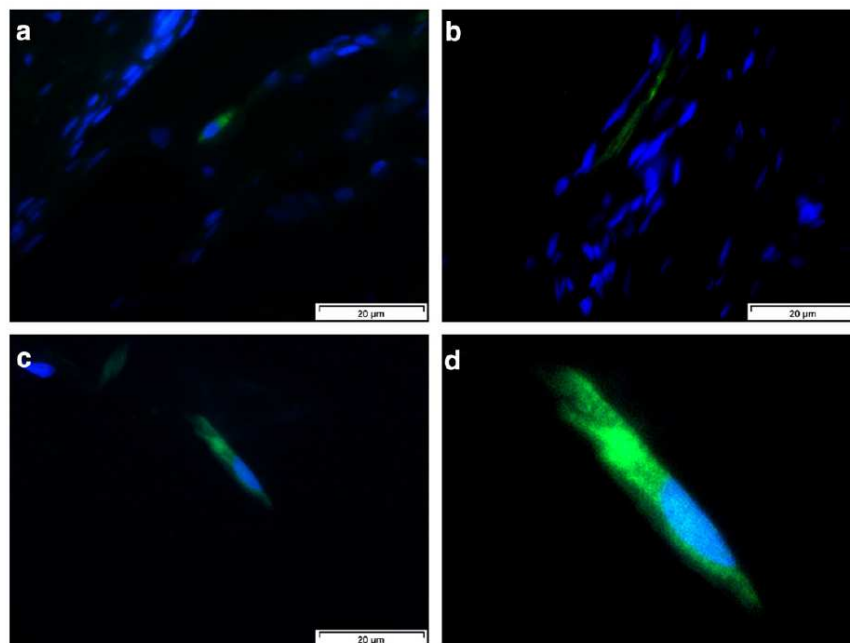


Fig. 2. GFP expression in ADSCs-transplanted infarcted myocardium. Indirect immunofluorescence indicates the presence of *GFP*-transduced ADSCs (green) in infarcted area of untreated (a) and SNAP-treated ADSCs (b, c). In subpanel (d) the image is magnified from subpanel (c).

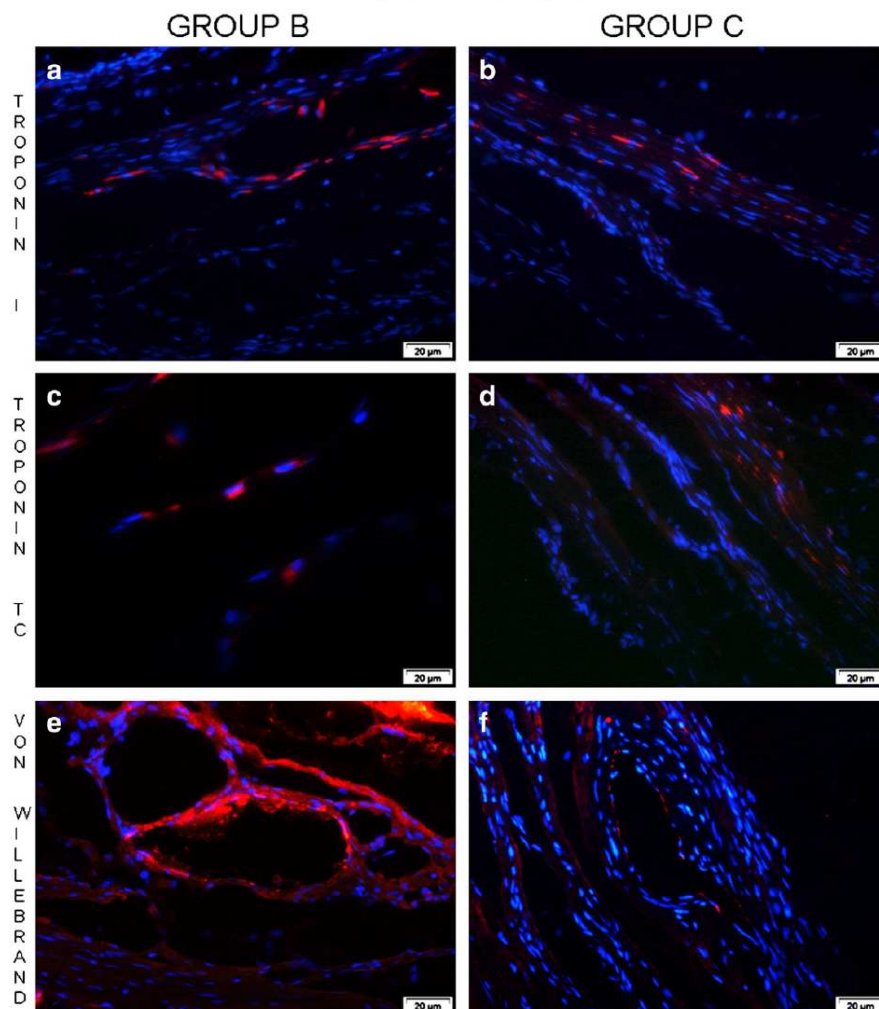


Fig. 3. Expression of troponin I, troponin T-C and von Willebrand factor in infarcted cardiac tissue after ADSC transplantation. SNAP-treated (a, c, e) and untreated (b, d, f) ADSCs were transplanted in the infarcted myocardium and the expression of troponin I (a, b), troponin T-C (c, d) and von Willebrand factor (e, f) was analyzed by indirect immunofluorescence.

### Discussion

Cellular therapy has emerged as an alternative to cardiac repair and formation of new blood vessels (Pittenger and Martin, 2004). Based on studies showing that NO utilization could facilitate cardiomyogenesis (Kanno et al., 2004) and that treatment of ADSCs with NO agents increases the expression of cardiac specific genes (Rebelatto et al., 2009), our focus was to study the effects of SNAP-treated ADSCs transplantation on cardiac repair after myocardial infarct in Wistar rats.

In this study, a significant increase in the ejection fraction was observed in the group that received ADSCs treated with SNAP compared with the group that received untreated ADSCs. We did not observe a significant difference in the ejection fraction variation between groups A (control) and C (transplanted with untreated ADSCs), in contrast to other studies which show that mesenchymal stem cell transplantation can improve cardiac function in different experimental models (Caplan, 2009; Dai et al., 2005; Nagaya et al.,

2005; Strem et al., 2005; Valina et al., 2007). Differences between these publications and our results can be explained by methodological differences such as isolation and cultivation techniques (Giordano et al., 2007), methods of infarct induction, moment of transplant after infarction, route of infusion and number of transplanted cells.

Despite promising results in the recovery of ventricular function with mesenchymal stem cell transplantation, some studies have not shown positive results. Van der Bogt et al. (2009) performed cellular transplant with bone marrow mesenchymal stem cells and ADSCs in rats with myocardial infarction and did not observe benefits on ejection fraction, in line with our results. The low number of transplanted cells,  $5 \times 10^5$ , might have interfered in the result. We transplanted  $1 \times 10^6$  cells by intramyocardial infusion. Possibly, a higher number of transplanted stem cells could result in a significant functional improvement. Indeed, Nagaya et al. (2005) observed that satisfactory increments of ejection fraction were obtained only after increasing the number of stem cells to  $5 \times 10^6$ .

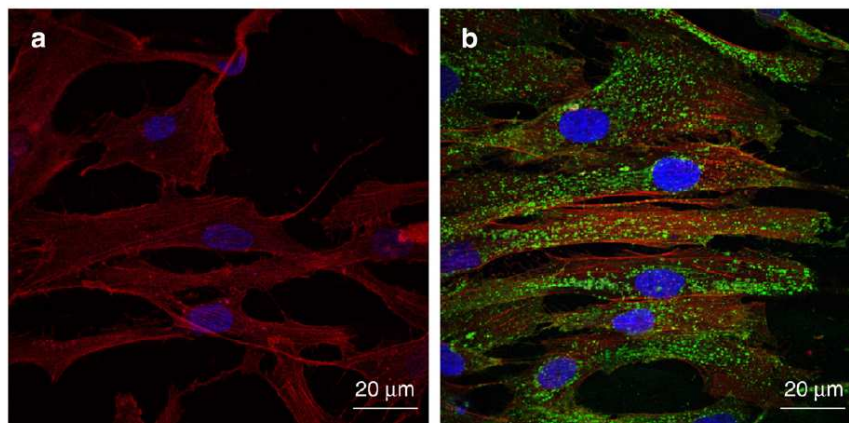


Fig. 4. Protein S-nitrosation by SNAP-treatment in ADSCs. Cells were untreated (a) or treated with 0.2 mM SNAP (b) during 40 min. After fixation and permeabilization, actin was labeled with phalloidin conjugated with Texas Red. The reaction was performed with anti-nitrosocysteine antibody and rabbit anti-IgG conjugated with Alexa 488.

We aimed to investigate the transplant of pre-committed ADSCs for the cardiac phenotype. Other studies showed that committed cells could lead to increased cytoprotection effects of cardiomyocytes present in the heart and to increased therapeutic efficiency of mesenchymal stem cells in myocardial regeneration (Chamberlain et al., 2007). Mazo et al. (2008) had demonstrated that undifferentiated ADSCs were more efficient than predifferentiated ADSCs to cardiac regeneration. These differences can be related to different methods of predifferentiation used in each study. We chose the nitrosothiol SNAP, since this agent had been previously shown to increase cardiomyogenesis in both embryonic and adult stem cells (Kanno et al., 2004; Rebelatto et al., 2009). We hypothesized that cardiomyogenesis might have been facilitated by the ADSCs pre-commitment. Here, we demonstrated a significant increase in the ejection fraction in the group that received ADSCs treated with SNAP compared with the group that received untreated ADSCs. This increase in contractile function indicates that SNAP-treated cells contribute to the improvement of the damaged area, since we have observed an increased expression of some cardiac muscle markers in the

infarcted area. Troponin I was expressed in untreated and SNAP-treated ADSCs. Due to the small number of positive cells and the antibody specificity for the human protein, we suggest that cells expressing troponin I were the transplanted human ADSCs. However, it was not possible to visualize the co localization of GFP and troponin I-positive cells. The anti-troponin T-C utilized is specific for cardiac tissue and its expression was observed in ADSCs treated with SNAP and only in the infarcted area. Thus, we suggest that SNAP had acted on the pre-differentiation of ADSCs to muscular cells. The expression of cardiac muscular proteins by ADSCs has been described after differentiation induction by several methods. For example, Zuk et al. (2002) had demonstrated that ADSCs *in vitro* could express myogenic transcription factor 1 (myoD1), desmin, myogenin, myogen regulator factor and myosin heavy chain (MHC) after addition of hydrocortisone. Also, we have demonstrated the expression of cardiac  $\alpha$ -actin, troponin T, troponin I and connexin-43 on ADSCs and bone marrow mesenchymal stem cells after SNAP addition (Rebelatto et al., 2009) and the improvement of cardiac function of infarcted rats has been associated with expression of  $\alpha$ -MHC,  $\beta$ -MHC,  $\alpha$ -actin and myosin light chain (MLC2v) after 30 days of transplant (Nagaya et al., 2005).

In addition, our results show that SNAP-treated cells were either more prone to differentiate to endothelial cells or that they induced other tissue cells to differentiate into endothelial cells, by a paracrine signaling for instance. Our data showed more cells expressing von Willebrand factor and organized in vascular units in infarction area of animals that received treated ADSCs than in the group that received untreated cells. Recent studies suggest that mesenchymal stem cells can be differentiating toward endothelial cells (Fraser et al., 2006; Kinnaird et al., 2004; Tang et al., 2006). However, we were unable to co-localize GFP and von Willebrand factor in our experiments. This is not surprising considering that the efficiency of transduction was approximately 30%, and about 3% of these cells remain at the lesion site (Freyman et al., 2006). On the other hand, SNAP has been associated with VEGF increment (Maulik, 2006) and this marker is involved in function improvement, vessels number increment and remodeling limitation as demonstrated by Sadat et al. (2007). These authors had demonstrated that ADSCs secrete angiogenic factors that are responsible for vascular formation and cellular protection. Also, Tang et al. (2005) had demonstrated that ventricular function increment and vessels formation after mesenchymal cell transplant were associated with elevation of VEGF, fibroblast growth factor (FGF) and stem cell derived factor 1- $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) expression. We had

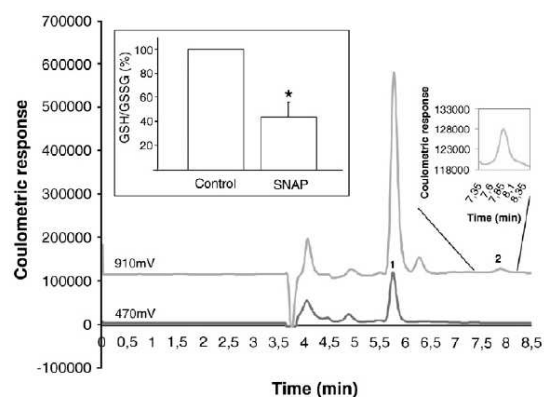


Fig. 5. Decreased intracellular GSH/GSSG ratio by SNAP treatment in ADSCs. Representative chromatograms of the simultaneous detection of GSH (peak 1, 470 mV trace) and GSSG (peak 2, 910 mV trace) in ADSCs cytosolic fraction are shown. Inset shows the GSH/GSSG ratio in control and SNAP-treated ADSCs. The values are representative of 5 independent experiments. \* $P < 0.05$ .

previously reported an increased genic expression of VEGF by ADSCs after SNAP exposure (Rebelatto et al., 2009). Indeed the vasculogenesis has been more often observed than the differentiation in muscle cells (Kamihata et al., 2002).

Here we showed that SNAP induces ADSCs S-nitrosation that may contribute to the functional effects observed. We did not identify the proteins modified by SNAP in ADSCs, but in endothelial cells, S-nitrosation by exogenous NO donors, like DEA/NO, takes place mainly in mitochondrial proteins, presenting a staining pattern similar to that observed by us (Yang and Loscalzo, 2005). Recently, SNAP has been shown to stabilize HIF1 $\alpha$ , leading to VEGF expression, by a mechanism dependent on HIF1 S-nitrosation (Park et al., 2008).

SNAP is a nitrosothiol which has been described to release NO, leading to cardiovascular benefits, such as vasodilation (Moncada and Higgs, 1993; Nathan, 1992) and also protection against oxidative stress (Monastyrskaya et al., 2002). However, its chemical properties, regarding NO release, are quite complex, and are extremely dependent on the chemical environment (Janssens et al., 1999) such as the presence of thiols (Hu and Chou, 2006). SNAP itself cannot cross the cell membrane (Zhang and Hogg, 2005). Thus, it can be suggested that SNAP-derived NO enters the cell, possibly by transnitrosation mediated by membrane proteins (Zai et al., 1999). NO or NO-derived species then nitrosates intracellular thiols, such as glutathione. Nitrosoglutathione may then further react with other biomolecules, and becomes oxidized, decreasing the GSH/GSSG ratio. These transnitrosation reactions may account for the lack of GC activation observed in our experiments. Moreover, nitroso-proteins may transfer the NO moiety to other thiols, acting as NO carriers/storage. It has been demonstrated in endothelial cells that the half-life of nitroso-proteins is about 1 h (Yang and Loscalzo, 2005).

Finally, the SNAP-induced oxidative redox state in ADSCs is in agreement with the findings described by Jones (for a review, see Jones, 2006). It has been demonstrated that a slightly oxidative reduction potential, measured by the intracellular concentrations of glutathione and glutathione disulfide accompanies the differentiation phenotype, probably by altering the redox state of target protein modules involved in transcription. On the other hand, more reduced potentials are associated with cell proliferation. Thus, the decreased GSH/GSSG ratio found after SNAP treatment in ADSC may be an important factor to induce differentiation.

In conclusion, this study indicates that transplanted SNAP-treated ADSCs induce a functional improvement and neovascularization in rats that underwent severe myocardial infarction, possibly by events involving ADSCs protein S-nitrosation and decreased GSH/GSSG ratio. Specific proteins involved in this process remain to be identified.

#### Conflict of interest statement

Authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

Authors thank Dr. Márcia Olandoski for statistical analysis and Dr. Kátia S. Paludo for the confocal analysis. This work was supported by CNPq. Fellowships from CNPq to HFT, MI and LSN are also acknowledged.

#### References

- Al-Radi, O.O., et al., 2003. Cardiac cell transplantation: closer to bedside. *Ann. Thorac. Surg.* 75, S674–S677.
- Anversa, P., et al., 2003. Primitive cells and tissue regeneration. *Circ. Res.* 92, 579–582.
- Boyle, A.J., et al., 2006. Is stem cell therapy ready for patients? Stem cell therapy for cardiac repair. Ready for the next step. *Circulation* 114, 339–352.
- Caplan, A.L., 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J. Pathol.* 217, 318–324.
- Chamberlain, G., et al., 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739–2749.
- Dai, W., et al., 2005. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* 112, 214–223.
- Dominici, M., et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Fraser, J.K., et al., 2006. Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3 (Suppl 1), S33–S37.
- Freyman, T., et al., 2006. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 27, 1114–1122.
- Friedenstein, A.J., et al., 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393–403.
- Fukuda, K., 2005. Progress in myocardial regeneration and cell transplantation. *Circ. J.* 69, 1431–1446.
- Giordano, A., et al., 2007. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 211, 27–35.
- Hu, T.M., Chou, T.C., 2006. The kinetics of thiol-mediated decomposition of S-nitrosothiols. *AAPS J.* 8, E485–E492.
- Janssens, M.Y., et al., 1999. Radiosensitization of hypoxic tumour cells by S-nitroso-N-acetylpenicillamine implicates a bioreductive mechanism of nitric oxide generation. *Br. J. Cancer* 79, 1085–1089.
- Jiang, Y., et al., 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 30, 896–904.
- Jones, D.P., 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1865–1879.
- Kamihata, H., et al., 2002. Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1804–1810.
- Kanno, S., et al., 2004. Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12277–12281.
- Kinnaird, T., et al., 2004. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109, 1543–1549.
- Korbling, M., Estrov, Z., 2003. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? *N. Engl. J. Med.* 349, 570–582.
- Maulik, N., 2006. Reactive oxygen species drives myocardial angiogenesis? *Antioxid. Redox Signal.* 8, 2161–2168.
- Mazo, M., et al., 2008. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur. J. Heart Fail.* 10, 454–462.
- Monastyrskaya, E., et al., 2002. Application of the nitric oxide donor SNAP to cardiomyocytes in culture provides protection against oxidative stress. *Nitric Oxide* 7, 127–131.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329, 2002–2012.
- Nagaya, N., et al., 2005. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112, 1128–1135.
- Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051–3064.
- Orlic, D., et al., 2002. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ. Res.* 91, 1092–1102.
- Park, Y.K., et al., 2008. Nitric oxide donor, (+/–)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine, stabilizes transactive hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by inhibiting von Hippel-Lindau recruitment and asparagine hydroxylation. *Mol. Pharmacol.* 74, 236–245.
- Pittenger, M.F., Martin, B.J., 2004. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* 95, 9–20.
- Pittenger, M.F., et al., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.
- Planat-Benard, V., et al., 2004. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ. Res.* 94, 223–229.
- Puissant, B., et al., 2005. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.* 129, 118–129.
- Rebelatto, C.K., et al., 2008. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 233, 901–913.
- Rebelatto, C.K., et al., 2009. Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 456–461.
- Sadat, S., et al., 2007. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 674–679.
- Schocken, D.D., et al., 2008. Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 117, 2544–2565.
- Strem, B.M., et al., 2005. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy* 7, 282–291.
- Tang, Y.L., et al., 2005. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann. Thorac. Surg.* 80, 229–236 discussion 236–7.
- Tang, J., et al., 2006. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 30, 353–361.
- Valina, C., et al., 2007. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodeling after acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 28, 2667–2677.



- van der Bogt, K.E., et al., 2009. Comparison of transplantation of adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart. *Transplantation* 87, 642–652.
- Wollert, K.C., Drexler, H., 2005. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ. Res.* 96, 151–163.
- Yang, Y., Loscalzo, J., 2005. S-nitrosoprotein formation and localization in endothelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 117–122.
- Zai, A., et al., 1999. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 103, 393–399.
- Zhang, Y., Hogg, N., 2005. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 831–838.
- Zuk, P.A., et al., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.

## ANEXO J – RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO

RESUMO APRESENTADO NO VI CONGRESSO BRASILEIRO DE CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR – SALVADOR, BAHIA – 28 DE SETEMBRO A 01 DE OUTUBRO DE 2011.



P209

### PRELIMINARY RESULTS OF IN VIVO STUDY OF PRO-ANGIOGENIC CAPACITY OF HUMAN UMBILICAL CORD-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AND HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD-DERIVED ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN THE TREATMENT OF MYOCARDIAL INFARCTION.

**AUTORES:** PAULA HANSEN SUSS; LUIZ GUILHERME ACHCAR CAPRIGLIONE; NELSON ITIRO MIYAGUE; LYE MIYAGUE; FABIANE BARCHIKI; ALEXANDRA CRISTINA SENEGAGLIA; LETÍCIA FRACARO; DANIELLE JACKOWSKI; ALEJANDRO CORREA; PAULO ROBERTO SLUD BROFMAN;

**INSTITUIÇÃO:** Núcleo de Tecnologia Celular - Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**Introduction and Objectives:** Considering that cardiovascular disease represents an important cause of morbidity and mortality, it becomes necessary to develop new therapeutic strategies. In this context arises cell therapy, where endothelial progenitor cells (EPC) and mesenchymal stem cells (MSC) have shown to be important in regulating the tissue repair process, as well as, the formation of new vessels in the regeneration of ischemic regions. The aim of this study is to compare the effect of transplant of EPC, MSC as well as the combination of those, isolated from human umbilical blood and cord, for the treatment of acute myocardial infarction (AMI) in rats. **Methods and Results:** For the study control, animals were divided into four groups: normal, sham-operated, natural evolution, vehicle. For cell therapy, the animals were divided into the following groups: EPC, MSC, EPC+MSC. AMI was induced in the animals by ligation of the left coronary artery and echocardiography (ECHO) was performed on the 7th day post-AMI. On the ninth day only rats with less than 40% of left ventricular ejection fraction (LVEF) were randomized and received transplant of  $2 \times 10^6$  cells. A new ECHO was performed on day 30th post-transplantation. The mean LVEF on the 7th day post-AMI and 30th day post-transplantation were: normal (n=10)= 56/53; sham-operated (n=10)= 61/55; natural evolution (n=10)= 28/28; vehicle (n=10)= 28/27; EPC (n=4)= 31,3/41,3; MSC (n=3)= 28,2/43,4; EPC+MSC (n=6)= 28,5/40,3. **Conclusion:** When comparatively analyzing the mean values of LVEF in those groups, it was observed improvement of the cardiac function, increase in LVEF, among cell therapy groups. However, a larger number of animals will be necessary to prove the results efficiently. **Financial Support:** MCT/CT-Saúde, Decit/SCTIE/MS, CNPq and Fundação Araucária.

**ANEXO K – RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO****RESUMO APRESENTADO NO 9<sup>TH</sup> INTERNATIONAL CONGRESS ON CORONARY ARTERY DISEASE – VENEZA, ITÁLIA – 23 A 26 DE OUTUBRO DE 2011.**

1287

**IN VIVO STUDY OF PRO-ANGIOGENIC CAPACITY OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN THE TREATMENT OF MYOCARDIAL INFARCTION**

P.H. Suss<sup>1</sup>, L.G.A. Capriglione<sup>1</sup>, F. Barchiki<sup>1</sup>, L. Miyague<sup>1</sup>, N.I. Miyague<sup>1</sup>, D. Jackowski<sup>1</sup>, L. Fracaro<sup>1</sup>, A.C. Senegaglia<sup>1</sup>, C.L.K. Rebelatto<sup>1</sup>, L.M.B. Leite<sup>1</sup>, A. Correa<sup>2</sup>, P.R.S. Brofman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná, <sup>2</sup>Instituto Carlos Chagas / Fiocruz-Paraná, Curitiba, Brazil

Considering that cardiovascular disease constitute an important cause of morbidity and mortality, it becomes necessary to develop new therapeutic strategies. In this context arises cell therapy, where endothelial progenitor cells (EPC) and mesenchymal stem cells (MSC) have shown to be important in regulating the tissue repair process and the formation of new vessels in the regeneration of ischemic regions. The aim of this study is to compare the effect of transplant of EPC, MSC as well as the combination of those, from the human umbilical blood and human umbilical cord, for the treatment of acute myocardial infarction (AMI) in rats. For the study control, animals were divided into groups: normal, sham-operated, natural evolution, vehicle. For cell therapy, the animals were divided into groups: EPC, MSC, EPC+MSC. Animals were induced to a AMI by ligation of the left coronary artery; echocardiography (ECHO) was performed on 7<sup>th</sup> day post-AMI. On the ninth day only rats with less than 40% in the left ventricular ejection fraction (LVEF) were randomized and received transplant of  $2 \times 10^6$  cells. A new ECHO was performed on the 30<sup>th</sup> day post-transplantation. The mean LVEF on the 7<sup>th</sup> day post-AMI and 30<sup>th</sup> day post-transplantation were: normal= 56/53; sham-operated= 61/55; natural evolution= 28/28; vehicle= 28/27; EPC= 31,3/38,4; MSC= 28,2/43,4; EPC+MSC= 28,5/39,4. When comparatively analyzing the mean values of LVEF in those groups, it was observed improvement of the cardiac function in terms of increase in LVEF among groups of cell therapy. However, a larger number of animals will be necessary to prove the results efficiently.

## ANEXO L – RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO

### RESUMO APRESENTADO NO *WORLD CORD BLOOD CONGRESS III* – ROMA, ITÁLIA – 27 A 29 DE OUTUBRO DE 2011.

ABSTRACT # 31

#### OPTIMIZATION OF BLOOD AND UMBILICAL CORD AS A SOURCE OF HUMAN ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS AND MESENCHYMAL STEM CELLS

*Paula Hansen Suss 1, Alexandra Cristina Senegaglia 1, Danielle Jackowski 1, Leticia Fracaro 1, Lidiane M. B. Leite 1, Carmen L. K. Rebelatto 1, Alejandro Correa 2, Paulo R. S. Brofman 1.*

1. Núcleo de Tecnologia Celular - Pontifícia Universidade Católica do Paraná
2. Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco - Instituto Carlos Chagas

Financial Support: MCT/CT-Saúde, Decit/SCTIE/MS, CNPq and Fundação Araucária.

**Objectives:** The aim of this study was to isolate and characterize human umbilical cord (HUC)-derived mesenchymal stem cells (MSC) and human umbilical cord blood (HUCB)-derived endothelial progenitor cells (EPC).

**Materials:** MSC were isolated by enzymatic dissociation of Wharton's Jelly and EPC were isolated from the HUCB positively selected using CD133-coupled magnetic microbeads.

**Results:** Morphological, functional and phenotype characterization of cells was performed in the third passage. MSC showed typical spindle-shaped morphology, the immunophenotypic profile were positive for CD 105 (98,8%), CD 29 (94,2%), CD 146 (84,1%), CD 166 (67%), CD 31 (62,2%), CD 201 (43,7%), CD 106 (12,9%) and reduced expression for CD 34 (10,8%), CD 133 (5,5%), CD 117 (7,2%), CD 144 (5,1%), CD 309 (2,3%), CD 45 (0,8%). Indirect immunofluorescence showed positive staining for primary antibodies anti-Vimentin and anti-CD105 and also showed differentiation potential into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts. EPC showed typical endothelial cobblestone morphology, the immunophenotypic profile were positive for CD 105 (98,8%), CD 29 (94,2%), CD 146 (84,1%), CD 166 (67%), CD 31 (62,2%), CD 201 (43,7%), CD 106 (12,9%) and reduced expression for CD 34 (10,8%), CD 133 (5,5%), CD 117 (7,2%), CD 144 (5,1%), CD 309 (2,3%), CD 45 (0,8%). Indirect immunofluorescence of EPC showed positive staining for primary antibodies anti-von Willebrand, anti-CD31, anti-CD106 and anti-VEGF. The EPC were double-positive for LDL uptake and Lectin binding, beyond form three-dimensional capillary tubules in vitro.

**Conclusions:** Since the acquisition of MSC and EPC is feasible and that the cell type needed in the future is uncertain, it is suggested that in addition to storage of HUCB also be made for HUC-derived MSC, allowing broader applications in regenerative medicine.