

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

**KARINA DUTRA ASENSI**

**SANGUE MENSTRUAL COMO FONTE DE CÉLULAS-  
TRONCO RESISTENTES AO ESTRESSE OXIDATIVO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA A UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)

RIO DE JANEIRO

2012

Karina Dutra Asensi

## **Sangue menstrual como fonte de células-tronco resistentes ao estresse oxidativo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

### **Orientadores:**

Prof. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Prof. Dra. Adriana Bastos Carvalho

Rio de Janeiro

2012

Asensi, Karina Dutra.

Sangue menstrual como fonte de células-tronco resistentes ao estresse oxidativo / Karina Dutra Asensi. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2012.

xxi, 120 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Regina Coeli dos Santos Goldenberg e Adriana Bastos Carvalho.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), 2012.

Referências bibliográficas: f. 94-103.

1. Menstruação - sangue. 2. Endométrio - citologia. 3. Células-tronco mesenquimais - fisiologia. 4. Células-tronco embrionárias - fisiologia. 5. Células-tronco pluripotentes induzidas - fisiologia. 6. Estresse oxidativo - fisiologia. 7. Espécies de oxigênio reativas. 8. Células cultivadas. 9. Separação celular. 10. Ciências Biológicas (Fisiologia) - Tese. I. Goldenberg, Regina Coeli dos Santos. II. Carvalho, Adriana Bastos. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia). IV. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio De Janeiro com auxílio das entidades: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio De Janeiro (FAPERJ), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB) e Decit/Ministério da Saúde.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

KARINA DUTRA ASENSI

### **Sangue menstrual como fonte de células-tronco resistentes ao estresse oxidativo**

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro, 20 de Abril de 2012.

#### **Prof. Dr. Adalberto Ramon Vieyra – Membro da Banca Examinadora**

Laboratório de Físico-Química Biológica Aida Hassón Voloch do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### **Profa. Dra. Rosalia Mendez Otero – Membro da Banca Examinadora**

Laboratório de Neurologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### **Prof. Dr. Kleber Luiz de Araújo e Souza – Membro da Banca Examinadora**

Laboratório de Fisiologia Endócrina Doris Rosenthal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### **Prof. Dr. Rodrigo Soares Fortunato – Revisor e Suplente Interno**

Laboratório de Fisiologia Endócrina Doris Rosenthal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### **Profa. Dra. Cristiane del Corso – Suplente Externa**

Laboratório De Eletrofisiologia Cardíaca Prof. Antonio Paes de Carvalho do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

## Agradecimentos

Aos meus pais, Marise e Alberto, que sempre lutaram para que nada me faltasse e me deram muito amor e carinho. Esses me ensinaram a ser digna, honesta e batalhar muito para alcançar tudo o que desejo.

Ao meu irmão Felipe, que esteve ao meu lado todos esses anos, servindo-me como espelho tanto em casa como nos estudos, sendo um grande orgulho para mim.

Aos meus irmãos Gabrielle, Milton e Isabelle por todo carinho, amor e compreensão. Sempre me fazendo sorrir com as suas brincadeiras.

À minha Orientadora Prof.<sup>a</sup> Regina Coeli dos Santos Goldenberg pelo incentivo, simpatia e presteza no auxílio às atividades e discussões sobre o andamento e normatização desta dissertação de mestrado.

À minha Orientadora Prof.<sup>a</sup> Adriana Bastos Carvalho, pelo seu espírito inovador, pela sua disciplina me ensinando a importância do trabalho em grupo e pela oportunidade de participação em publicações desde o início.

Ao Prof. Antonio Carlos Campos de Carvalho, pelo grande apoio científico, pela oportunidade que me foi dada e por acreditar em meu crescimento profissional.

À Prof.<sup>a</sup> Denise Pires Carvalho por ter aberto as portas do seu laboratório para que essa pesquisa fosse desenvolvida.

Às minhas grandes amigas do LCCM, Grazi, Lanuza, Danúbia, Bia e Vanessa pelas intermináveis conversas, almoços, experimentos durante o dia, à noite e finais de semana.

Aos colegas que fazem a nossa jornada no laboratório mais prazerosa Débora, Guilherme, NoBru, LF, Ju P, Camila, Suzana, Isa, Cris, Fer, Taís, Danielle, Thaissa

Emiliano, Deivid, dona Conceição, Thiago. Pessoas que conviveram comigo ao longo deste período e sei que posso contar com vocês a qualquer momento desta trajetória.

Às doadoras do sangue menstrual que não pouparam esforços para que este tipo celular fosse estudado.

Às agências de fomento FAPERJ, CNPq, CAPES, INCT que foram fundamentais para a realização deste projeto.

À Deus, pela minha saúde, pela oportunidade e pelo privilégio que nos foram dados em compartilhar tamanha experiência e, ao freqüentar este curso, perceber e atentar para a relevância de temas que não faziam parte, em profundidade, das nossas vidas.

“Mesmo as noites totalmente sem estrelas  
podem anunciar a aurora de uma grande  
realização”

## Resumo

**ASENSI, Karina Dutra. Sangue menstrual como fonte de células-tronco resistentes ao estresse oxidativo.** Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia – Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Trabalhos recentes mostram que células-tronco mesenquimais obtidas do sangue menstrual apresentam um potencial benéfico no tratamento de doenças em que o dano tecidual está ligado ao estresse oxidativo (EO). Espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um papel importante na regulação da adesão, migração e proliferação celular e, neste contexto, existem evidências de que EROs inibem a adesão celular de células-tronco transplantadas. Portanto, nosso objetivo foi caracterizar as células mesenquimais multipotentes derivadas do sangue menstrual (CeSaM) e investigar o impacto do EO sobre as CeSaM, comparando-as com células-tronco pluripotentes (H9 e iPSC-CeSaM). Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ, RJ, Brasil). O tempo de duplicação das CeSaM foi 36,9 horas independente do uso de contraceptivos orais. A imunofenotipagem por citometria de fluxo indicou que essas células são positivas para os marcadores de células mesenquimais e negativas para os marcadores hematopoiéticos e endoteliais. As CeSaM também apresentaram a expressão moléculas relacionadas a pluripotência como Oct4, Sox2 e Nanog, detectados por RT-PCR, e SSEA-4, TRA1-60 e TRA1-81, detectados por imunofluorescência. Além disso, estas células foram capazes de se diferenciar em células da linhagem adipogênica e osteogênica. Para os ensaios de resistência ao EO, CeSaM e fibroblastos humanos foram cultivados com concentrações crescentes de  $H_2O_2$  e sua viabilidade foi avaliada pelo ensaio do MTT. A dose que mata 50% ( $IC_{50}$ ) das células foi 1812  $\mu M$  para a CeSaM e 816  $\mu M$  para os fibroblastos. Além disso, as CeSaM produziram três vezes mais  $H_2O_2$  extracelular do que células-tronco pluripotentes (CeSaM: 5.8, iPSC: 2.26 e H9: 2.17 nmol  $H_2O_2/h/10^5$  células). Para medir a produção de EROs intracelular, as células foram incubadas com 10  $\mu M$  de CM-H2DCFDA e a intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Nenhuma diferença foi encontrada na quantidade de EROs produzida no citoplasma da CeSaM, iPSC e H9 em condições basais. Entretanto, quando adicionamos  $H_2O_2$  exógeno, as H9 tiveram um aumento significativo no conteúdo citoplasmático de EROs. A análise da expressão gênica para enzimas antioxidantes por RT-PCR em tempo real mostrou que a expressão de catalase, SOD1, SOD2, SOD3 foi maior nas CeSaM quando comparadas as outras duas linhagens pluripotentes. Além disso, a expressão de GPx1 foi maior na CeSaM quando comparada à iPSC. A atividade da GPx foi similar na CeSaM, iPSC e H9, apesar de as H9 apresentarem maior expressão de GPx3. Como conclusão, os

dados de caracterização indicam que as CeSaM são células-tronco multipotentes mesenquimais que também expressam marcadores de pluripotência. Além disso, essas células apresentaram alta resistência ao estresse oxidativo, provavelmente porque elas são capazes de produzir mais EROs, levando a uma maior expressão das enzimas antioxidantes. Em contraste, após a reprogramação para um estágio de pluripotência, a iPSC gerada a partir da CeSaM perdeu a característica de resistência ao EO apresentando um perfil de resposta semelhante ao das células-tronco embrionárias. Assim, a CeSaM pode ser considerada uma fonte estratégica para terapia celular no tratamento de pacientes com doenças que cursam em associação ao EO.

Palavras-chave: Células derivadas do sangue menstrual, células mesenquimais, estresse oxidativo, enzimas antioxidantes.

## ABSTRACT

**ASENSI, Karina Dutra. Human Menstrual Blood As A Source Of Stem Cells Resistant To Oxidative Stress.** Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia – Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Recently, mesenchymal stem cells were obtained from menstrual blood and proved to be useful to treat diseases in which tissue damage is linked to oxidative stress (OS). Reactive oxygen species (ROS) play a key role in the regulation of cell adhesion, migration, proliferation and it has been demonstrated that ROS inhibit cellular adhesion of transplanted stem cells. Thus, the aim of this work was to characterize human menstrual blood-derived mesenchymal cells (MBMC) and investigate the impact of OS in MBMC, comparing the response of MBMC to human embryonic stem cells (H9) and induced pluripotent stem cells derived from MBMC (iPS-MBMC). All experiments below were approved by the institutional review board of the Clementino Fraga Filho University Hospital (UFRJ, RJ, Brazil). Population doubling time of MBMC was 36,9 hours, regardless of the use of contraceptives. After five passages, the presence of surface markers was evaluated by flow cytometry. These cells were positive for the mesenchymal cell markers and negative for hematopoietic and endothelial markers. Moreover, MBMC expressed pluripotency markers such as Oct4, Sox2 and Nanog by RT-PCR, and SSEA-4, TRA1-60 and TRA1-81 by immunofluorescence. These cells were also capable of differentiating in adipogenic and osteogenic lineages. For assays of resistance to OS, MBMC and fibroblasts were cultured with increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations and cell viability was evaluated by MTT assay. The dose which kills 50% (IC<sub>50</sub>) of the cells was 1812 µM for MBMC and 816 µM for fibroblasts. Moreover, MBMC produce three times more extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than iPSC and H9 (5.8; 2.26; 2.17 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/h/10<sup>5</sup> cells, respectively). To measure intracellular ROS production, cells were incubated with 10 µM of CM-H2DCFDA and fluorescence intensity was measured by flow cytometry. No differences were found in the amount of ROS produced in the cytoplasm of MBMC, iPSC and H9 in baseline conditions. However, when exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added, H9 had a significant increase in the cytoplasmic amount of ROS. In addition, expression of genes coding for antioxidant enzymes was assessed by real-time RT-PCR and that expression of catalase, SOD1, SOD2, SOD3 was higher in MBMC when compared with the other two lines of pluripotent stem cells. In addition, GPx1 expression was higher in MBMC when compared to iPSC. GPx activity was similar in MBMC, iPS-MBMC and ES cells, although H9 had higher expression of GPx3. In conclusion, characterization data indicate that MBMC are multipotent mesenchymal stem cells and express pluripotency markers. Moreover, MBMC presented high

resistance to OS, probably because they are capable of producing more ROS, leading to a greater expression of antioxidant enzymes. In contrast, after reprogramming to a pluripotent stage, iPSC generated from MBMC were not OS resistant and were similar to embryonic stem cells. Therefore, MBMC might be considered a source for cell therapy aimed at treating patients with diseases in which onset and progression is associated with OS.

Key words: Menstrual blood derived cells, mesenchymal stem cells, oxidative stress, antioxidant enzymes.

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1.</b> Dois modelos de divisão de células-tronco.....	2
<b>Figura 2.</b> Classificação das células-tronco de acordo com a sua plasticidade.....	5
<b>Figura 3.</b> Ilustração do aparelho reprodutor feminino.....	13
<b>Figura 4.</b> Histologia da parede do corpo do útero.....	14
<b>Figura 5.</b> Histologia do endométrio.....	15
<b>Figura 6.</b> Ilustração da composição do endométrio.....	16
<b>Figura 7.</b> Ilustração da regeneração endometrial durante o ciclo menstrual.....	20
<b>Figura 8.</b> Protocolo experimental para o isolamento das células derivadas do sangue menstrual .....	36
<b>Figura 9.</b> Microscopia óptica de contraste de fase das células humanas aderentes derivadas do sangue menstrual em cultura.....	56
<b>Figura 10.</b> Microscopia óptica de contraste de fase das CTE (H9) e iPSC em cultura.....	57
<b>Figura 11.</b> Microscopia óptica de contraste de fase dos hFIB em quinta passagem.....	58
<b>Figura 12.</b> Tempo de duplicação da população.....	60
<b>Figura 13.</b> Histograma representativo da morfologia das células em cultura em quinta passagem .....	61
<b>Figura 14.</b> Representação gráfica dos tipos celulares presentes na cultura de quinta passagem.....	62
<b>Figura 15.</b> <i>Dots plots</i> representativos das CeSaM na cultura em quinta passagem.....	64
<b>Figura 16.</b> Quantificação por citometria de fluxo.....	65
<b>Figura 17.</b> Foto ilustrativa da indução de diferenciação osteogênica <i>in vitro</i> .....	67
<b>Figura 18.</b> Foto ilustrativa da indução de diferenciação adipogênica <i>in vitro</i> .....	67

<b>Figura 19.</b> Expressão dos transcritos relacionados à pluripotência nas CeSaM.....	69
<b>Figura 20.</b> Fotomicrografias das imunofluorescências das CeSaM.....	71
<b>Figura 21.</b> Ensaio de viabilidade celular das CeSaM e hFib ao serem expostos ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	73
<b>Figura 22.</b> Produção extracelular de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nas CeSaM, H9 e iPSC.....	74
<b>Figura 23.</b> Inibição da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> com DPI nas CeSaM.....	75
<b>Figura 24.</b> Produção intracelular de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nas CeSaM, H9 e iPSC.....	76
<b>Figura 25.</b> Gel de agarose com os produtos de amplificação da reação de RT-PCR para as diferentes enzimas antioxidantes nas CeSaM, H9, e iPSC.....	77
<b>Figura 26.</b> RT-PCR em tempo real para as diferentes enzimas antioxidantes.....	78
<b>Figura 27.</b> Atividade da glutathiona peroxidase.....	80

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Resumo das moléculas de superfície e intracelulares presentes nas células derivadas do sangue menstrual de cultura em expansão descritas na literatura.....	23
<b>Tabela 2.</b> Painel de anticorpos utilizados para o estudo das células mesenquimais derivadas do sangue menstrual.....	41
<b>Tabela 3.</b> Sequência de primers utilizados para detecção de transcritos de pluripotência.....	45
<b>Tabela 4.</b> Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência nas CeSaM.....	46
<b>Tabela 5.</b> Sequência de primers utilizados para detecção de transcritos das enzimas antioxidantes.....	51

## Lista de Abreviaturas e Siglas

- ANG-2**.....Angiopoitina 2
- APC**.....Alofococianina (do inglês *Allophycocyanin*)
- AVEi**.....Acidente vascular encefálico isquêmico
- BDNF**.....Fator neurotrófico do cérebro (do inglês *Brain-derived neurotrophic fator*)
- BSA**.....Albumina sérica bovina (do inglês *bovine serum albumin*)
- BSS**.....Solução salina balanceada (do inglês *Balanced Salt Solution*)
- BSS-CMF**....Solução salina balanceada sem cálcio e magnésio (do inglês *Balanced Salt Solution Calcium and Magnesium Free*)
- CAT**.....Catalase
- CD**.....Grupo de diferenciação (do inglês *Cluster of Differentiation*)
- cDNA**.....DNA complementar
- CeSaM**.....Células mesenquimais derivadas do sangue menstrual
- CM-H<sub>2</sub>DCFDA**.....Clorometil derivado do H<sub>2</sub>DCFDA
- CT**.....Célula-tronco
- CTE**.....Células-tronco embrionárias
- CTM**.....Células-tronco mesenquimais
- DAPI**.....do inglês 4'-6-*Diamidino-2-phenylindole*
- DCF**.....do inglês *dichlorodihydrofluorescein*
- DMEM**.....Meio Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DMSO**.....Dimetilsulfóxido
- DNA**.....Ácido desoxirribonucleico ( do inglês *Deoxyribonucleic acid*)
- DPI**.....do inglês *diphenyliodonium*
- EDTA**.....Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*).
- EGTA**.....Ácido tetra-acético etileno glicol (do inglês *ethylene glycol tetraacetic acid*)
- EO**.....Estresse oxidativo
- EROs**.....Espécies reativas de oxigênio
- FITC**.....Isotiocianato de fluoresceína (do inglês *Fluorescein isothiocyanate*)
- FCS**.....Dispersão Frontal (do inglês *forward scatter*)

- FSH**.....Hormônio folículo-estimulante (do inglês *Follicle-Stimulating Hormone*)
- GAPDH**.....Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase
- GM-CSF**.....Fator estimulador de colônia de granulócito ( do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating fator*)
- GPX**.....Glutationa peroxidase
- GPX 1**.....Glutationa peroxidase 1
- GPX 3**.....Glutationa peroxidase 3
- GR**.....Glutationa redutase
- GSH**.....Glutationa reduzida
- GSSG**.....Glutationa oxidada
- HEPES**.....Ácido N-2-hidroxietilpiperazina N'-2'etanossulfônico
- hFIB**.....Fibroblasto dermal humano
- HRP**..... Peroxidase de raiz forte (do inglês *horseradish peroxidase*)
- HUCFF**.....Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
- HUVEC**.....Células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (do inglês *human umbilical vein endothelial cells*)
- IBCCF**.....Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
- IBMX**.....3-isobutil-1-metilxantina (do inglês *3-isobutyl-1-methylxanthine*)
- iPSC**.....Células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *induced pluripotent stem cells*)
- iPSC – CeSaM**.....Células-tronco pluripotentes induzidas derivadas das células-tronco mesenquimais derivadas do sangue menstrual
- ISCT**.....Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês *International Society for Cellular Therapy*)
- LH**.....Hormônio Luteinizante (do inglês *Luteinizing hormone*)
- MIF**.....Média de intensidade de fluorescência
- MMP-3**.....Metaloproteinase 3
- MMP-10**.....Metaloproteinase 10
- MTT**.....do inglês *Thiazolyl blue tetrazolium bromide*
- mm<sup>2</sup>**.....Milímetros quadrados
- NADP**.....Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NADPH**.....Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
- NIH**.....National Institutes of Health
- NOX**.....NADPH oxidase

- NT-3**.....Neurotrofina-3
- OMS**.....Organização Mundial de Saúde
- OS**.....Estresse oxidativo (do inglês *oxidative stress*)
- PBS**.....Salina tamponado com fosfato (do inglês *Phosphate buffered saline*)
- PCR**.....Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction*)
- PDT**.....Tempo de duplicação da população (do inglês *population doubling time*)
- PDGF-BB**.....Fator de crescimento derivado de plaqueta BB ( do inglês *platelet-derived growth fator BB*)
- PE**.....Ficoeritrina (do inglês *phycoerytrin*)
- Pen**.....Penicilina
- PerCP**.....Complexo proteína-clorofila-peridina (do inglês *Peridinin-chlorophyll-protein complex*)
- PE-Cy7**.....Ficoeritrina ciano 7 (do inglês *phycoerytrin cyan 7*)
- PFA**.....Paraformaldeído
- PMSF**.....Fenilmetanosulfonilfluoreto (do ingles *phenylmethylsulphonyl fluoride*)
- RNA**.....ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)
- RT**.....Transcriptase reversa (do inglês *Reverse Transcriptase*)
- ROS**.....Espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)
- SFB**.....Soro Fetal Bovino
- SOD 1**.....Superóxido dismutase 1
- SOD 2**.....Superóxido dismutase 2
- SOD 3**.....Superóxido dismutase 3
- SSC**.....Dispersão lateral (do inglês *side scatter*)
- Strep**.....Estreptomicina
- TCLE**.....Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- VEGF**.....Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês *vascular endotelial growth fator*)

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1) Células-tronco .....	1
1.1.1) Plasticidade .....	3
1.1.2) Origem.....	6
1.1.3) Células-tronco mesenquimais .....	10
1.2) O endométrio .....	12
1.3) Fases do ciclo menstrual.....	16
1.4) Células-tronco mesenquimais derivadas do sangue menstrual .....	21
1.5) Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> utilizando as CeSaM.....	22
1.6) Estresse oxidativo e as células-tronco .....	27
<b>2. Objetivos</b> .....	32
2.1) Objetivo Geral: .....	32
2.2) Objetivos Específicos: .....	32
<b>3. Metodologia</b> .....	34
3.1) Isolamento e cultivo dos diferentes tipos celulares envolvidos no estudo:.....	34
3.1.1) Coleta das células humanas derivadas do sangue menstrual: .....	34
3.1.2) Isolamento das células presentes no sangue menstrual:.....	35
3.1.3) Cultivo e expansão da fração aderente das células derivadas sangue menstrual:.....	36
3.1.4) Cultivo das células-tronco embrionárias humanas (CTE-H9) e das células-tronco pluripotentes induzidas derivadas das CeSaM (iPSC-CeSaM):.....	37
3.1.5) Isolamento e cultivo dos fibroblastos dermais humanos: .....	38

3.2) Caracterização das CeSaM <i>in vitro</i> .....	39
3.2.1) Avaliação da capacidade proliferativa <i>in vitro</i> pelo método de Tempo de Duplicação da População ( PDT): .....	39
3.2.2) Análise fenotípica por citometria de fluxo:.....	40
3.2.3) Ensaio de diferenciação: .....	42
3.2.3 - 1) Osteogênico: .....	43
3.2.3 - 2) Adipogênico: .....	43
3.2.4) Extração de RNA total.....	43
3.2.5) Reação da transcrição reversa.....	44
3.2.6) Reação em cadeia da polimerase (PCR) para caracterização das CeSaM com relação a pluripotência.....	44
3.2.7) Imunofluorescência para caracterização das CeSaM com relação a pluripotência.....	46
3.3) Susceptibilidade da CeSaM à morte induzida por espécies reativas de oxigênio .....	48
3.4) Dosagem da geração extracelular de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	49
3.5) Avaliação das NADPH oxidases como fonte geradora de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> extracelular nas CeSaM .....	49
3.6) Geração intracelular de espécies reativas de oxigênio .....	50
3.7) RT-PCR em tempo real para as enzimas antioxidantes .....	50
3.8) Atividade da glutatona peroxidase .....	52
3.8.1) Preparação do homogenato .....	52
3.8.2) Determinação da atividade da glutatona peroxidase (GPx).....	52
3.9) Análises estatísticas.....	53

<b>4. Resultados</b> .....	54
4.1) Isolamento e cultivo dos diferentes tipos celulares envolvidos no estudo:.....	54
4.1.1) Cultivo da subpopulação de células derivadas do sangue menstrual aderentes ao plástico .....	54
4.1.2) Cultivo das CTE-H9 e iPSC-CeSaM .....	57
4.1.3) Cultivo dos fibroblastos dermais humanos (hFIB) .....	58
4.2) Caracterização das CeSaM <i>in vitro</i> .....	59
4.2.1) Potencial de proliferação das células obtidas <i>in vitro</i> .....	59
4.2.2) Caracterização imunofenotípica das células humanas derivadas do sangue menstrual pós-cultivo .....	61
4.2.3) Diferenciação osteogênica e adipogênciã das CeSaM .....	66
4.2.4) Avaliação de moléculas características de células pluripotentes por RT-PCR.....	68
4.2.5) Avaliação da tradução de proteínas por imunofluorescência .....	70
4.3) Susceptibilidade das CeSaM à morte induzida por espécies reativas de oxigênio .....	72
4.4) Comparação da produção extracelular de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> entre os diferentes tipos celulares.....	73
4.5) Avaliação da fonte geradora de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> extracelular nas CeSaM .....	74
4.6) Comparação da produção intracelular de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> entre os diferentes tipos celulares .....	75
4.7) Avaliação dos níveis de RNA mensageiros das enzimas antioxidantes por RT-PCR em tempo real nos diferentes tipos celulares.....	76
4.8) Atividade da glutationa peroxidase nos diferentes tipos celulares .....	79
<b>5. Discussão</b> .....	81
<b>6. Conclusão</b> .....	93

<b>Referências Bibliográficas</b> .....	94
Anexo A – Principais Características das Moléculas CD .....	104
Anexo B – Artigo da geração da iPSC-CeSaM .....	105

## **1. Introdução:**

A partir da virada do milênio, a medicina regenerativa vem se configurando como uma alternativa terapêutica para doenças crônico-degenerativas (HESS E BORLONGAN, 2008; SEGERS E LEE, 2008). Esta medicina consiste na utilização de células, de fatores de proliferação e diferenciação celulares, e de biomateriais que permitam o próprio organismo reparar tecidos e órgãos lesados (NOLAN *et al.*, 2008).

As terapias celulares, por meio do uso clínico de células-tronco, surgem como uma promissora alternativa terapêutica, no entanto, para compreender o extraordinário potencial terapêutico destas células, faz-se necessário entender o que são e quais são os tipos e as características fundamentais das células-tronco.

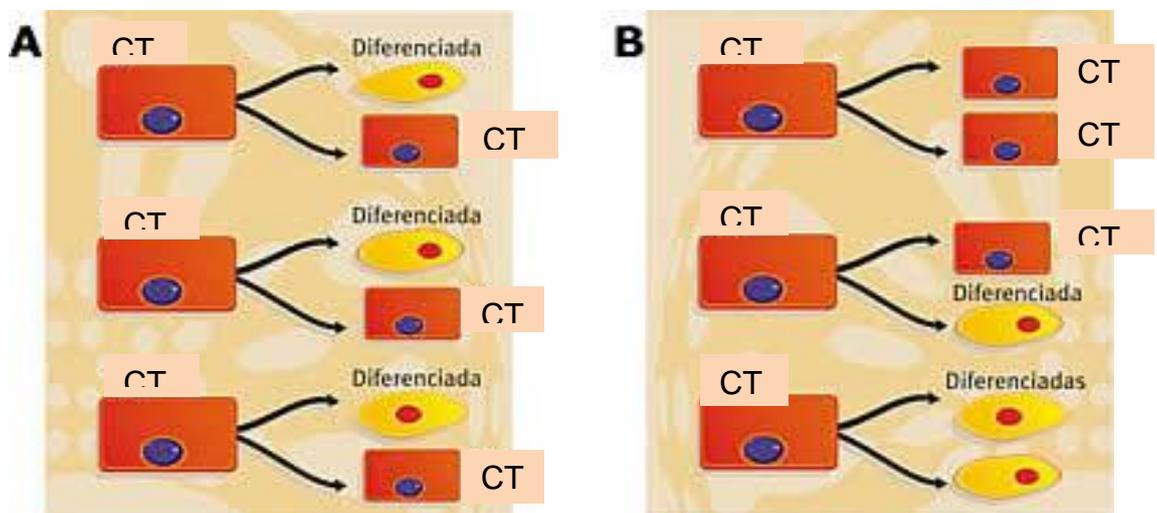
### **1.1 Células-tronco**

Um organismo pluricelular, como, por exemplo, o ser humano, é constituído por aproximadamente 75 trilhões de células, distribuídas em torno de 200 tipos celulares distintos. Todos eles derivam de células precursoras, denominadas células-tronco (JOHNSON *et al.*, 2004).

Em 1839, o alemão Theodor Schwann (1810-1882) lançou as bases da teoria celular, despertando o fascínio por estas células. A partir de então, o aprofundamento dos estudos sobre células-tronco definiu-as com base em três características básicas. A primeira delas é que são células indiferenciadas, logo não apresentam especialização funcional. A segunda característica é que estas células

possuem a capacidade de se dividir ilimitadamente, ou pelo menos durante toda a vida de um animal.

Por fim, quando se dividem, cada “célula-filha” formada pode manter-se indiferenciada ou pode dar origem a uma célula funcionalmente especializada. Para realizar a auto-renovação e diferenciação, a célula-tronco pode seguir dois modelos de divisão, o determinístico ou o estocástico. O modelo determinístico diz que a célula-tronco sempre gera uma nova célula-tronco e uma célula diferenciada. Já o modelo estocástico (ou aleatório) indica que as células-tronco podem gerar duas novas células-tronco ou uma célula-tronco e uma célula diferenciada ou, ainda, são capazes de gerar apenas células diferenciadas, conforme exemplificado na Figura 1 (JOHNSON *et al*, 2004).



**Figura 1: Dois modelos de divisão de células-tronco:** o determinístico (A), que gera sempre uma célula-tronco e uma célula diferenciada, e o estocástico (B) em que podem ser geradas diversas combinações de células. CT: célula-tronco. Adaptado de <http://www.educacaopublica.rj.gov.br>.

As células-tronco podem ser classificadas quanto à sua plasticidade e origem.

### **1.1.1 Plasticidade**

Existem três tipos de classificações de acordo com a plasticidade exibida pelas células-tronco: totipotentes, pluripotentes e multipotentes, conforme exemplificado na Figura 2.

#### **Células-tronco totipotentes**

São capazes de formar todos os tecidos que compõem o embrião, bem como os anexos embrionários. O início da formação da placenta e seus anexos ocorrem somente com a implantação das células totipotentes no útero. Como exemplos de células-tronco totipotentes temos o zigoto e os 4 primeiros blastômeros derivados das duas divisões mitóticas após a fecundação (TORRES-PADILLA, 2008; MITALIPOV E WOLF, 2009).

#### **Células-tronco pluripotentes**

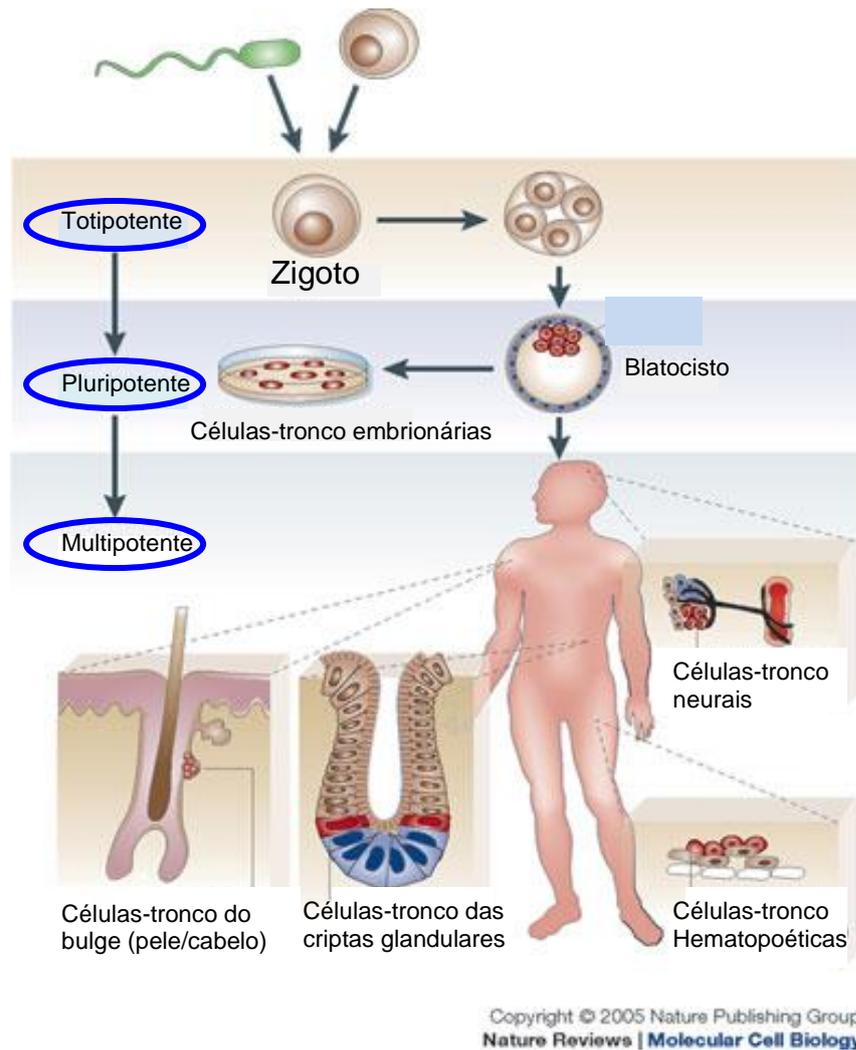
São capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular encontrado nas três camadas germinativas. Logo, possuem o potencial de dar origem a células do endoderma (que origina como exemplo, trato gastrointestinal e pulmões), mesoderma (que origina como exemplo, os músculos, ossos, sangue e sistema urogenital) e ectoderma (que origina como exemplo, o sistema nervoso e tecidos epidermais).

As células-tronco pluripotentes podem se especializar em células de qualquer tecido do organismo, no entanto, não possuem a capacidade de desenvolver um

indivíduo adulto, já que não são capazes de dar origem aos tecidos extra-embrionários. Como exemplos de células pluripotentes temos as células-tronco embrionárias, que são obtidas da massa interna do blastocisto (JOHNSON *et al.*, 2004) e as células-tronco pluripotentes induzidas, que podem ser obtidas através da superexpressão de quatro genes (*Oct 3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, e *Klf4*) (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006).

### **Células-tronco multipotentes**

Possuem capacidade de diferenciação mais limitada, diferenciando-se somente em linhagens relacionadas ao seu tecido de origem. Encontram-se distribuídas pelo organismo em nichos e acredita-se que tenham importância em mecanismos de reparo do tecido onde se localizam (JOHNSON *et al.*, 2004). São responsáveis por manter a homeostase tecidual e substituir, de acordo com o limite de regeneração do tecido onde se encontram, as células especializadas mortas por doença, lesão ou pelo próprio envelhecimento celular (LEBLOND *et al.*, 1964). Como exemplo de células multipotentes, temos as células-tronco adultas encontradas no tecido adiposo, no sistema nervoso, no coração, nos rins e na medula óssea.



**Figura 2: Classificação das células-tronco de acordo com sua plasticidade.** Como exemplo de células totipotentes temos o zigoto, de células pluripotentes temos as células-tronco embrionárias e de células multipotentes temos as células-tronco neurais, hematopoiéticas, do bulge capilar e das criptas glandulares. Adaptado de *Nature Reviews/Molecular Cell Biology*, 2005.

## 1.1.2 Origem

### Células-tronco embrionárias

Em 1981, as células-tronco embrionárias de camundongo foram isoladas pela primeira vez (EVANS E KAUFMAN,1981; MARTIN *et al.*, 1981). Estas são células derivadas da massa interna de blastocistos de mamíferos, que podem proliferar-se indefinidamente preservando a sua pluripotência e mantendo esta característica *in vitro* (JOHNSON *et al.*, 2004).

Novas perspectivas foram alcançadas na ciência com a imortalização das células-tronco embrionárias (CTE) humanas em 1998 (THOMSON *et al.*, 1998) possibilitando a aproximação da realidade com o sonho da bioengenharia tecidual e ampliando a utilização de células-tronco em terapia celular. Entretanto, ainda temos limites tecnológicos para serem transpassados para aplicação clínica das células-tronco embrionárias. Um destes limites é a altíssima taxa de proliferação deste tipo celular, pois o motivo dessa elevada proliferação ainda não é conhecido. Assim, a utilização destas células pode oferecer riscos, já que as CTE podem reproduzir-se descontroladamente levando à formação de teratomas.

Outra limitação é a rejeição imunológica que pode ser desencadeada pelas células diferenciadas originadas a partir das embrionárias, devido a presença do complexo de histocompatibilidade (ROBERTSON *et al.*, 2001).

A dificuldade na geração de uma população celular homogênea e pura, em quantidade suficiente para realização de transplantes para utilização na clínica é outro grande desafio a ser vencido, bem como qual seria a melhor maneira para aplicá-las, considerando quais vias de injeções e quais doenças devem ser tratadas.

## **Células-tronco de pluripotência induzida**

Um grande avanço no campo das células-tronco surgiu quando Takahashi e Yamanaka (2006) descobriram que a superexpressão de quatro genes (*Oct 3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, e *Klf4*) a partir de transduções retrovirais em uma população de fibroblastos de camundongo poderia gerar o aparecimento de algumas células com características de células-tronco embrionárias. Neste trabalho, foram utilizados vetores retrovirais para introduzir, nos fibroblastos adultos, uma pequena biblioteca de cDNA de 24 genes comumente expressos em CTE. A fim de determinar quais os fatores mínimos necessários para a reprogramação deste tipo celular, eles foram sendo eliminados progressivamente da população inicial utilizada, um por vez. Como resultado, os autores identificaram os quatro fatores-chave necessários para induzir a pluripotência em fibroblastos (YAMANAKA & BLAU, 2010).

Após seleção pela expressão de *Nanog*, além dos quatro genes supracitados, as células-tronco resultantes foram capazes de originar células dos três folhetos embrionários quando transplantadas em embriões hospedeiros imunodeficientes (GURDON & MELTON, 2008). Devido às suas propriedades pluripotentes, estas células foram nomeadas de células de pluripotência induzida (iPSC).

No ano seguinte, dois grupos independentes (WERNIG *et al.*, 2007; OKITA *et al.*, 2008) mostraram que a superexpressão destes quatro fatores levou a geração de células capazes de formar quimeras adultas e de gerar células da linhagem germinativa.

Aparentemente, os transgenes codificantes para os quatro fatores só precisam estar presentes quando as iPSC estão sendo geradas. Uma vez que a

linhagem esteja estabelecida, os transgenes retrovirais são silenciados, e os genes endógenos codificantes para os quatro fatores se tornam ativos (HOTTA & ELLIS, 2008). Desta forma, a auto-renovação e a manutenção da pluripotência das iPSC se baseiam inteiramente na expressão endógena dos genes codificantes para OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC.

O valor futuro das células reprogramadas pode seguir duas vertentes. A primeira é a de geração de linhagens celulares de longa duração de pacientes com doenças genéticas com o intuito de testar a segurança e eficácia de novas drogas. A segunda é prover células para terapia celular. No entanto, os desafios tecnológicos para tornar o uso dessas células seguro ainda devem ser vencidos, como a inserção aleatória dos genes utilizados na reprogramação no genoma.

Diante destas questões, as células-tronco adultas estão sendo bastante estudadas trazendo novas perspectivas promissoras para o cenário da terapia celular.

### **Células-tronco adultas**

As células-tronco adultas são encontradas em diversos tecidos do organismo e organizadas em nichos (SUJATA *et al.*, 2008). Algumas delas já estão sendo utilizadas em ensaios clínicos como, por exemplo, as células-tronco derivadas da medula óssea, cordão umbilical e tecido adiposo (NIH, 2009).

Existiram controvérsias na literatura em relação à plasticidade das células-tronco adultas. Diversos estudos, de 1998 a 2002, causaram impacto ao afirmar que essas células seriam pluripotentes, assim como as embrionárias (BJORNSON *et al.*, 1999). Em 1999, foi publicado na revista *Science* um artigo polêmico escrito por

Bjornson e colaboradores, denominado *Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo*. Neste estudo foi realizada a ablação da medula óssea de ratos e estes foram transplantados com células-tronco neurais, as quais foram capazes de repopular a medula óssea, produzindo células sanguíneas. Em 2001, surgiram novos estudos que comprovaram que as células-tronco adultas seriam multipotentes e não pluripotentes (WAGERS *et al*, 2002; MURRY *et al.*, 2004). Este novo pensamento, aceito pela maior parte da comunidade científica, pode ser exemplificado pelo artigo escrito por Wagers e colaboradores, também publicado na revista *Science*, em 2002, intitulado *Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells*. Neste artigo, os autores demonstram elegantemente que as células-tronco hematopoiéticas são capazes de repopular a medula óssea de um animal submetido à ablação de medula, no entanto são incapazes de se transdiferenciar em outros tipos celulares encontrados no músculo, rins, fígado e cérebro.

Portanto, as células-tronco adultas são consideradas células multipotentes que possuem uma menor capacidade de proliferação, quando comparadas com as células-tronco embrionárias, têm capacidade de diferenciação restrita ou dirigida e apresentam a enorme vantagem de não formarem teratomas *in vivo*. Além disso, podemos utilizar como ferramenta na terapia celular o transplante autólogo de células-tronco adultas, minimizando a possibilidade de rejeição imunológica, sendo assim um importante tipo celular para ser utilizado na medicina regenerativa (ASAHARA *et al.*, 2000).

As células mononucleares de medula óssea são as mais usadas nos ensaios pré-clínicos e clínicos. A utilização dessas células em doenças degenerativas mostrou resultados muito variáveis. Alguns autores relataram benefícios (KAMATA

*et al.*, 2007; STRAUER *et al.*, 2008; AMANN *et al.*, 2009) e outros relataram que não houve efeito benéfico (PERIN *et al.*, 2012). Portanto, novos tipos celulares estão sendo pesquisados para aumentar o grau de sucesso da terapia celular, assim como o enriquecimento de populações celulares específicas como, por exemplo, as células-tronco mesenquimais (GIORDANO *et al.*, 2007; BATTIWALLA *et al.*, 2009; SADAN *et al.*, 2009).

### **1.1.3 Células-tronco mesenquimais**

Em 1976, Friedenstein e colaboradores foram os primeiros a relatar a existência de um tipo de célula-tronco no estroma da medula óssea. Eles observaram que estas células eram aderentes ao frasco de cultura e exibiam um formato fibroblastóide (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976). A partir desse momento, surgiram diversos estudos demonstrando que as células-tronco aderentes do estroma da medula óssea ou células-tronco mesenquimais (CTM) são capazes de gerar linhagens celulares como adipócitos, osteócitos, condrócitos (PITTENGER *et al.*, 1999). Outros grupos também demonstraram a existência de células-tronco com características mesenquimais em diversos tecidos do organismo humano, bem como em anexos extra-embrionários.

Para uniformizar os achados científicos relacionados às células-tronco aderentes do estroma da medula óssea, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) publicou um artigo, intitulado *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement* (DOMINICI *et al.*, 2006), sugerindo que essas células podem ser

classificadas como células-tronco mesenquimais quando atenderem aos três critérios listados abaixo:

- 1 – Aderência ao plástico dos frascos de cultura *in vitro*, quando cultivadas em condições adequadas;
- 2 – Expressão de antígenos específicos em sua superfície, apresentando a expressão de CD105, CD73 e CD90 superior ou igual a 95%, e ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 OU CD11b, CD79a ou CD19 e HLA de classe II (menor ou igual a 2%), mensurados por citometria de fluxo;
- 3 – Diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, com a respectiva coloração demonstrada *in vitro*.

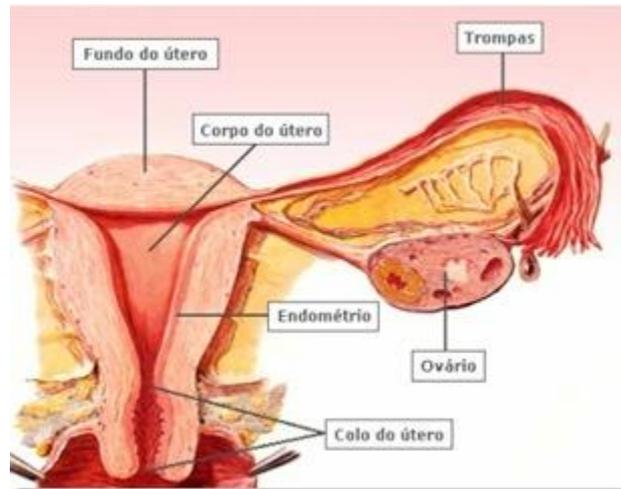
A capacidade de modular a resposta imunológica é um aspecto ainda não totalmente consolidado na literatura, mas que torna a aplicação clínica das células-tronco mesenquimais ainda mais interessante. Estudos demonstram que CTM derivadas da medula óssea são capazes de suprimir o funcionamento de uma larga população de células imunológicas, *in vivo*, incluindo células T (KRAMPERA *et al*, 2003; LE BLANC *et al*, 2003; DI NICOLA *et al*, 2000), células B, células apresentadoras de antígenos e *natural killer* (NK) (JIANG *et al*, 2005; AGGARWAL *et al*, 2005). Este dado é muito interessante, visto que pode minimizar a possibilidade de rejeição imunológica contra as células injetadas, ampliando a importância de seu estudo em terapias celulares.

Entretanto, as células-tronco mesenquimais de medula óssea, bem como as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e polpa de dente, requerem procedimentos invasivos para sua obtenção; ao passo que as células-tronco derivadas de anexos extra-embrionários não estão amplamente disponíveis e não poderiam ser utilizadas em condições autólogas, isto é, pelo próprio paciente.

Nesse sentido, células aderentes estromais multipotentes foram identificadas no tecido endometrial uterino (CHO *et al*, 2004; SCHWAB *et al*, 2005). Por esse motivo, o sangue menstrual tornou-se uma fonte muito atraente para obtenção de células com possível potencial terapêutico. As maiores vantagens desse tipo celular são sua ampla disponibilidade e facilidade de obtenção, sem necessidade de procedimentos invasivos para a coleta.

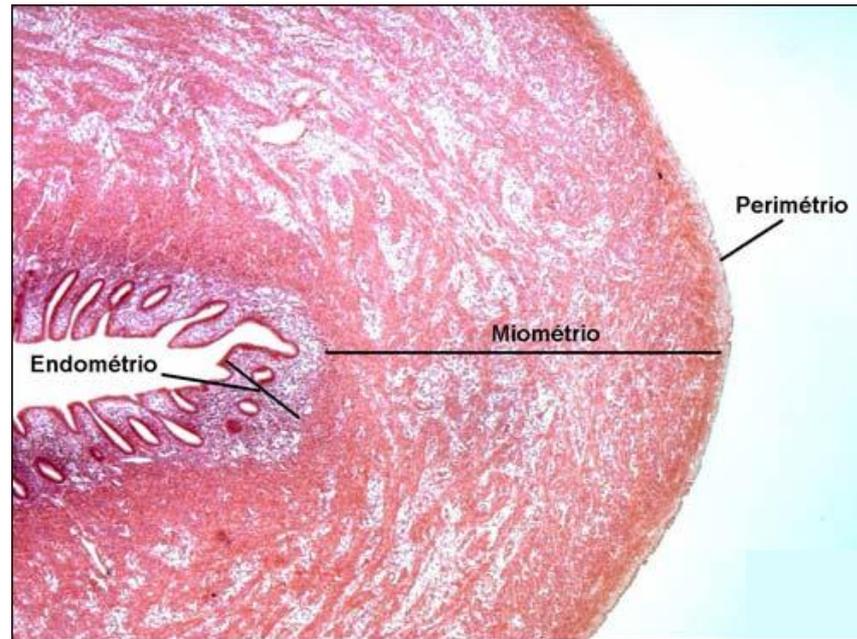
## **1.2 O endométrio**

O útero é um órgão muscular, piriforme, com paredes espessas, localizado na linha média da pelve que pode variar consideravelmente de tamanho. É composto pelo: fundo do útero, que é a região superior do órgão e está ligada às tubas uterinas; corpo do útero, que corresponde aos dois terços superiores expandidos e está localizado abaixo do nível das tubas uterinas (trompas); istmo, que é a região média onde há o estrangulamento do útero; e cérvix ou colo do útero, que corresponde ao terço inferior, que é a região que se une com a porção final superior da vagina (Figura 3). A função do útero é nutrir e proteger o ovo fertilizado, propiciando seu desenvolvimento em todos os estágios da gravidez, até o indivíduo gerado estar pronto para o nascimento (NETTER, 2000).



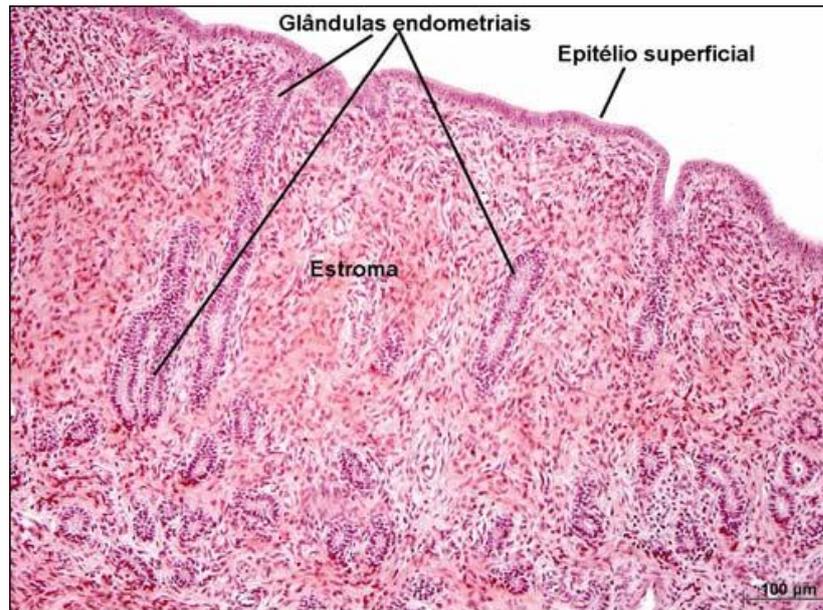
**Figura 3: Ilustração do aparelho reprodutor feminino.** Notar a presença e localização do corpo do útero que será abordado em seguida. Adaptado de [http://patomaniacosfls.blogspot.com/2010\\_04\\_01\\_archive.html](http://patomaniacosfls.blogspot.com/2010_04_01_archive.html).

A parede do corpo do útero é constituída por três camadas: a camada mais externa, composta por uma lâmina serosa delgada é denominada perimétrio; a média, composta por uma camada de músculo espessa é denominada miométrio; e a mais interna que reveste a cavidade do útero, denomina-se endométrio (Figura 4).



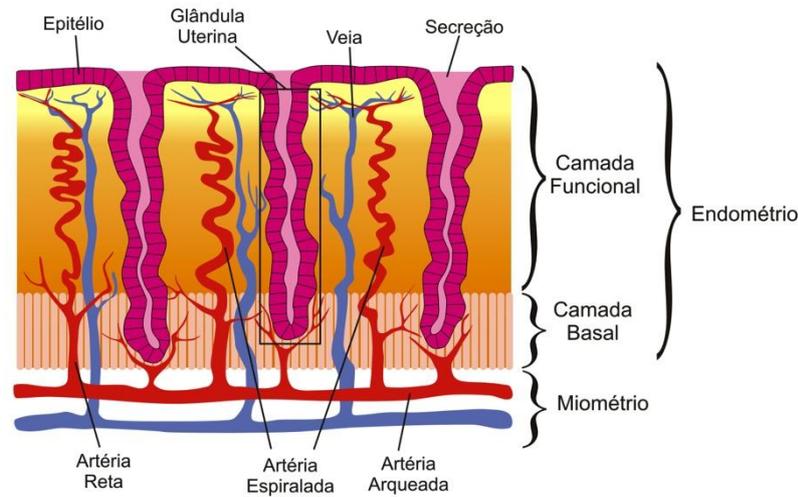
**Figura 4: Histologia da parede do corpo do útero.** Notar a distribuição e espessura de cada camada. Adaptado de [www.unifesp.br/.../ensino/utero/histologia.htm](http://www.unifesp.br/.../ensino/utero/histologia.htm).

O **endométerio** é constituído por um epitélio cilíndrico simples (revestimento interno do lúmen uterino) e lâmina própria, que contém inúmeras glândulas tubulares simples (glândulas endometriais) (Figura 5).



**Figura 5: Histologia do endométrio.** Presença de um epitélio superficial cilíndrico simples e de glândulas tubulares. Adaptado de [www.unifesp.br/.../ensino/utero/histologia.htm](http://www.unifesp.br/.../ensino/utero/histologia.htm).

A mucosa endometrial é composta por duas camadas distintas: a camada basal, onde se encontram as células responsáveis pela regeneração do endométrio, e a camada funcional que descama no período menstrual. A camada basal constitui a base da mucosa endometrial, é a mais próxima do miométrio, nunca descama e nela estão contidas as células que sofrem constante mitose para regenerar o endométrio, bem como estão localizados os fundos das glândulas. Já a camada funcional é voltada para o lúmen uterino, sendo a mais superficial do endométrio e nela estão contidas as luzes das glândulas endometriais (GUYTON E HALL, 2006) (Figura 6).



**Figura 6: Ilustração da composição do endométrio.** Distinção entre as camadas basal e funcional. Presença de um epitélio superficial cilíndrico simples, glândulas tubulares, veias e artérias. Adaptado de <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-sistema-reprodutor-feminino/sistema-reprodutor-feminino.php> por Bruno Diaz Paredes.

### 1.3 Fases do ciclo menstrual

Para o exercício da função de preservar e manter o embrião no endométrio, a camada mais interna sofre modificações estruturais para que possa oferecer condições favoráveis à implantação e nutrição inicial do ovo fertilizado (KING E CRITCHLEY, 2010).

A sequência de modificações cíclicas endometriais é comandada pelos principais hormônios sexuais femininos, o estrogênio e a progesterona (GUYTON *et al*, 2006; KING E CRITCHLEY, 2010; EVANS, 2007). O estrogênio é produzido pelos

folículos do ovário, ou seja, pelos óvulos em formação. Este hormônio é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas e pelo controle do ciclo menstrual. A progesterona é produzida pelo corpo lúteo (estrutura que se forma a partir do folículo) e, juntamente com o estrogênio, atua nas diversas fases do ciclo menstrual (EVANS, 2007).

Dois hormônios produzidos pela hipófise também atuam na regulação dos processos reprodutivos: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (KEISINGER *et al*, 2007).

As variações dos quatro hormônios citados acima são responsáveis por estimular o ciclo endometrial ou menstrual. Esses ciclos, que se iniciam na puberdade, ocorrem mensalmente durante toda a vida reprodutiva da mulher, sendo compostos por três fases: proliferativa, secretora e menstrual (GUYTON *et al*, 2006; KING *et al*, 2010) (Figura 7).

A fase proliferativa ocorre do 5º ao 14º dia do ciclo menstrual. Nesta fase do ciclo menstrual, a hipófise secreta o FSH que estimulará o desenvolvimento dos folículos ovarianos. Além disso, o FSH estimula os folículos a produzirem o hormônio estrogênio, e por isto essa fase também é denominada de fase estrogênica. Em seu início, ocorre a proliferação das células presentes na camada basal do endométrio, das células epiteliais no fundo das glândulas e do tecido conjuntivo, reconstituindo assim a camada funcional do endométrio. As células epiteliais reconstituem as glândulas, que nesta fase são tubulares retas, sendo responsáveis pela reconstrução do epitélio superficial, restaurando a mucosa perdida durante a fase menstrual. Essas mudanças preparam o útero para uma possível implantação de um embrião, ou seja, para uma gravidez (GUYTON *et al*, 2006; EVANS, 2007).

A alta concentração de estrogênio na circulação sanguínea inibe a produção de FSH pela hipófise, em um processo conhecido como retroalimentação negativa (GUYTON *et al*, 2006). A queda nos níveis de FSH reduz a estimulação dos folículos, provocando uma redução na produção e secreção de estrogênio.

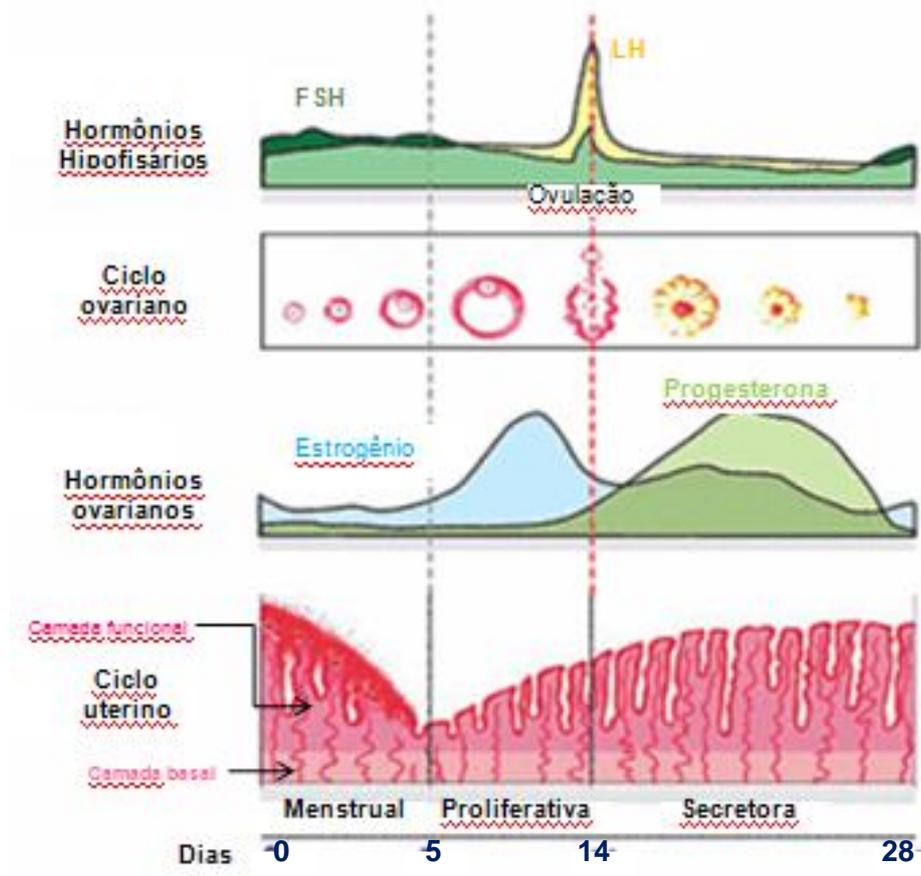
Em seguida, a hipófise passa a secretar o LH, que induz o rompimento do folículo ovariano, levando à liberação do óvulo e ao desenvolvimento do corpo lúteo, iniciando a fase secretora que vai do 15º ao 28º dia do ciclo menstrual (KING *et al*, 2010; REISINGER *et al*, 2007). Esta fase é também conhecida como fase progesteronal, devido à grande influência do hormônio progesterona, o qual é produzido pelo corpo lúteo. A progesterona irá auxiliar na manutenção do endométrio até o final do ciclo menstrual e estimular a secreção das glândulas endometriais, bem como a secreção de glicosaminoglicanos, gerando uma retenção de água pelo estroma. Ao longo desta fase, o estroma torna-se edemaciado e as glândulas deixam de ser retas, tornando-se tortuosas, com a luz dilatada pelo acúmulo de mucopolissacarídeos no seu interior.

No máximo de seu desenvolvimento, durante a fase secretora do ciclo menstrual, o endométrio é constituído por três camadas. A camada compacta é delgada, composta por tecido conjuntivo e localiza-se em torno do colo das glândulas uterinas. A camada esponjosa é espessa, sendo constituída de tecido conjuntivo edematoso contendo os corpos retorcidos e dilatados das glândulas uterinas. As camadas compacta e esponjosa compõem a camada conhecida como funcional, a qual desintegra-se e descama durante a menstruação. A terceira camada é a basal, que é delgada, contém a extremidade em fundo-de-saco das glândulas uterinas, tem o seu próprio suprimento sanguíneo e não descama durante a menstruação ( KIERSZENBAUM, 2007).

A alta concentração de progesterona na circulação sanguínea inibe, por retroalimentação negativa, a produção de LH pela hipófise (REISINGER *et al*, 2007). A diminuição da concentração do LH causa a degeneração do corpo lúteo, além de provocar a diminuição das concentrações de estrogênio e progesterona.

Como não ocorreu a fecundação, grande parte do endométrio é eliminada, resultando em uma perda sanguínea vaginal, caracterizando a fase menstrual. A menstruação é exclusiva de alguns primatas e da mulher, não havendo fenômeno comparável em nenhum outro animal.

A fase menstrual ocorre do 1º ao 4º dia do ciclo menstrual (GUYTON *et al*, 2006; KING *et al*, 2010), esta coincide com a degeneração do corpo lúteo, resultando na queda dos níveis hormonais e diminuição dos estímulos sobre o endométrio. Além disso, ocorre a contração das artérias que irrigam a camada funcional, causando uma redução do fluxo sanguíneo e como consequência, ocorre a descamação gradativa da camada funcional. Este processo envolve liberação de uma grande quantidade de água e sangue, devido a constrição e ruptura dos vasos sanguíneos, exteriorizando-se na vagina.



**Figura 7: Ilustração da regeneração endometrial durante o ciclo menstrual.** Distinção entre as camadas basal e funcional ao longo das três diferentes fases, ocorrendo a reconstituição e degeneração da camada funcional. As variações dos níveis hormonais de FSH, LH, estrogênio e progesterona durante o ciclo menstrual são mostrados acima. Adaptado de [www.unifesp.br/.../ensino/utero/histologia.htm](http://www.unifesp.br/.../ensino/utero/histologia.htm).

Devido a esta rica vascularização e constante renovação do endométrio, pesquisadores pensaram e demonstraram que do sangue menstrual poderia se obter uma população celular com características de células-tronco (CUI *et al*, 2007).

## 1.4 Células-tronco mesenquimais derivadas do sangue menstrual.

A hipótese de que o endométrio deveria apresentar um repertório celular com características de células-tronco vem sendo sugerida há mais de 30 anos (PRIANISHNIKOV *et al*, 1978; PADYKULA *et al*, 1989; TANAKA *et al*, 2003), bem como o conceito de que a regeneração endometrial é mediada por células-tronco localizadas na região basal do endométrio, em vez de células localizadas na região funcional ou no miométrio (PRIANISHNIKOV *et al*, 1978; PADYKULA *et al*, 1984; PADYKULA *et al*, 1991).

Outras evidências para a existência de células-tronco/progenitoras endometriais provêm de estudos com primatas e da prática clínica, onde mulheres que foram submetidas à ressecção cirúrgica de quase todo o tecido endometrial apresentaram uma regeneração completa do endométrio e foram capazes de sustentar uma gravidez (HARTMAN, 1944; WOOD & ROGERS, 1993).

Desde então, poucos foram os trabalhos que investigaram a presença de células-tronco no sangue menstrual, sendo a maioria voltados para doenças relacionadas ao câncer de origem endometrial (ISHIWATA *et al*, 1981; THOMAS, 1984; KATO *et al*, 2010; HUBBARD & GARGETT, 2010).

A primeira evidência de que o endométrio apresentava populações celulares com capacidade de gerar clones e de proliferar rapidamente foi demonstrada somente em 2004. Essas células foram obtidas de uma amostra do tecido endometrial de pacientes que realizaram histerectomia. Em seguida, outros trabalhos também demonstraram a presença e caracterização de células-tronco de origem endometrial (CHAN & GARGETT, 2006; KATO *et al*, 2007; WOLFF *et al*;

2007). Entretanto, para a obtenção dessas células, foi realizado um procedimento invasivo de coleta tecidual.

Na busca de uma obtenção não invasiva dessas células-tronco endometriais, pesquisadores identificaram uma população heterogênea de células no fluido menstrual que possuía capacidade regenerativa (CUI *et al*, 2007). Assim, o sangue menstrual tornou-se uma possível fonte de células-tronco muito atraente para ser estudada.

A partir deste dado, postulamos a possível origem das células-tronco do sangue menstrual obtidas, uma vez que elas poderiam ser células que constituem o tecido endometrial ou presentes no interior dos vasos sanguíneos. O alvo das nossas hipóteses são as células da camada basal, pois estas são capazes de se auto-renovarem e se diferenciarem nas células que reconstituirão o endométrio. A primeira hipótese é que algumas células da camada basal descariam juntamente com a camada funcional. A segunda hipótese é que algumas células da camada basal migrariam juntamente com as células diferenciadas e fariam parte da camada funcional que descama.

## **1.5 Estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando as CeSaM.**

As células derivadas do sangue menstrual são facilmente obtidas por meio de métodos não invasivos. Estas são capazes de aderir ao plástico de cultura, exibir uma morfologia fibroblastóide, além de possuírem uma alta taxa de proliferação dobrando a sua população em 19-36 horas (MENG *et al*, 2007; PATEL *et al* 2008), sugerindo que a expansão em larga escala é possível em uma proposta terapêutica.

O perfil imunofenotípico das células derivadas do sangue menstrual em cultura já foi descrito por alguns autores (CUI *et al*, 2007; MENG *et al*, 2007; PATEL *et al* 2008; HIDA *et al*, 2008; ZHONG *et al*, 2009; BORLONGAN *et al*, 2010), que confirmam a expressão de moléculas de superfície como o CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, e ausência dos antígenos CD14, CD31, CD34, CD133, CD45, HLA-DR, semelhante ao perfil exibido pelas células mesenquimais derivadas da medula óssea. Entretanto, ainda não há um perfil imunofenotípico que seja consenso na literatura. A tabela 1 resume os dados das diferentes moléculas analisadas por alguns grupos.

**Tabela 1: Resumo das moléculas de superfície e intracelulares presentes nas células derivadas do sangue menstrual de cultura em expansão descritas na literatura.**

EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA															REFERÊNCIAS
CD 9	CD 10	CD13	CD 14	CD29	CD31	CD34	CD38	CD41a	CD44	CD45	CD49f	CD50	CD54	CD55	
		pos	neg	pos	neg	neg			pos	neg		neg	pos	pos	CUI, 2007
pos						neg	neg	pos	pos	neg					MENG, 2008
			neg	pos											
pos				pos		neg	neg		pos	neg	pos				PATEL, 2008
	pos		neg	pos	neg	neg			pos	neg				pos	HIDA,2008
						neg				neg					ZHONG, 2009
				pos					pos						BORLONGAN, 2010

---

**EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA**


---

CD 59	CD 73	CD90	CD105	CD117	CD133	CD166	CXCR4	MHC I	MHC II	HLA-DR	STRO-1	Oct-4	Nanog	SSEA-4	REFERÊNCIAS
pos	pos	pos	pos	neg	neg					neg					CUI, 2007
pos	pos	pos	pos		neg						neg	pos	neg	neg	MENG, 2008
		pos	pos	pos	neg	pos	neg	pos	neg					pos	PATEL, 2008
pos		pos		neg	neg	pos									HIDA, 2008
		pos	pos												ZHONG, 2009

---

Surpreendentemente, alguns estudos demonstraram que células derivadas do sangue menstrual expressam proteínas de membrana que geralmente estão associadas à superfície de células-tronco embrionárias, como o antígeno embrionário de estágio específico 4 (SSEA-4) (PATEL *et al* 2008; BORLONGAN *et al*, 2010). Além disso, foi descrita a presença de fatores de transcrição característicos de CTE nas células derivadas do sangue menstrual, tais como: Octamer-4 (Oct-4), que está associado a auto-renovação de CTE indiferenciadas (MENG *et al*, 2007; PATEL *et al* 2008; BORLONGAN *et al*, 2010) e Nanog, o qual exerce um papel fundamental na manutenção da pluripotencialidade (BORLONGAN *et al*, 2010), sugerindo que essas células apresentam um fenótipo intermediário entre as células pluripotentes e células multipotentes. Entretanto, a expressão dessas moléculas não foi sempre encontrada, uma vez que Meng e colaboradores (2007) não detectaram a presença da glicoproteína SSEA-4. Além disso, faz-se necessário investigar outras moléculas relacionadas a pluripotência.

Adicionalmente, estas células são capazes de se diferenciar fenotipicamente, na presença de fatores específicos, em nove linhagens distintas derivadas dos três folhetos embrionários: endoderma (pancreáticas, hepáticas, epiteliais respiratórias)

(MENG *et al*, 2007), mesoderma (cardiomiócitos (MENG *et al*, 2007; PATEL *et al* 2008), adipócitos (MENG *et al*, 2007; PATEL *et al* 2008), osteócitos (MENG *et al*, 2007; PATEL *et al* 2008), miócitos (MENG *et al*, 2007), endoteliais (MENG *et al*, 2007), e ectoderma (neuronal) (MENG *et al*, 2007; PATEL *et al* 2008; BORLONGAN *et al*, 2010).

Além da utilização dessas células como ferramenta terapêutica, o meio condicionado deste tipo celular se tornou igualmente atraente. Em cultura, estas células são capazes de secretar no meio metaloproteases de matriz (MMP3 e MMP10), fatores de crescimento (GM-CSF e PDGF-BB), bem como fatores angiogênicos (ANG-2) (MENG *et al*, 2007). Murphy e colaboradores (MURPHY *et al*, 2008) observaram que o meio condicionado obtido das células regenerativas do endométrio possui a capacidade de estimular a proliferação *in vitro* das células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC), indicando que existem substâncias solúveis nesse meio que promovem a atividade angiogênica, corroborando com os dados de Meng e colaboradores descritos neste parágrafo.

As CeSaM tem a vantagem de apresentar maior atividade da telomerase quando comparadas com as células mesenquimais de medula óssea (PATEL *et al* 2008), acarretando em um tempo maior para atingir a senescência.

Em 2010, Borlogan e colaboradores observaram que neurônios de ratos privados do suprimento de oxigênio e glicose *in vitro*, quando co-cultivados com células derivadas do sangue menstrual ou expostos ao meio condicionado das mesmas, apresentaram maior taxa de sobrevivência. Além disso, as células-tronco derivadas do sangue menstrual secretam fatores de crescimento como o VEGF (vascular endothelial growth), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) e a

Neurotrofina-3 (NT-3) que podem estar envolvidos na neuroproteção (BORLONGAN *et al*, 2010).

Estudos desenvolvidos por Hida e colaboradores (2008) demonstraram que as células derivadas do sangue menstrual tinham um forte potencial cardiomiogênico para se transdiferenciarem *in vitro* e *in vivo*. *In vivo*, as CeSaM transplantadas em ratos imunocompetentes submetidos ao infarto do miocárdio, foram capazes de restaurar a função cardíaca, diminuindo a área infartada (HIDA *et al*, 2008). Assim, esse grupo demonstrou um possível benefício terapêutico que essas células poderiam trazer para o tratamento de doenças isquêmicas do coração.

Em seguida, o grupo de Murphy administrou as CeSaM pela via intramuscular em camundongos imunocompetentes imediatamente após a ligação da artéria femoral para indução da isquemia do membro. A injeção dessas células foi realizada por mais dois dias, logo abaixo da ligadura da artéria, resultando ao final do protocolo experimental na presença de um membro intacto nos animais tratados, enquanto que os camundongos que não receberam células evoluíram para a necrose do membro. Este dado sugere a possibilidade de as CeSaM estimularem a angiogênese (MURPHY *et al*, 2008), que é um fenômeno importante para ajudar na sobrevivência de células que estão localizados na região que sofreu isquemia.

Existem poucos trabalhos na literatura relacionados às células-tronco mesenquimais derivadas do sangue menstrual. Além disso, não existe consenso na literatura sobre quais seriam suas características fenotípicas, bem como o verdadeiro potencial terapêutico dessas células. Sendo assim, é necessário que mais estudos de grupos independentes sejam feitos com este tipo celular para comprovar as suas características, eficácia e benefício terapêutico.

## 1.6 Estresse oxidativo e as células-tronco.

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada na produção de energia na mitocôndria dos eucariotos e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. Adicionalmente, o mesmo é capaz de gerar substâncias tóxicas à nível intracelular e extracelular, criando então um paradoxo, devido ao balanço existente entre suas vantagens e desvantagens. Essas espécies químicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, e são comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) (OGA, 2003; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A maioria das EROs são radicais livres, por possuírem um ou mais elétrons não-pareados em seus orbitais externos, o que as torna reativas, sendo capazes de se combinar inespecificamente com diversas moléculas integrantes das estruturas celulares, como por exemplo o ânion superóxido e o radical hidroxila (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). EROs é um termo frequentemente usado para incluir também moléculas que não são radicais, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Estas espécies químicas têm uma instabilidade muito grande e, por essa razão, mesmo tendo uma meia vida curta, apresentam grande capacidade reativa. A fim de captar um elétron para sua estabilização, estes radicais podem reagir com qualquer composto como proteínas, lipídios, açúcares, DNA entre outros (HALLIWELL, 2007). Além disso, as EROs também são capazes de modular a atividade de diversas vias de sinalização intracelular envolvidas na sobrevivência, crescimento, migração e diferenciação celular (DIKALOV *et al*, 2007; FINKEL, 2003; GRIENDLING *et al*, 2000).

Diferentes tipos celulares são capazes de produzir EROs, tais como os cardiomiócitos, células endoteliais, células musculares lisas dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias. Nos sistemas biológicos, as EROs são produzidas por diferentes enzimas, como as xantinas oxidases, as óxido nítrico sintases desacopladas e as NADPH oxidases (AKKI *et al*, 2009; HORI & NISHIDA, 2009). Entre as descritas acima, as NADPH oxidases podem ser consideradas únicas, já que têm como função principal gerar EROs, enquanto as outras enzimas produzem EROs como um subproduto da reação. Além disso, as NADPH oxidases podem estimular algumas enzimas citadas acima a produzirem EROs, sendo capazes de agir como fonte iniciadora de EROs (AKKI *et al*, 2009).

Contrabalanceando a formação de espécies reativas de oxigênio no nosso organismo, temos a defesa antioxidante, que é composta de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (SIES, 1985).

O componente antioxidante enzimático está envolvido na proteção primária do organismo humano. As enzimas atuam contra as EROs como detoxificadoras, mantendo a concentração de EROs dentro de limites fisiológicos. Esse é composto por diferentes enzimas, tais como: a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPX), glutaciona redutase (Gr), peroxirredoxinas (Prx), dentre outras (NORDBERG E ARNÉR, 2001).

A superóxido dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, já a catalase desempenha importante papel na eliminação do  $H_2O_2$ , convertendo-o em água e oxigênio molecular. A GPX também funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutaciona reduzida (GSH) à glutaciona oxidada (GSSG), removendo  $H_2O_2$  e formando água. Dessa forma, essas enzimas evitam o acúmulo de radical

superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa.

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado que favorece a ocorrência de lesões oxidativas, definida como estresse oxidativo. A citotoxicidade do estresse oxidativo está relacionada ao potencial das EROs em oxidar os constituintes celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA, os quais levam à deterioração da estrutura e função, podendo culminar com morte celular (HALLIWELL, 2007; WEN et al., 2004; ZACKS et al., 2005; VALKO et al., 2006).

Diversas doenças nas quais a terapia celular vem sendo proposta como um tratamento alternativo cursam com a elevação de espécies reativas de oxigênio, como o infarto agudo do miocárdio (OSHIMA *et al*, 2005; ANGELOS *et al*, 2006; HORI E NISHIDA *et al*, 2009) e o acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) (MORO *et al*, 2005).

Nesse contexto da terapia celular, o transplante de células-tronco é uma ferramenta promissora para regeneração e reparo dos cardiomiócitos e para a restauração da função cardíaca (WILLIAMS & HARE, 2011; KRAUSE *et al.*, 2010). Entretanto, a baixa relação entre o número de células que sobrevivem e de células transplantadas continua sendo o maior obstáculo da terapia celular. A integridade dessas células-tronco depende da adesão célula-célula e célula-matriz, a qual pode ser inibida pelas espécies reativas de oxigênio geradas na região isquêmica após o infarto do miocárdio (SONG *et al*, 2010).

Em 2010, o grupo de Valle-Prieto estudou, *in vitro*, a capacidade das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de manejar o estresse oxidativo.

Os autores observaram que elas apresentavam alta resistência a morte induzida pelo peróxido de hidrogênio quando comparadas aos fibroblastos dermais humanos, o que foi correlacionado com a elevada expressão de glutathione peroxidase (GPX). Quando a GPX era depletada, as células perdiam essa capacidade de manejar o estresse.

Entretanto, Song e colaboradores (2010), demonstraram *in vitro* que as células-tronco mesenquimais de medula óssea, quando tratadas com baixas doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 µM), reduziam significativamente a adesão e o espriamento celular. Neste mesmo artigo, os autores demonstraram também que as CTM tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziram os níveis de moléculas relacionadas a adesão focal e integrinas. Adicionalmente, quando essas CTM foram injetadas *in vivo*, em modelo de infarto do miocárdio, não foram capazes de sobreviver por muito tempo naquele tecido, diferentemente do que aconteceu quando foi administrado um antioxidante juntamente com as células.

Considerando então que as EROs geradas podem induzir morte celular nestas células transplantadas, torna-se interessante a busca por células-tronco resistentes ao estresse oxidativo, as quais consigam sobreviver melhor neste ambiente hostil para que possam se diferenciar ou, pelo efeito parácrino, estimular a recuperação do tecido lesado.

Diante deste cenário, os desafios propostos para a minha dissertação de mestrado foram divididos em duas partes. A primeira, consistiu em caracterizar as CeSaM com amostras obtidas de mulheres brasileiras e comparar aos dados da literatura internacional, expandindo o perfil imunofenotípico e avaliando o seu potencial de diferenciação e proliferação. De posse de um protocolo reprodutível, nossa hipótese de trabalho foi que as CeSaM poderiam ser resistentes ao estresse

oxidativo, uma vez que estas células são provenientes de um ambiente que sofre intensa necrose. Essa necrose cursa com elevação do estresse nesse tecido, sendo assim, essas células-tronco sobrevivem, obrigatoriamente, a esse fenômeno já que elas reconstituem todo o endométrio mensalmente. Neste cenário fisiológico, também surgiu a hipótese de que o grau de resistência ao EO poderia ser variado de acordo com a plasticidade das células-tronco, incentivando a comparação entre as células-tronco adultas e células-tronco pluripotentes.

## 2. Objetivos:

### 2.1) Objetivo Geral:

Caracterizar as células-tronco mesenquimais humanas derivadas do sangue menstrual (CeSaM) e investigar o impacto do estresse oxidativo sobre as CeSaM, comparando-as com células-tronco pluripotentes.

### 2.2) Objetivos Específicos:

2.2.1) Cultivar e expandir a fração aderente ao plástico das células derivadas do sangue menstrual;

2.2.2) Avaliar a proliferação das CeSaM *in vitro*, comparando voluntárias que utilizaram ou não contraceptivos orais;

2.2.3) Caracterizar o perfil fenotípico das CeSaM por citometria de fluxo;

2.2.4) Induzir a diferenciação das CeSaM em linhagem adipogênica e osteogênica;

2.2.5) Verificar a presença de RNA mensageiros característicos de células pluripotentes por RT-PCR nas CeSaM;

2.2.6) Verificar a presença de proteínas características de células pluripotentes por imunofluorescência nas CeSaM;

2.2.7) Avaliar a susceptibilidade da CeSaM à morte induzida pelo peróxido de hidrogênio através do ensaio de viabilidade MTT;

2.2.8) Comparar a produção extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos três diferentes tipos celulares (CeSaM, H9, iPSC – CeSaM) pela técnica de amplex red/HRP;

- 2.2.9) Verificar se NADPH oxidases são as responsáveis pela produção extracelular de  $H_2O_2$  nas CeSaM utilizando o inibidor DPI;
- 2.2.10) Comparar a produção intracelular de EROs nos três diferentes tipos celulares (CeSaM, H9, iPSC – CeSaM) utilizando o CM-H2DCFDA através da citometria de fluxo;
- 2.2.11) Avaliar o níveis de EROs intracelulares nos diferentes tipos celulares após um estímulo pró-oxidante, como o  $H_2O_2$ ;
- 2.2.12) Avaliar os níveis de RNA mensageiro para as diferentes enzimas antioxidantes, nos três tipos celulares, por RT-PCR em tempo real;
- 2.2.13) Mensurar a atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase nos três tipos celulares.

### **3. Metodologia:**

#### **3.1) Isolamento e cultivo dos diferentes tipos celulares envolvidos no estudo:**

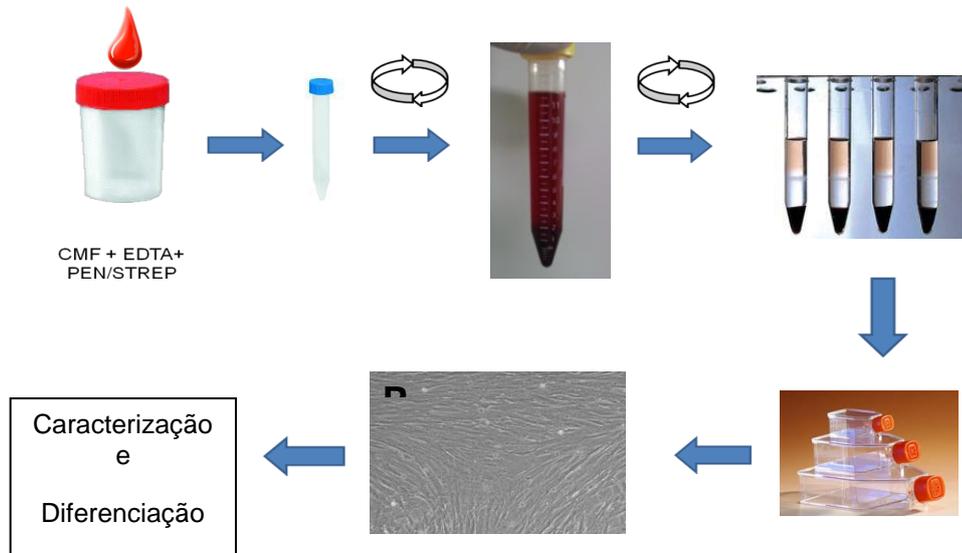
##### **3.1.1) Coleta das células humanas derivadas do sangue menstrual:**

O protocolo abaixo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), registro nº 056/09.

O sangue menstrual foi coletado de jovens voluntárias saudáveis (n=18), com idade entre 18 e 26 anos, vinte e quatro horas após o início do fluxo menstrual. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), as voluntárias receberam instruções quanto ao procedimento de coleta. A coleta foi feita em um coletor de urina contendo 5 mL de uma solução salina sem cálcio e magnésio, suplementada com penicilina 100 IU/mL, estreptomicina 100 mg/mL e EDTA (0,5 mM) para evitar contaminação e formação de coágulos.

### **3.1.2) Isolamento das células aderentes presentes no sangue menstrual:**

O material coletado foi diluído em solução salina balanceada (Balanced Salt Solution - BSS), na proporção 1:1, homogeneizado e centrifugado 300 x g por 5 minutos. O sedimento de células foi ressuspendido em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e, em seguida, adicionado cuidadosamente sobre o Ficoll (Histopaque 1.077 (g/mL), Sigma-Aldrich). A seguir, as células foram centrifugadas a 400 x g durante 30 minutos em temperatura ambiente, com tempos de aceleração e frenagem máximos. O anel de células, formado na interface entre o Ficoll e o meio de cultura, foi coletado e colocado em um tubo de poliestireno cônico de 15 ml. As células foram ressuspendidas em BSS e centrifugadas a 300 x g durante 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e este processo foi repetido mais duas vezes para retirar o Ficoll que pudesse ter sido coletado junto ao anel de células. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer (Hausser Scientific) e a sua viabilidade foi analisada com azul de Trypan 0,4% (Trypan Blue, Sigma-Aldrich). Por fim, as células obtidas após as lavagens foram ressuspendidas em DMEM-High Glicose (4,5 g/L) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), antibióticos (penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 100 mg/mL - Gibco) e plaqueadas em placas de cultura de 35 mm. Na Figura 8, temos representadas as etapas do procedimento de isolamento da fração das células do sangue menstrual.



**Figura 8: Protocolo experimental para o isolamento das células derivadas do sangue menstrual.** O sangue coletado é centrifugado, o sedimento ressuspenso em meio DMEM e sua separação celular foi feita utilizando Ficoll (1.077 g/mL). Em seguida, as células são centrifugadas novamente e plaqueadas. Todos os experimentos foram realizados na quinta passagem.

### 3.1.3) Cultivo e expansão da fração aderente das células derivadas do sangue menstrual:

Após o plaqueamento, as culturas foram mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera úmida, na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura utilizado foi o DMEM suplementado com 2 g NaHCO<sub>3</sub> (23,8 mM), 5 g HEPES (20,98 mM), 0,293 g L-glutamina (2 mM), 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco) e 20% soro fetal bovino (Gibco) a pH 7,4. A primeira troca do meio de cultura ocorreu dois dias após o plaqueamento. As células e debris celulares que ainda estivessem no sobrenadante foram descartadas.

O meio de cultura foi trocado regularmente de acordo com o consumo dos seus nutrientes pelas células, ocorrendo, geralmente duas vezes por semana. Quando as culturas atingiam uma confluência de área de 70-80%, as células eram dissociadas com uma solução de tripsina-EDTA 0,25% e expandidas. As culturas foram acompanhadas diariamente para observação da morfologia e confluência celular. Todos os experimentos a seguir foram realizados na quinta passagem pois é quando obtivemos o maior número de células para realizar todos os experimentos ao mesmo tempo.

#### **3.1.4) Cultivo das células-tronco embrionárias humanas (CTE- H9) e das células-tronco pluripotentes induzidas derivadas da CeSaM (iPSC-CeSaM):**

A linhagem de células-tronco embrionárias humanas H9 foi gerada a partir da massa interna do blastocisto pelo grupo do pesquisador James Thomson (THOMSON *et al*, 1998) e gentilmente cedida ao nosso laboratório pelo professor Stevens Rehen do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A linhagem iPSC foi gerada e expandida em nosso laboratório, para tal, as células-tronco mesenquimais derivadas do sangue menstrual foram transduzidas com genes humanos de três fatores de transcrição relacionados à pluripotência, OCT3/4, SOX2 e KLF4, utilizando-se retrovírus. Para maiores detalhes sobre a geração da iPSC, segue no anexo II, o artigo que descreve o método utilizado em nosso laboratório e aceito para publicação na *Cell Transplantation* no ano de 2011.

As CTE-H9 e as iPSC foram cultivadas sobre Matrigel (BD Biosciences) com o meio de cultivo definido MaSeR, produzido pelo Laboratório Nacional de Células-

tronco Embrionárias (LaNCE). A manutenção e expansão das CTE-H9 e iPSC-CeSaM foram realizadas a partir da troca do meio de cultura diariamente no segundo dia após o plaqueamento.

As colônias de CTE-H9 e iPSC foram passadas através de dissociação enzimática com Tryple (Invitrogen) e colagenase tipo IV (Invitrogen), quando alta confluência era atingida, geralmente a cada cinco dias.

### **3.1.5) Isolamento e cultivo dos fibroblastos dermais humanos:**

O isolamento dos fibroblastos dermais foi feito a partir de pedaços de pele que foram obtidos de cirurgia de abdominoplastia, os mesmos foram processados de 12-24 horas após a cirurgia. Este protocolo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Clínica Fluminense de Cirurgia Plástica em 04/01/2008.

Inicialmente, o tecido obtido foi lavado com PBS e, em seguida, colocado em uma placa de Petri de 35 mm contendo PBS gelado. Com auxílio de um bisturi e uma pinça, fracionamos o tecido em pedaços de aproximadamente 1,5 cm<sup>2</sup> e removemos a gordura deixando somente a pele. A placa de Petri foi mantida no gelo durante todo o experimento. O tecido fracionado foi lavado em PBS novamente e cada pedaço foi colocado dentro de um tubo contendo 300 µL de PBS. Com auxílio de uma tesoura, picotamos o tecido até obtermos pedaços bem pequenos. Em seguida, transferimos cada material picotado com PBS para tubos cônicos de 50 mL contendo 7 mL de colagenase tipo II (360 U/mg) (Worthington) diluída em meio DMEM – High glicose (pH 7,4) em uma concentração final de colagenase de  $0,8 \times 10^3$  U/mL.

Os tubos cônicos de 50 mL foram mantidos sob agitação suave de 175 rpm, a 37<sup>0</sup>C, em incubadora de bancada para digestão enzimática por um período de 8 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 300 x g por 5 minutos. O sedimento foi ressuspenso em meio de cultura DMEM High Glicose suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco) e 7 µL de gentamicina (55 µg/mL) (Sigma).

O sedimento foi plaqueado em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 5 mL de meio de cultura e mantido em estufa a 37<sup>0</sup>C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após dois dias de plaqueamento, as células foram lavadas três vezes com PBS e acrescentado 5 mL de meio de cultura. O meio foi trocado a cada dois dias. Quando as células atingiram área de confluência de área de aproximadamente 80-90%, elas foram tripsinizadas e plaqueadas.

### **3.2) Caracterização das CeSaM *in vitro*:**

#### **3.2.1) Avaliação da capacidade proliferativa *in vitro* pelo método de Tempo de Duplicação da População (PDT):**

As células aderidas à garrafa de cultura na quarta passagem foram tripsinizadas e plaqueadas na densidade  $2 \times 10^4$  células em placas de 35 mm (CAT: #1256592. Nalge Nunc International). Estas placas são quadriculadas, contendo quadrados de 4 mm<sup>2</sup> de área. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, o número de células foi contado em 4 quadrados aleatórios, visualizados em microscópio óptico. O mesmo procedimento foi repetido diariamente até que as células atingissem

uma confluência de área de 90-100%, quando era impossível distinguir as células isoladamente.

Ao final de cada dia foi feita uma média aritmética do número de células obtido nos quatro quadrantes. Esse número foi então dividido pela área dos quadrantes para a obtenção do número de células por  $\text{mm}^2$ . A partir do número de células por  $\text{mm}^2$  em cada dia foi construída uma curva de crescimento celular do tipo exponencial com células/ $\text{mm}^2$  no eixo das ordenadas e dias no eixo das abscissas.

Para efetuar a regressão linear para o cálculo do PDT, essa curva foi convertida em uma reta calculando-se o logaritmo na base 2 do número de células  $\text{mm}^2$ .

O valor do PDT, que é o tempo que as células em questão demoram para dobrar a sua população, é dado pelo inverso do coeficiente angular da reta e foi calculado pelo programa Graph Pad Prism 5.0.

### **3.2.2) Análise fenotípica por citometria de fluxo:**

Na imunofenotipagem por citometria de fluxo, são utilizados anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos para reagir com moléculas que, no nosso caso, estão presentes na superfície celular. Assim, a utilização de anticorpos distintos nos dá diversos tipos de informações sobre o fenótipo, facilitando a identificação do tipo celular que está sendo analisado e qual é o percentual do mesmo na amostra.

Uma amostra das células aderidas à garrafa de cultura na quinta passagem foi removida por digestão enzimática (Trypsina-EDTA 0,25%) após as mesmas atingirem

aproximadamente 90% de confluência de área. Em seguida, as células foram lavadas com 5 mL de PBS e centrifugadas 400 x g por 3 minutos.

O sedimento formado após a lavagem foi ressuspenso em 600 µL de PBS + BSA 0,5% e dividido em 6 tubos (100 µL em cada um). As amostras foram marcadas com diferentes combinações de anticorpos (3 µL de cada monoclonal) por 20 minutos, ao abrigo da luz, à 4°C, conforme a Tabela 1.

**Tabela 2: Painel de anticorpos utilizados para o estudo das células mesenquimais derivadas do sangue menstrual.**

Tubos	FITC*	PE*	PE-Cy5*	PerCP-Cy5.5*	APC*	PE-Cy7*	Objetivo
1	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Ajuste de voltagem
2		CD73	–	CD117	CD45	CD34	CTM/CTH
3	CD31	CD133	–	–	CD45	CD34	Progenitor endotelial/CTH
4	CD44	CD166	–	CD54		CD34	Adesão celular
5		CD105	CD90	–		CD34	CTM
6	CD19	–	–	HLA-DR	CD45		Macrófago/célula B

\*Anticorpos conjugados aos fluorocromos FITC (do inglês *fluorescein isothiocyanate*), PE (do inglês *phycoerythrin*), PerCP (do inglês *peridinin-chlorophyll-protein*), APC (do inglês *allophycocyanin*) e PE-Cy7 (do inglês *phycoerythrin cyano7*).

Após a marcação, as amostras foram lavadas com 1 mL de PBS e centrifugadas a 400 x g por 3 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de PBS e analisados pela técnica de citometria de fluxo.

Para realizar a aquisição no citômetro de fluxo (BD FACSAria), as voltagens do equipamento foram ajustadas, primeiramente, para as células não marcadas com anticorpos. Esta etapa é fundamental para ajustar a sensibilidade de cada fotomultiplicador do equipamento, e assim diminuir a influência da auto-fluorescência das células durante a aquisição das amostras marcadas.

Após este passo, procedemos as aquisições das amostras marcadas com monoclonais, a fim de avaliar o percentual de expressão das proteínas investigadas em cada amostra.

### **3.2.3) Ensaios de diferenciação:**

Uma fração das células aderidas à garrafa de cultura na quinta passagem, foi plaqueada em placas de seis poços para indução de diferenciação osteogênica e adipogênica. As células foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço e tratadas por 21 dias com os meios de diferenciação descritos a seguir. Após o tratamento com meios de indução específicos, as células foram fixadas com formaldeído 4% em PBS por 30 minutos em temperatura ambiente. O fixador foi retirado e as células foram lavadas com água destilada. Depois de secas, foram adicionados à placa de cultura os respectivos corantes por aproximadamente 20 minutos. O corante foi retirado e as placas foram lavadas novamente com água destilada.

### **3.2.3 – 1) Osteogênico:**

O meio de diferenciação osteogênica é composto por: DMEM-High Glicose (4,5 g/L) suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, antibióticos (penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 100 mg/mL),  $10^{-7}$  M de dexametasona, 0,5  $\mu$ M de ácido ascórbico e 10 mM de glicerol fosfato. A presença de células com fenótipo osteogênico foi detectada pelo corante vermelho de alizarina 1% (Sigma-Aldrich), que é capaz de corar depósitos de cálcio extracelular.

### **3.2.3 - 2) Adipogênico:**

O meio de diferenciação adipogênica é composto por: DMEM-High Glicose (4,5 g/L) suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, antibióticos (penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 100 mg/mL),  $10^{-7}$  M de dexametasona, 2,07  $\mu$ M de insulina e 0,45 mM de IBMX. A presença de células com fenótipo adipogênico foi detectada pelo corante óleo vermelho O 0,2% (Sigma-Aldrich) que é capaz de corar vacúolos citoplasmáticos de lipídios.

### **3.2.4) Extração do RNA total:**

O ácido ribonucleico (RNA) total das CeSaM, H9, iPSC foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini Plus (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente,  $2 \times 10^6$  células dos três tipos celulares estudados foram lisadas e homogeneizadas em tampão desnaturante e o lisado foi filtrado, centrifugado e

aplicado em uma microcoluna contendo uma membrana de sílica. A coluna foi lavada 3 vezes, com posterior eluição com água RNase-free. As amostras foram armazenadas a -70°C.

### **3.2.5) Reação da Transcrição Reversa:**

A reação de transcrição reversa consiste na síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de um molde de RNA por uma DNA polimerase RNA-dependente: a transcriptase reversa.

O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total por reação de transcrição reversa, utilizando o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, cada amostra tinha RT- correspondente, sem a enzima transcriptase reversa, os quais foram incluídos para verificar eventuais contaminações por DNA genômico. Ao final da reação, o cDNA foi estocado em freezer -20°C até o momento do ensaio.

### **3.2.6) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para caracterização das CeSaM com relação a pluripotência:**

As CeSaM em quinta passagem foram analisadas quanto a expressão de genes marcadores típicos de células pluripotentes. Células-tronco embrionárias da linhagem H9 foram utilizadas como controle positivo da reação.

Três microlitros de cada cDNA diluído 10x em água livre de RNase foram amplificados no termociclador Veriti (Applied Biosystems) em 25 µL de solução contendo 1x PCR Buffer Green (Promega), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de trifosfato de deoxinucleosídeos (dNTP), 0,2 µM do primer senso e antissenso (Tabela 3) e 1U de GoTaq Polimerase (Promega). O programa de RT-PCR consistiu na desnaturação a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de RT-PCR foram separados e analisados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídeo.

**Tabela 3. Sequência de primers utilizados para avaliação dos transcritos de pluripotência.**

<b>Gene</b>	<b>Sequência de primer senso</b> <b>Sequência de primer anti-senso</b>	<b>Pb</b>	<b>Principais/Possíveis funções</b>
<b>Oct4</b>	AGC CTG AGG GCG AAG CAG GA CCC CAG GGT GAG CCC CAC AT	236	Mantém a pluripotência das CTE
<b>Sox2</b>	AGC TAC AGC ATG ATG CAG GA GGT CAT GGA GTT GTA CTG CA	126	Mantém a auto-renovação das CTE no estágio indiferenciado
<b>KLF4</b>	TCT CAA GGC ACA CCT GCG AA TAG TGC CTG GTC AGT TCA TC	105	Mantém a célula em estágio de proliferação celular, formação de vasos em vertebrados
<b>NANOG</b>	CAG CCC CGA TTC TTC CAC CAG TCC C CGG AAG ATT CCC AGT CGG GTT CAC C	390	Auto-renovação das CTE e manutenção da pluripotência.

### 3.2.7) Imunofluorescência para caracterização das CeSaM com relação a pluripotência:

As células ao atingirem uma confluência de área de 80%, foram tripsinizadas, plaqueadas  $5 \times 10^4$  células em lamínulas de vidro e mantidas por aproximadamente 4 dias em estufa em meio de cultura normal.

Em seguida, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se uma solução de paraformaldeído 4%. As placas de cultura com a solução foram mantidas a 37°C por 15 minutos para a fixação das células. Após 15 minutos, foi retirado todo o paraformaldeído e as células fixadas foram lavadas três vezes com PBS e deixadas em geladeira com 500µL de PBS em cada poço até a realização da imunofluorescência.

Para todas as proteínas avaliadas foi feito um controle negativo para cada anticorpo secundário onde as células passaram por todas as etapas do protocolo, mas não foram incubadas com o anticorpo primário.

Os anticorpos primários utilizados estão listados na Tabela 4.

**Tabela 4. Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência nas CeSaM.**

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluição</b>
<b>anti:</b>		
<b>SSEA-4</b>	Santa Cruz	1:100
<b>Oct-3/4</b>	Abcam	1:200
<b>TRA1-60</b>	Chemicon	1:100
<b>TRA1-81</b>	Chemicon	1:100

Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-mouse conjugado a Cy3 (Jackson Immunoresearch nº 115-165-003), anti-mouse e anti-rabbit conjugados a Alexa 488 (Invitrogen A-11001 e A-11008), para detectar imunoglobulinas de camundongo e coelho respectivamente.

As células fixadas foram permeabilizadas com o detergente TRITON X-100 diluído em PBS a uma concentração de 0,3%. A permeabilização foi realizada lavando as células três vezes por dez minutos nessa solução. Esse procedimento abre poros na membrana celular, facilitando o acesso do anticorpo a proteínas intracelulares. Após a permeabilização, as células foram incubadas por trinta minutos em uma solução de PBS contendo soro de burro, na concentração de 2%, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida foram incubadas com os anticorpos primários, diluídos em solução de PBS contendo BSA na concentração de 0,1%, durante a noite à temperatura de 4°C.

No dia seguinte, as células foram lavadas três vezes com PBS por dez minutos cada, para depois serem incubadas com o anticorpo secundário correspondente, por uma hora em temperatura ambiente. O anticorpo secundário também foi diluído em uma solução de PBS contendo 0,1% de BSA. A próxima etapa foi novamente uma série de três lavagens de dez minutos cada com PBS. O excesso de líquido foi retirado das lamínulas e estas foram incubadas por cinco minutos em 10 µg/mL de 4'-6-*Diamidino-2-phenylindole* (DAPI), que é um corante nuclear. Antes de colar as lamínulas nas lâminas, foi colocado *Vectashield*, para reduzir o decaimento da fluorescência.

As lâminas montadas foram levadas ao microscópio de fluorescência invertido Axiovert 130 (Zeiss) acoplado a um sistema de captura de fotomicrografias digital

Axiovision. O sistema estava ligado a um software (Axiovision 4.7) que processa as imagens obtidas.

### **3.3) Susceptibilidade da CeSaM à morte induzida por espécies reativas de oxigênio:**

Uma fração das células na quinta passagem, na densidade de  $2 \times 10^4$  células, foi plaqueada em placas de noventa e seis poços para avaliação de sua susceptibilidade à morte induzida pelo  $H_2O_2$ , através do ensaio de viabilidade por MTT (Sigma-Aldrich). Esse método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazan, intensamente coloridos, no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria. Neste ensaio, foi feita uma comparação entre as resistências ao  $H_2O_2$  das CeSaM e fibroblastos dermais de origem humana.

As células com uma confluência de área de 70% foram expostas a diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . Duas horas após a exposição, o meio foi retirado e trocado para meio de cultura normal sem  $H_2O_2$ . Após vinte e quatro horas de incubação, foi aplicado 100  $\mu$ L de MTT (0,5 mg/mL) por uma hora e meia ao abrigo da luz, a 37°C. Após esse tempo, o MTT foi retirado e 100  $\mu$ L de DMSO foram adicionados a cada poço. Cinco minutos após a incubação com DMSO foi realizada a leitura em 570nm no espectrofotômetro Victor<sup>TM</sup>X4 (Perkin Elmer).

### **3.4) Dosagem da geração extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:**

A geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi quantificada pelo método Amplex Red/HRP (Molecular Probes), que detecta o acúmulo de produtos oxidados fluorescentes. Ela consiste na oxidação do Amplex red pelo peróxido de hidrogênio que, na presença de HRP, é convertido em composto fluorescente chamado *resorufin*, o qual é detectável. As células intactas foram incubadas com superóxido dismutase (100 U/ml; Sigma), peroxidase de rabanete (HRP) (0,5 U/ml; Roche) e Amplex red (50 μM; Molecular Probes) e a fluorescência emitida foi medida imediatamente no leitor de microplacas (Victor™X4, Perkin Elmer) à 37°C usando excitação em 530 nm e emissão em 595 nm. Determinamos a concentração de proteína presente em cada amostra pelo método de Bradford (1976). Para determinação da atividade específica, a atividade geradora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi dividida pela concentração de proteína da amostra.

### **3.5) Avaliação das NADPH oxidases como fonte geradora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular nas CeSaM:**

Realizamos o plaqueamento de  $1 \times 10^5$  células em cada poço da placa de seis poços e incubamos na estufa por 72 horas. Após esse período, as células foram incubadas com DPI em diferentes concentrações: 0,5, 1, 10 μM por 1 hora e 30 minutos. Ao término da incubação, as células foram dissociadas com tripsina (Sigma-Aldrich) e a geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi quantificada pelo método Amplex Red/HRP (Molecular Probes), assim como descrito no item acima. A fluorescência emitida foi medida imediatamente no leitor de microplacas (Victor™X4, Perkin Elmer) à 37°C usando excitação em 530 nm e emissão em 595 nm.

### **3.6) Geração intracelular de espécies reativas de oxigênio:**

A avaliação da quantidade intracelular de EROs foi realizada através da utilização do reagente CM-H<sub>2</sub>DCFDA (DCF). Esse composto quando está quimicamente reduzido é não fluorescente, mas após a remoção de grupos de acetato pelas estereses celulares e depois da oxidação pelas espécies reativas de oxigênio, tornam-se fluorescentes, podendo ser detectada essa intensidade de fluorescência por diferentes técnicas. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, e a suspensão celular foi incubada com 10 µM do reagente por 30 min à 37°C. Ao mesmo tempo, as células também foram colocadas em contato com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração final de 100 µM. Em seguida, após a incubação com DCF e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a intensidade de fluorescência emitida pelas amostras foi avaliada através da citometria de fluxo (excitação a 488 nm e emissão a 580 nm).

### **3.7) RT-PCR em tempo real para as enzimas antioxidantes:**

A quantificação da expressão de RNAm para Catalase (CAT), superóxido dismutase 1, 2, 3 (SOD 1, 2, 3) e glutatona peroxidase 1, 3 (GPX 1, 3) na CeSaM, iPSC e H9 foi avaliada por RT-PCR em tempo real. A amplificação dos cDNAs foi realizada com o kit Maxima SYBR Green qPCR master mix (Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação relativa dos produtos de amplificação foi feita através da comparação relativa dos produtos de PCR durante a fase log-linear do processo de

amplificação. Os resultados foram corrigidos de acordo com as concentrações do GAPDH.

As sequências dos *primers* que foram utilizados estão na tabela 5.

**Tabela 5. Sequência de primers utilizados para detecção dos transcritos das enzimas antioxidantes.**

<b>Gene</b>	<b>Sequência de <i>primer sense</i></b>	<b>Pb</b>	<b>Localização/Principais funções</b>
	<b>Sequência de <i>primer anti-sense</i></b>		
<b>CAT</b>	TGG ACA TCG CCA CAT GAA TG GCC GCA TCT TCA ACA GAA AG	132	Intracelular. Converte o $H_2O_2$ em água ( $H_2O$ ) e $O_2$ .
<b>SOD 1</b>	GTC CTC ACT TTA ATC CTC TAT CCA G AGT CAC ATT GCC CAA GTC TC	83	Citoplasma. Converte o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em $H_2O_2$ .
<b>SOD 2</b>	GTA GCA CCA GCA CTA GCA G CGT TGA TGT GAG GTT CCA GG	150	Mitocôndrias. Converte o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em $H_2O_2$ .
<b>SOD 3</b>	TGA ACT GGC CCA ATG ACT G TCC TGA AAA GAG AGC TGC AC	133	Extracelular. Converte o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em $H_2O_2$ .
<b>GPX 1</b>	GAC TAC ACC CAG ATG AAC GAG TCG AAG AGC ATG AAG TTG GG	176	Citoplasma. Converte o $H_2O_2$ em água.
<b>GPX 3</b>	CTG CTT TCC CTG CTC CTG GCT CCG TAC TCG TAA ATG GTG	107	Extracelular. Converte o $H_2O_2$ em água.
<b>GAPDH</b>	ACC ATG GGG AAG GTG AAG GT CAT GGG TGG AAT CAT ATT GG	163	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase. Enzima que catalisa uma etapa da glicólise.

### **3.8) Atividade da glutathiona peroxidase:**

#### **3.8.1) Preparação do homogenato:**

Em torno de  $8 \times 10^6$  células foram raspadas da placa de 10 cm de cultura com tampão fosfato de sódio 50 mM; pH 7,2 contendo sacarose 0,25 M; ditioneitol 0,1 mM; EGTA 1 mM; aprotinina e PMSF, para lise celular. O homogenato foi centrifugado a 3000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a medida das atividades enzimáticas. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

#### **3.8.2) Determinação da Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx):**

A atividade da GPx foi mensurada conforme o método descrito por Flohé & Günzler (1984). Neste método, a GPx converte o tert-butil hidroperóxido em água oxidando a glutathiona (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida a GSH pela enzima glutathiona redutase (GR), às custas da oxidação do NADPH em NADP. A atividade da GPx foi determinada através de medidas de absorção de luz utilizando um espectrofotômetro UV-2550 (Shimadzu).

A diminuição da absorção de luz em 340 nm promovida pela oxidação de NADPH foi avaliada durante 5 minutos à 37 °C no meio de reação, que serviu como controle do experimento (composição do meio de reação: tampão fosfato de potássio 100mM; EDTA 1mM (pH 7.0); NADPH 0,15mM, glutathiona reduzida 0,5mM, GR 240mU/ml e tert-butyl hidroperóxido 1,2mM, o volume de cada reação foi 1mL). Em seguida, foi adicionado homogenato de células (aproximadamente 40 µL) e a oxidação do NADPH continuou sendo monitorada por mais 5 minutos. A atividade da

GPx foi calculada subtraindo a taxa de oxidação do NADPH obtida com e sem homogenato (obtida através de regressão linear). O coeficiente de extinção milimolar do NADPH ( $6,22\text{mM}^{-1}$ ) foi utilizado na determinação da atividade da GPx e esta foi expressa em unidades por miligrama de proteína. Uma unidade representou 1 micromol de NADPH oxidado por minuto.

### **3.9) Análises estatísticas:**

Os dados foram analisados utilizando-se o programa de análise estatística GraphPad Prism (versão 5.0). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $M\pm DP$ ). Para análise de crescimento celular foi realizada uma regressão linear. Todos os outros experimentos foram analisados pelo teste análise de variância (ANOVA) de uma via e os dados foram submetidos ao pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas significativas diferenças com  $p < 0,05$ .

## **4. Resultados:**

### **4.1) Isolamento e cultivo dos diferentes tipos celulares envolvidos no estudo:**

#### **4.1.1) Cultivo da subpopulação de células derivadas do sangue menstrual aderentes ao plástico:**

A fim de enriquecer a fração isolada das células derivadas do sangue menstrual em células mesenquimais, nosso primeiro passo foi isolar a fração aderente ao frasco de cultura. Para tanto, a fração do sangue menstrual obtida da interface ficoll/meio foi plaqueada. Após o isolamento, para observação de possível contaminação por bactérias e/ou fungos, as culturas foram monitoradas por 24 horas. Decorrido este prazo, e não havendo contaminação, o material foi deixado em estufa de CO<sub>2</sub> por 2 dias para que ocorresse a aderência das células no fundo do frasco de cultura. Caso não houvesse crescimento celular, após uma semana, o material era descartado.

Para o início dos experimentos, no entanto, era necessário que as células apresentassem, em até 20 dias em estufa de CO<sub>2</sub>, confluência na área plaqueada de 80-90%. Caso contrário, também seriam descartadas.

No decorrer desse estudo, de um total de 27 amostras, 6 foram descartadas por contaminação e 3 não proliferaram no tempo determinado.

As células foram mantidas em cultura por um período de 60 dias, correspondente à passagem 10, com o objetivo de avaliar sua capacidade de auto-replicação após sucessivas passagens enzimáticas.

Vinte e quatro horas após o plaqueamento das células derivadas do sangue menstrual, observamos que existia uma subpopulação aderente ao plástico da

garrafa de cultura, conforme indicado pelas setas pretas na figura 9a. Nas figuras 9b a 9f, observamos que essas células aderentes apresentaram um formato fibroblastóide (delgadas e alongadas), que se tornou mais evidente com as passagens, uma característica semelhante a de células mesenquimais. Além disso, observamos outro tipo celular formado por células arredondadas e brilhantes presentes no sobrenadante que, ao longo das passagens, foram sendo eliminadas da cultura. Provavelmente essas células arredondadas e brilhantes são células hematopoéticas. A figura 9f representa a cultura na décima passagem, em que as células arredondadas e brilhantes não estavam mais presentes.

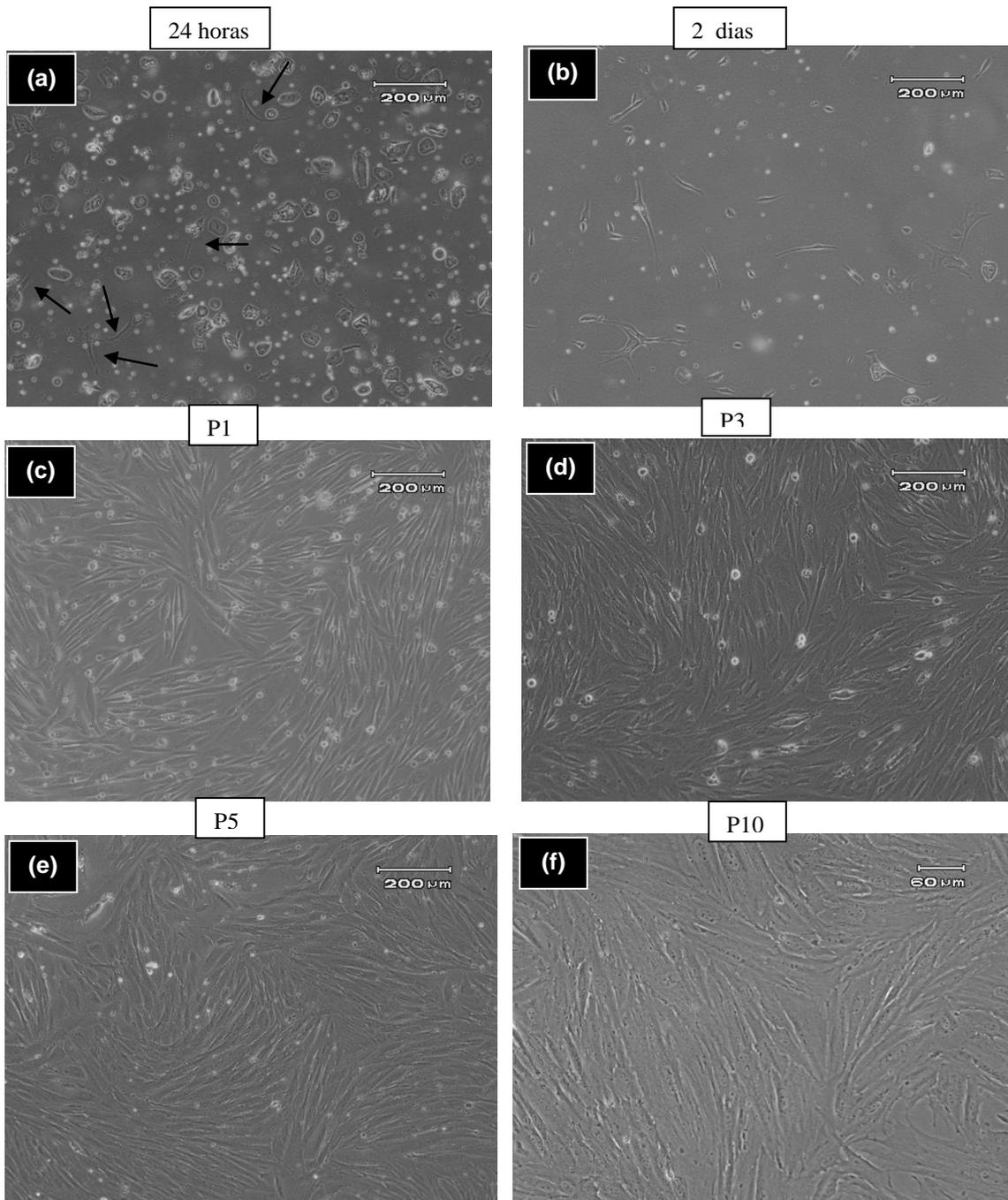


Figura 9: Microscopia óptica de contraste de fase das células humanas aderentes derivadas do sangue menstrual em cultura (n=18). **(a)** Células vinte e quatro horas após o plaqueamento. Setas (—▶) indicam as células que já aderiram ao plástico da garrafa de cultura. **(b)** Cultura após a primeira troca de meio. Note que as células aderidas apresentam morfologia mais alongada e aumentaram em número. **(c)** Células na passagem 1. Presença de células arredondadas e brilhantes sobre as células fibroblastóides. **(d)** Células na passagem 3. **(e)** Células na passagem 5. **(f)** Células na passagem 10. Note a ausência de células arredondadas e brilhantes e que as células aderentes apresentam a mesma morfologia das células da passagem 1.

#### 4.1.2) Cultivo das CTE-H9 e iPSC-CeSaM:

O uso das células CTE-H9 e iPSC-CeSaM teve como objetivo a comparação das CeSaM com células-tronco pluripotentes, frente ao estresse oxidativo, observando assim se a plasticidade interfere na resistência às espécies reativas de oxigênio. Para tal, cultivamos células-tronco embrionárias humanas da linhagem H9 e células-tronco pluripotentes induzidas derivadas das CeSaM. Com a iPSC também verificamos se a reprogramação alterou a resposta celular frente ao estresse.

A cultura e todos os experimentos com as CTE-H9 e as iPSC-CeSaM foram realizados entre as passagens P55 – 58 e P11 – 15, respectivamente.

Ambos os tipos celulares apresentaram a formação de colônias (Figuras 10 A e B), com células arredondadas e alta razão núcleo/citoplasma (Figuras 10 C e D).

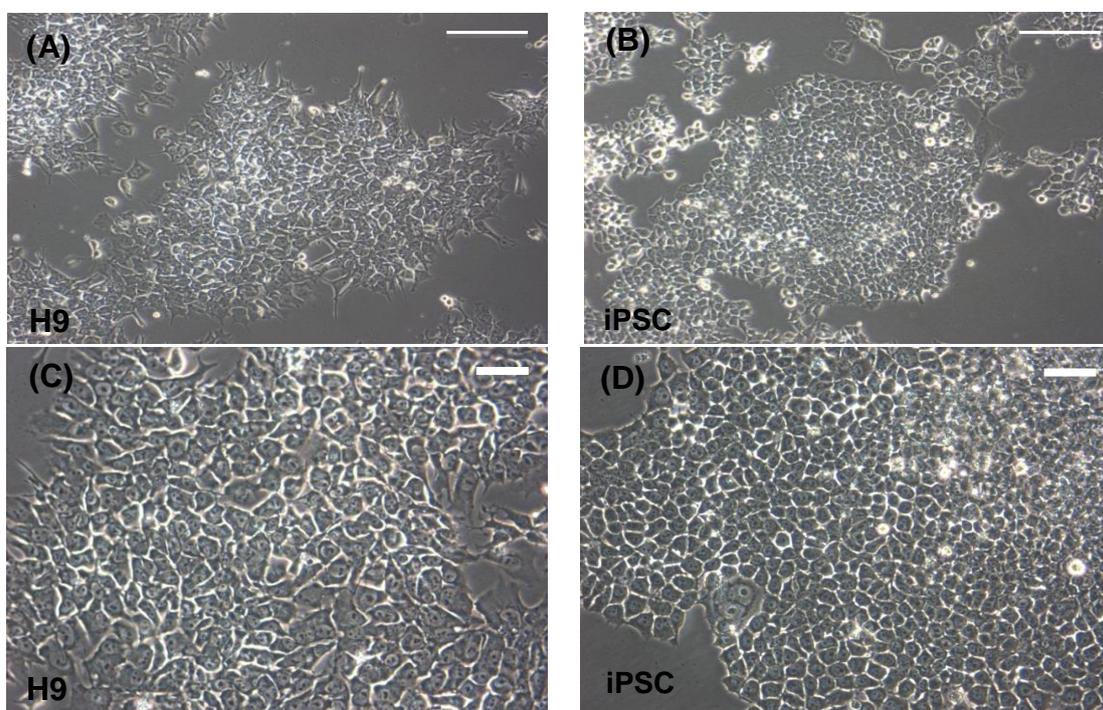


Figura 10: Microscopia óptica de contraste de fase das CTE H9 (A e C) e iPSC (B e D) em cultura. Cabe ressaltar que em A e B a barra de calibração é de 200  $\mu\text{m}$ , enquanto C e D é de 60  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.3) Cultivo dos fibroblastos dermais humanos (hFIB):

O uso de fibroblastos teve como objetivo utilizar uma célula terminalmente diferenciada, que exibe um potencial proliferativo semelhante ao da CeSaM para que fosse realizada uma comparação em relação à resistência ao peróxido de hidrogênio.

Os experimentos utilizando hFIB foram realizados quando as células atingiram a quinta passagem enzimática. Esse tipo celular apresentou uma morfologia alongada e delgada conforme pode ser observado na figura 11.

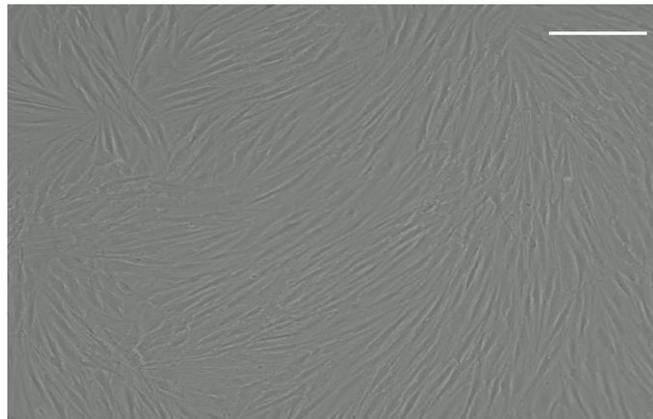


Figura 11: Microscopia óptica de contraste de fase dos hFIB em quinta passagem. A barra de calibração é de 200  $\mu\text{m}$ .

## 4.2) Caracterização das CeSaM *in vitro*:

### 4.2.1) Potencial de proliferação das células obtidas *in vitro*:

Considerando que algumas doadoras utilizaram contraceptivos orais, os quais possuem como principal componente o estrogênio, fomos avaliar se utilização da pílula, à base de estrogênio, alteraria o potencial proliferativo das CeSaM.

As células derivadas do sangue menstrual de doadoras que não utilizaram anticoncepcionais (n=6) foram capazes de dobrar a sua população em torno de  $38,07 \pm 1,9$  horas, enquanto que as células de doadoras que utilizaram (n=3) dobraram a cada  $35,97 \pm 1,7$  horas. Na Figura 12a, temos a quantidade de células por milímetro quadrado ao longo do tempo, indicando que todas as culturas apresentaram uma curva de crescimento exponencial. A Figura 12b, representa a conversão da curva exponencial em uma reta calculando-se o logaritmo na base 2 do número de células  $\text{mm}^2$ . Assim, obtivemos por meio do inverso do coeficiente angular da reta o valor do tempo médio em que estas células demoram em dobrar a sua população, demonstrado na figura 12c. Através desse experimento, evidenciamos que não existe diferença estatística entre as amostras das doadoras que utilizaram ou não anticoncepcionais orais com relação à proliferação celular.

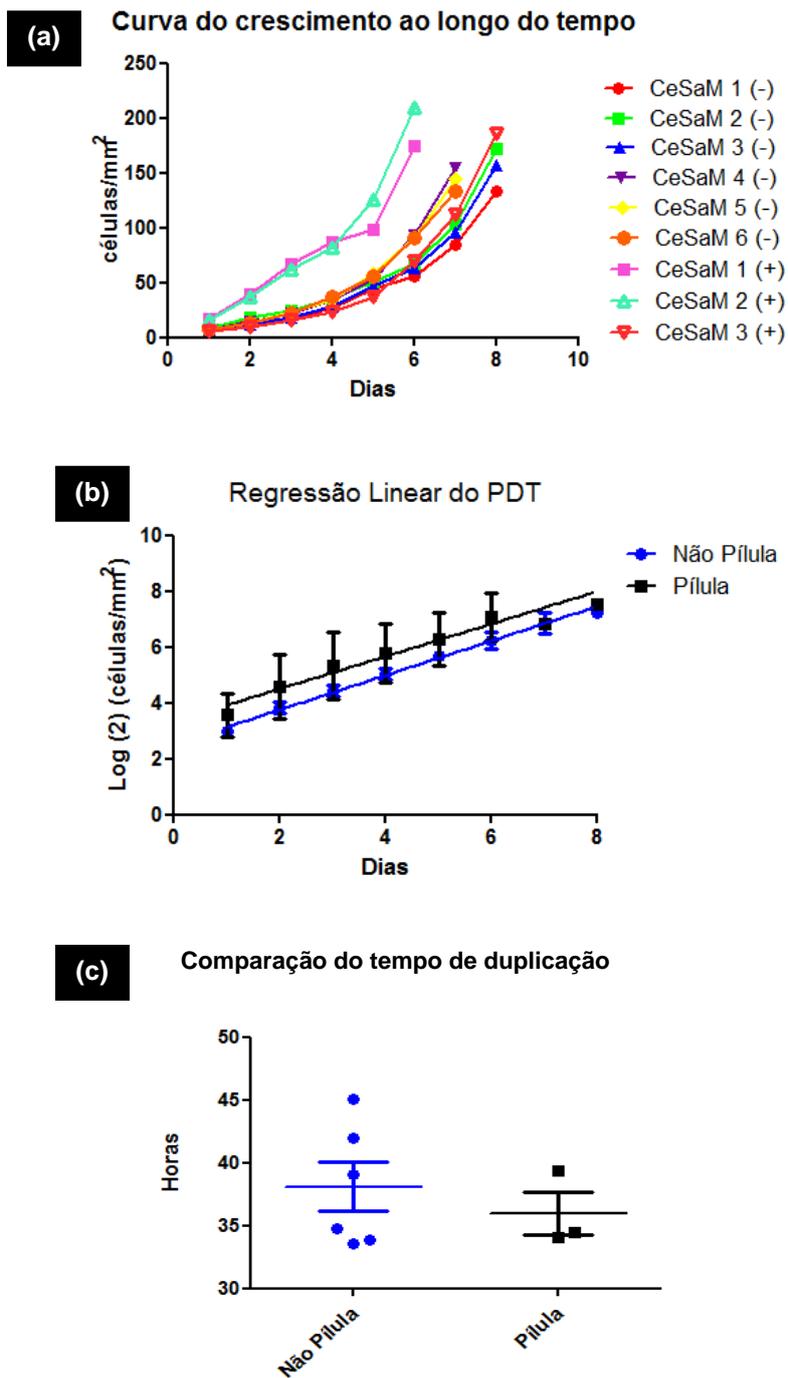


Figura 12: **Tempo de duplicação da população.** (a) Representação do perfil de cada uma das culturas ao longo do tempo, apresentando uma curva de crescimento exponencial. (b) Gráfico da regressão linear do PDT. (c) Comparação do tempo de duplicação das células provenientes dos dois diferentes tipos de doadoras.

#### 4.2.2) Caracterização imunofenotípica das células humanas derivadas do sangue menstrual pós-cultivo:

Com o objetivo de investigar se as células cultivadas eram células mesenquimais, caracterizamos o perfil imunofenotípico com um painel de anticorpos aceitos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular.

Inicialmente estabelecemos a população a ser analisada (n=10), representada na figura 13, por meio dos parâmetros SSC (do inglês *side scatter*) que permite verificar a granulosidade das células, isto é, a complexidade das células na amostra (núcleo, organelas) e FSC (do inglês *forward scatter*) que permite a diferenciação de acordo com o tamanho das células na amostra.

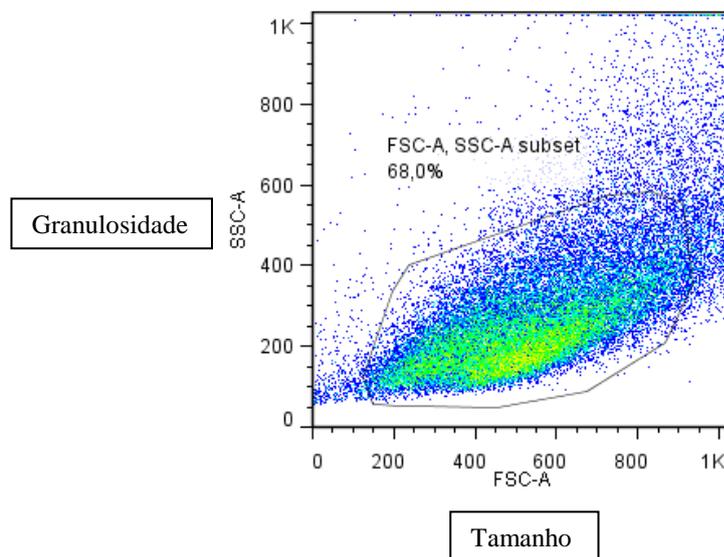


Figura 13: **Histograma representativo da morfologia das células em cultura em quinta passagem.** As células analisadas estão circundadas, apresentam granulosidade homogênea e tamanho celular variado.

Em seguida, realizamos marcações com anticorpos, para realizar a identificação fenotípica das células em questão.

A citometria de fluxo revelou que  $97,16\% \pm 2,36\%$  das células em cultura apresentam um perfil imunofenotípico semelhante aos das células mesenquimais descritas na literatura (Figura 14). Além disso, a cultura em quinta passagem apresentou  $2,84 \pm 2,36\%$  de células hematopoiéticas, as quais apresentaram um perfil imunofenotípico de macrófago/monócito, sendo positivas para CD45, CD14 e HLA-DR (Figura 14).

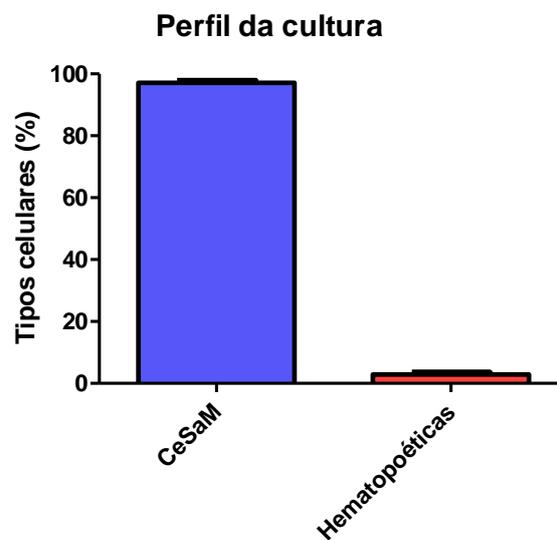


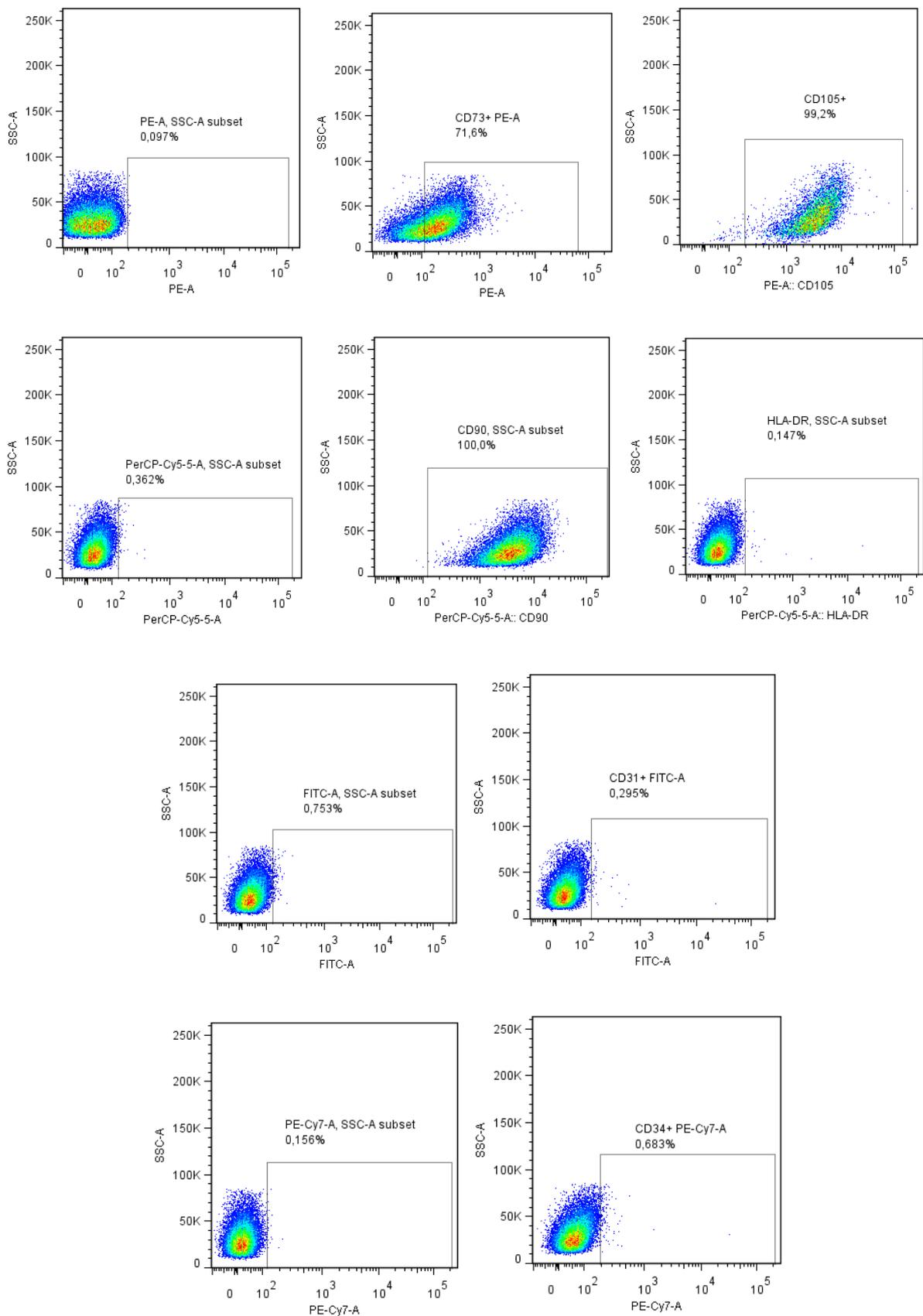
Figura 14: **Representação gráfica dos tipos celulares presentes na cultura de quinta passagem.** Cerca de 97,16% das células derivadas do sangue menstrual em cultura apresentaram um perfil imunofenotípico de células mesenquimais. Além disso, a cultura apresentou 2,84% de células hematopoiéticas.

As células humanas derivadas do sangue menstrual que apresentaram um perfil imunofenotípico semelhante ao de células mesenquimais, expressaram moléculas em sua superfície como o CD90 (93.3%), CD73 (85.5%) e CD105 (100%). Além disso, não expressaram moléculas características de células hematopoéticas, como CD34, CD45, CD19, CD14, HLA-DR.

Além do painel para as células mesenquimais, resolvemos ampliar nossa análise investigando moléculas características de células endoteliais, já que alguns artigos (MURPHY *et al*, 2008; HIDA *et al*, 2008) relatam o potencial angiogênico das células mesenquimais derivadas do sangue menstrual. Entretanto, observamos que as CeSaM não expressam moléculas características de células endoteliais como CD133, CD31, CD33.

Em seguida, investigamos a presença de diferentes moléculas de adesão, as quais desempenham um papel muito importante na adesão das células à matriz extracelular, bem como na interação célula-célula. Verificamos que as CeSaM apresentaram a expressão de moléculas de adesão como o CD54, CD166 e CD44

Além disso, também investigamos a presença do antígeno de superfície c-kit descrito como progenitor de células-tronco, também conhecido como CD117, porém, as CeSaM não apresentaram sua expressão (Figura 15 e 16).



**Figura 15: Dot plots representativas das CeSaM em quinta passagem.** As células humanas derivadas do sangue menstrual são positivas para os marcadores CD73, CD90, CD105 e negativas para HLA-DR, CD34 e CD31. O primeiro dot plot de cada linha representa as células não marcadas para cada fluorocromo.

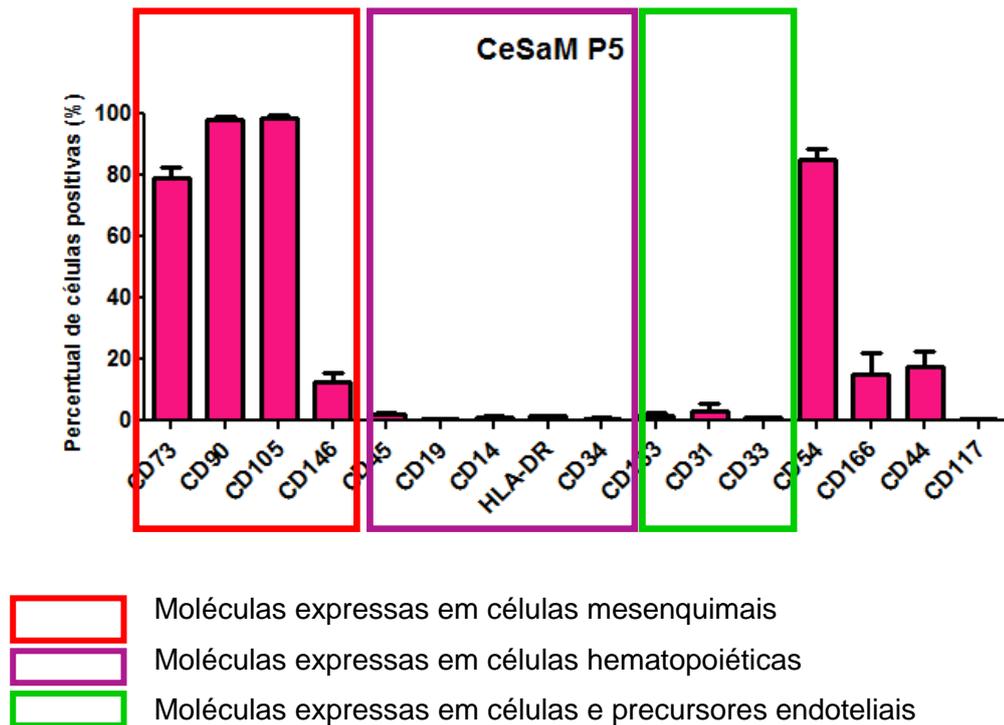
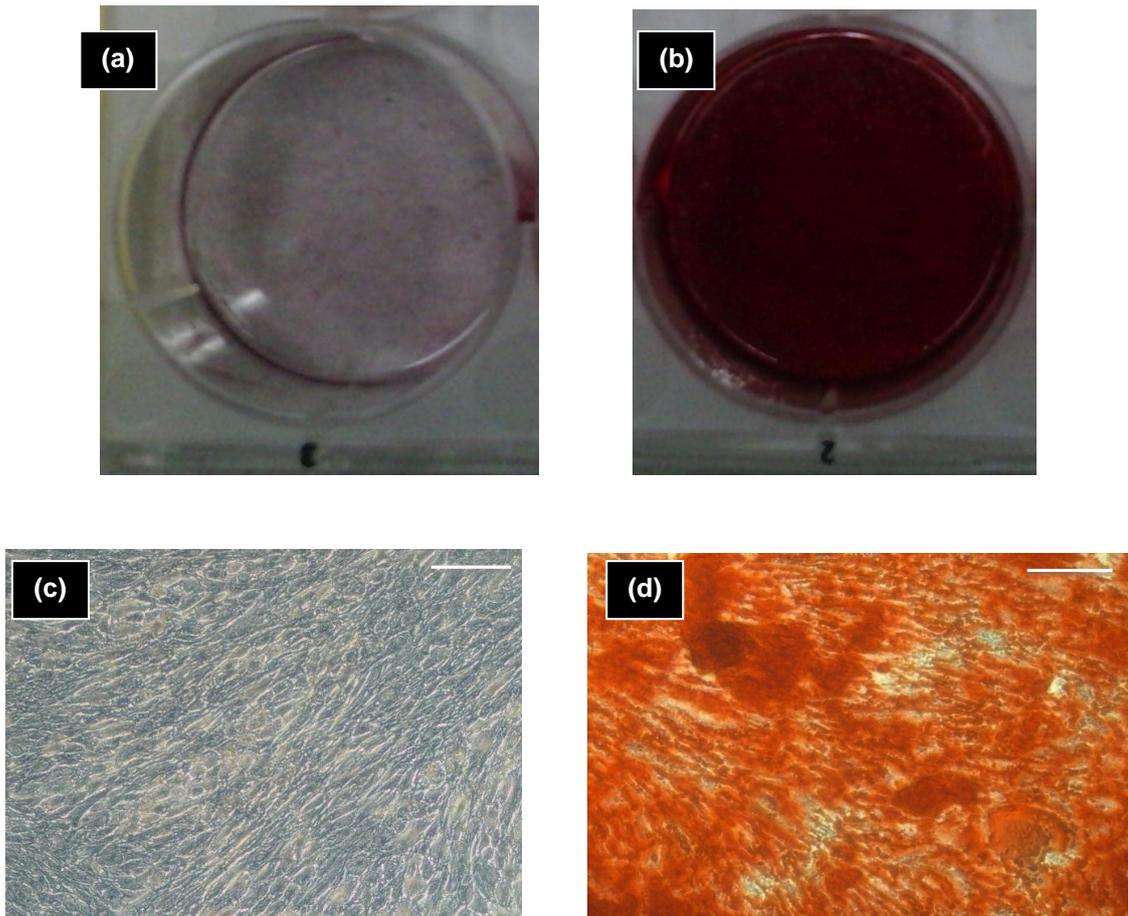


Figura 16: **Quantificação por citometria de fluxo.** Percentual de células que expressam moléculas características de células mesenquimais, hematopoiéticas, endoteliais e moléculas de adesão.

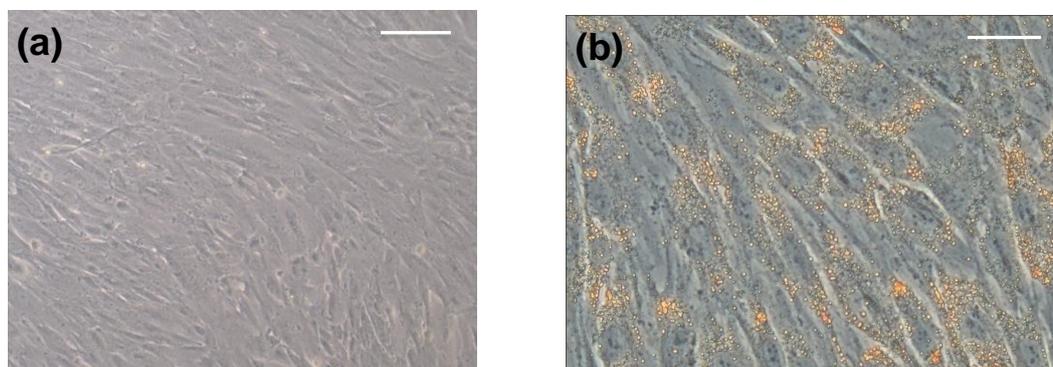
#### **4.2.3) Diferenciação osteogênica e adipogênica das CeSaM:**

Para confirmar o perfil mesenquimal e o potencial multipotente das CeSaM, avaliamos a sua capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica na quinta passagem.

As células apresentaram capacidade de diferenciação em células típicas de tecidos de origem mesodérmica como os osteoblastos e adipócitos. Observamos que as células induzidas para diferenciação osteogênica foram capazes de secretar cálcio, ocorrendo depósitos do mesmo, evidenciado pela coloração com vermelho de alizarina, o qual possui afinidade pelo cálcio. Avaliamos esta deposição de cálcio macroscopicamente, observando a coloração do poço da placa de cultura em que foi induzida a diferenciação (Figura 17b) e microscopicamente (Figura 17d). Já as células induzidas para diferenciação adipogênica apresentaram vacúolos lipídicos no seu citoplasma, visualizados após a coloração com óleo vermelho O (Figura 18b).



**Figura 17: Foto ilustrativa da indução de diferenciação osteogênica *in vitro* (n=3).** (a;c) Controle (CeSaM não induzida, porém corada). (b) Macroscopia da placa de cultura após a indução e posterior coloração com o vermelho de alizarina. Demonstração do potencial osteogênico por meio da presença de depósitos de cálcio na matriz extracelular representados em vermelho. (d) Células que receberam meio de indução osteogênico apresentando microscopicamente acúmulo de cálcio. As barras de calibração são de 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18: Foto ilustrativa da indução de diferenciação adipogênica *in vitro* (n=3).** (a) Controle (CeSaM não induzida, porém corada). (b) Demonstração do potencial adipogênico. Presença de vacúolos lipídicos no citoplasma representados pelos pontos de cor laranja. As barras de calibração são de 200  $\mu\text{m}$ .

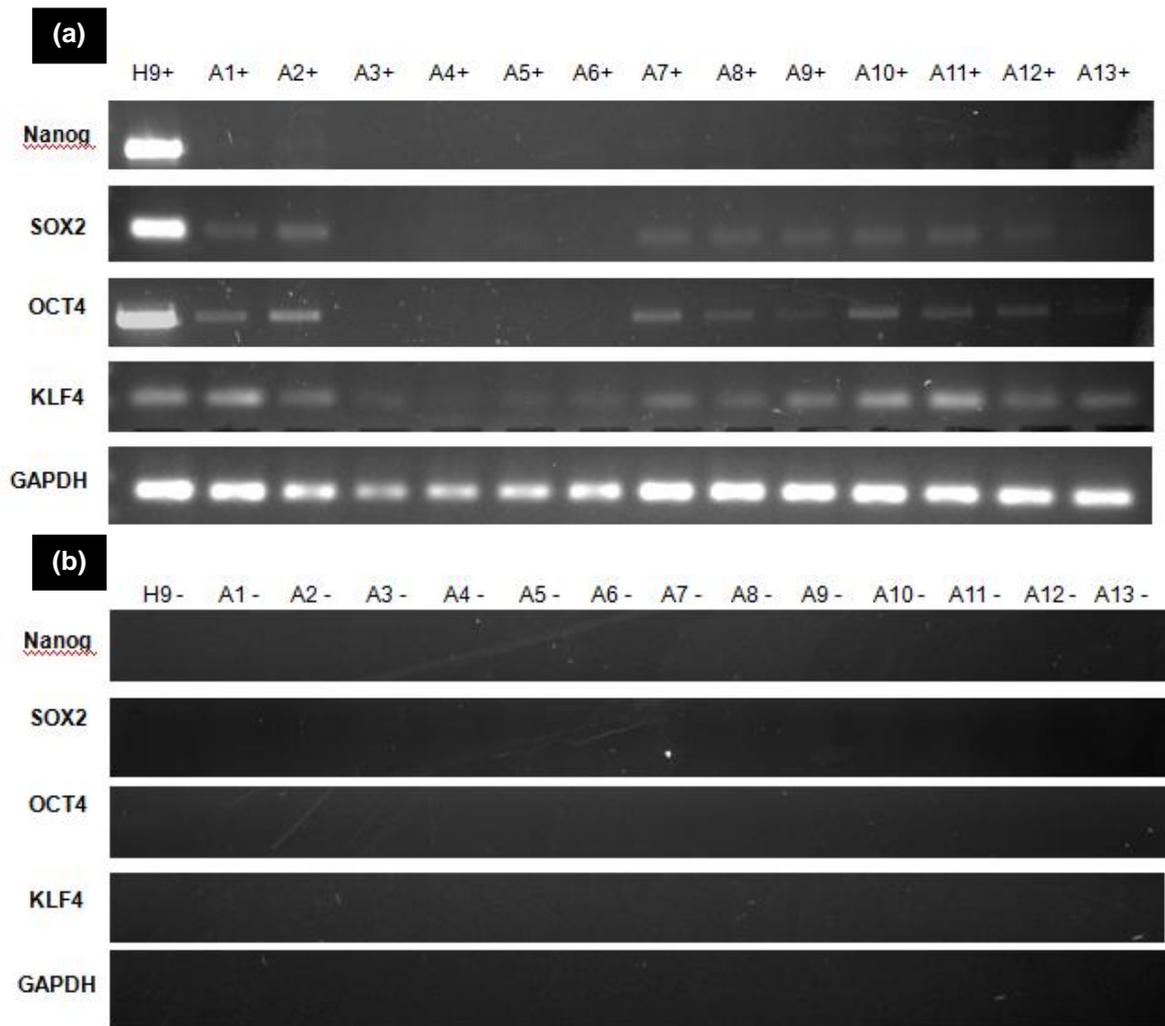
#### **4.2.4) Avaliação de moléculas características de células pluripotentes por RT-PCR:**

Diversos autores acreditam que existem células-tronco que estão em um estágio intermediário entre células-tronco embrionárias e mesenquimais, principalmente as células presentes nos tecidos neonatais (MARCUS & WOODBURY, 2008; LA ROCCA *et al.*, 2008; PAPA & ANAGNOU, 2009).

No intuito de observar se determinados genes relacionados à pluripotência são transcritos nas células derivadas do sangue menstrual, foi feita a análise da expressão dos genes Nanog, Sox-2, Oct3/4 e Klf4 por meio da técnica de RT-PCR.

A CeSaM foi positiva para o transcrito Klf4 em todas as amostras (Figura 19a). Esse é um fator transcricional que regula o processo de autorenovação, sendo expresso em diversos tecidos como vasos, miócitos cardíacos, pulmão, pele, intestino, fazendo parte também dos diferentes genes que caracterizam uma célula-tronco pluripotente. Entretanto, uma célula que apresente somente o Klf4 não é considerada pluripotente.

Por outro lado, a expressão de Nanog, Sox-2 e Oct3/4 mostrou-se heterogênea entre as diferentes amostras de CeSaM (Figura 19a). O gene do GAPDH foi utilizado como controle interno, uma vez que todas as células o expressam. As células-tronco embrionárias da linhagem H9 foram utilizadas como controle positivo da reação. Além disso, não foi observada a presença de produtos de amplificação nas amostras sem a enzima transcriptase reversa, indicando que não ocorreram contaminações por DNA genômico (Figura 19b).



**Figura 19: Expressão de transcritos relacionados a pluripotência nas CeSaM (n=13).**

As amostras de CeSaM (A+) expressam de forma heterogênea os diferentes transcritos, com exceção do Klf4 presente em todas as amostras. (A-) PCR com os cDNAs que foram feitos sem a enzima transcriptase reversa.

Em algumas amostras de CeSaM (A1, A2, A7, A8, A10 e A11) foram observadas a expressão de todos os fatores de transcrição (Nanog, Sox2, Oct3/4 e Klf4).

#### 4.2.5) Avaliação da tradução de proteínas por imunofluorescência:

Para investigar se além do RNA mensageiro, as CeSaM expressam as proteínas características de células pluripotentes, realizamos uma caracterização por imunofluorescência.

Nossos resultados indicaram que as CeSaM (n=3) utilizadas nestes experimentos expressaram proteínas características de células pluripotentes como o antígeno estágio específico precoce 4 (SSEA-4), TRA1-60 e TRA-81, indicando o estado indiferenciado das células *in vitro*. No entanto, a proteína Oct 3/4 não foi expressa nessas amostras (A1 e A2) indicando que nem todas as CeSaM são capazes de expressar todas as proteínas com características de células pluripotentes (Figura 20). Assim, constatamos que apesar das amostras apresentarem os transcritos para determinado gene, isso não significa que o produto final, a proteína, estará presente.

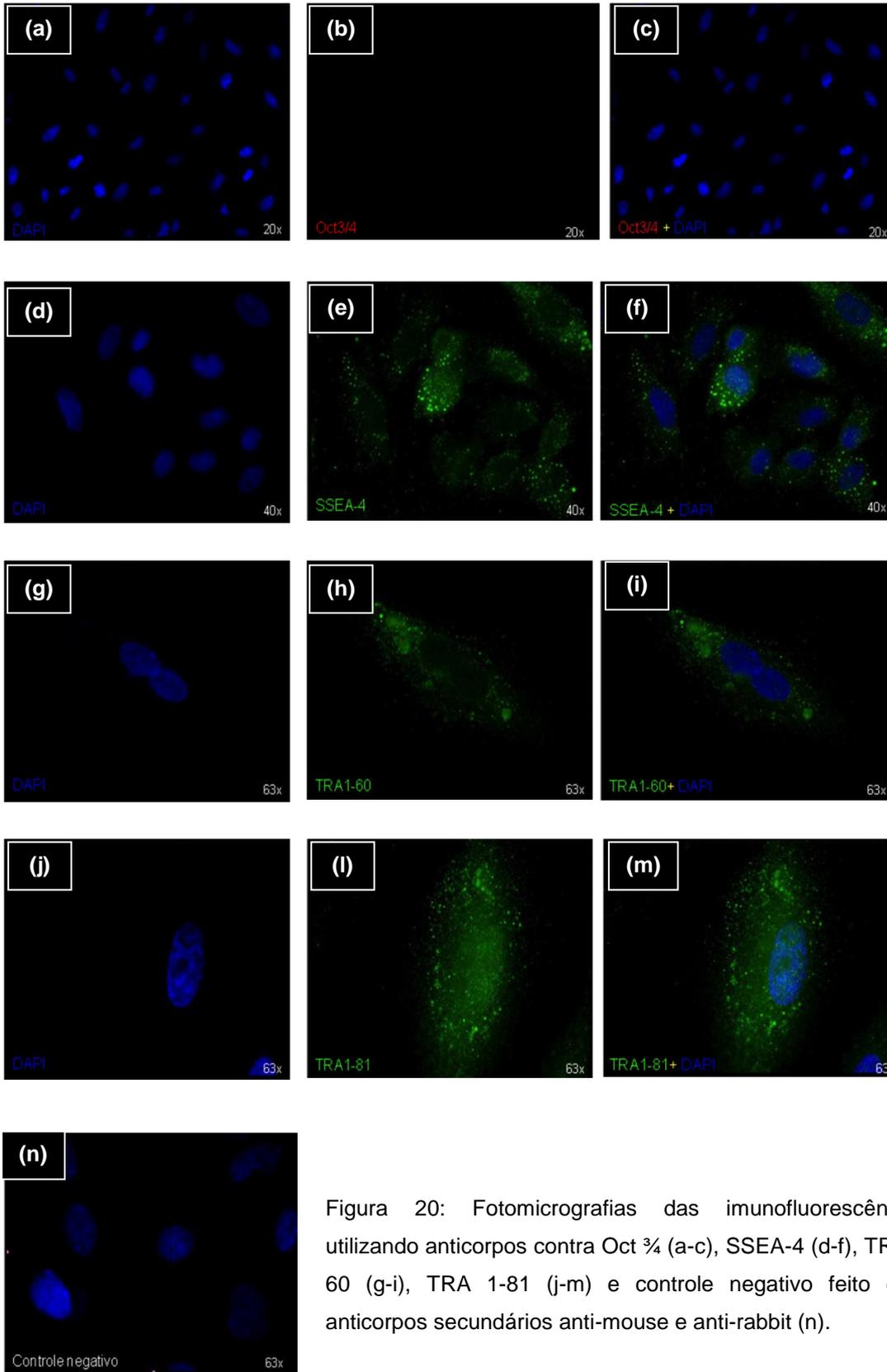


Figura 20: Fotomicrografias das imunofluorescências utilizando anticorpos contra Oct 3/4 (a-c), SSEA-4 (d-f), TRA1-60 (g-i), TRA 1-81 (j-m) e controle negativo feito com anticorpos secundários anti-mouse e anti-rabbit (n).

### **4.3) Susceptibilidade da CeSaM à morte induzida por espécies reativas de oxigênio:**

Com o objetivo de testar nossa hipótese de que as CeSaM poderiam apresentar maior resistência ao estresse oxidativo devido as variações fisiológicas que essas células são submetidas a cada ciclo menstrual, como a intensa necrose do tecido endometrial, incubamos as CeSaM com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 2 horas e, 24 horas depois realizamos o ensaio de viabilidade por MTT.

Como controle, utilizamos fibroblastos dermais humanos (hFIB) que são células totalmente diferenciadas, já descritas na literatura e, além disso, compartilham de uma característica semelhante às da CeSaM que é a elevada taxa de autorenovação.

As células derivadas do sangue menstrual apresentaram alta resistência à morte induzida por peróxido de hidrogênio (IC<sub>50</sub> = 1,812 mM), tendo sua viabilidade celular reduzida somente a partir da concentração de 1,5 mM. Já os fibroblastos dermais apresentaram um IC<sub>50</sub> bem inferior ao da CeSaM (IC<sub>50</sub> = 0,816 mM) (Figura 21).

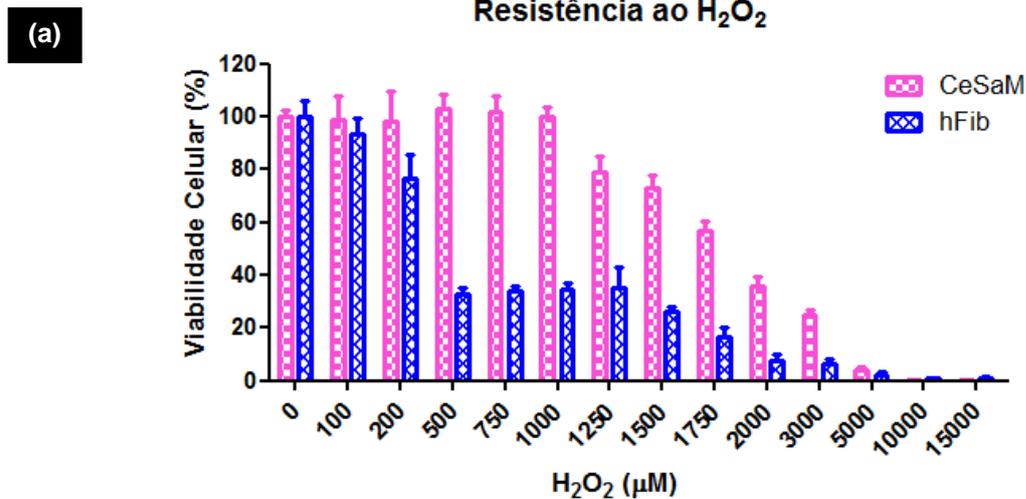


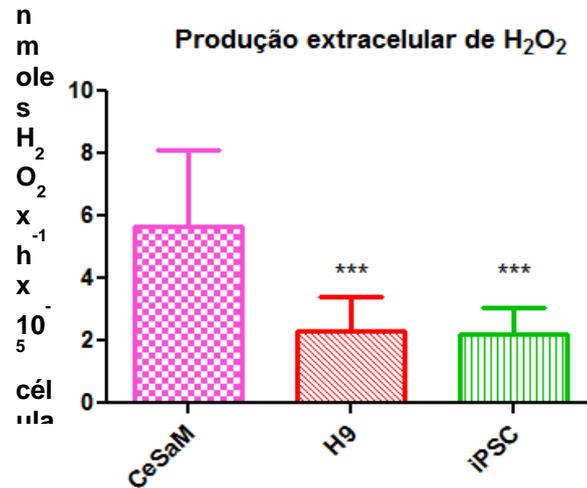
Figura 21: **Ensaio de viabilidade celular por MTT da CeSaM (n=6) e hFib (n=4) ao serem expostos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (a) Viabilidade celular em cada uma das diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas.

#### 4.4) Comparação da produção extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre os diferentes tipos celulares:

Através do método de amplex red/HRP, investigamos se havia diferença na capacidade de produção extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre as células adultas mesenquimais multipotentes e células pluripotentes, sejam embrionárias ou de pluripotência induzida.

Observamos que as CeSaM, H9 e iPSC produziram  $5,8 \pm 1,1$ ;  $2,26 \pm 0,6$  e  $2,17 \pm 0,43$  nmoles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-5</sup> células, respectivamente. Portanto, as células mesenquimais derivadas do sangue menstrual produziram cerca de 2,5 vezes mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelularmente do que as células pluripotentes. Este dado sugere que as CeSaM possam possuir mecanismos importantes para detoxificação das espécies

reativas de oxigênio, podendo ser capazes de suportar uma maior quantidade de EROs (Figura 22).

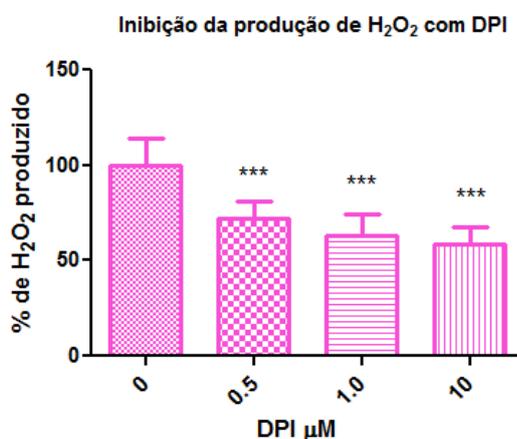


**Figura 22: Produção extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através do método de amplex red/HRP nas CeSaM (n=5), H9 (n=5) e iPSC (n=5).** A produção das CeSaM, H9 e iPSC são, respectivamente, 5,8 ± 1,1; 2,26 ± 0,6 e 2,17 ± 0,43 nmoles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-5</sup> células (\*\*\* p<0,05 vs CeSaM).

#### 4.5) Avaliação da fonte geradora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular nas CeSaM:

Com intuito de avaliar qual seria a fonte geradora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular nas CeSaM, utilizamos o *diphenyliodonium* (DPI), que é conhecido por inibir as NADPH oxidases. Essas são enzimas muito importantes nos sistemas biológicos uma vez que tem como função principal gerar EROs, não sendo como as outras fontes que produzem EROs como um subproduto da reação. Observamos que a produção extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é reduzida de forma significativa com a adição de 0,5 μM de DPI, entretanto essa redução observada não foi dose dependente, já que concentrações superiores como de 1 μM e 10 μM não foram capazes de reduzir ainda mais essa produção (Figura 23). Assim, podemos inferir que as NADPH

oxidases são responsáveis por cerca de 40% da produção  $H_2O_2$  da CeSaM, sendo outras enzimas responsáveis pelo restante dessa produção.

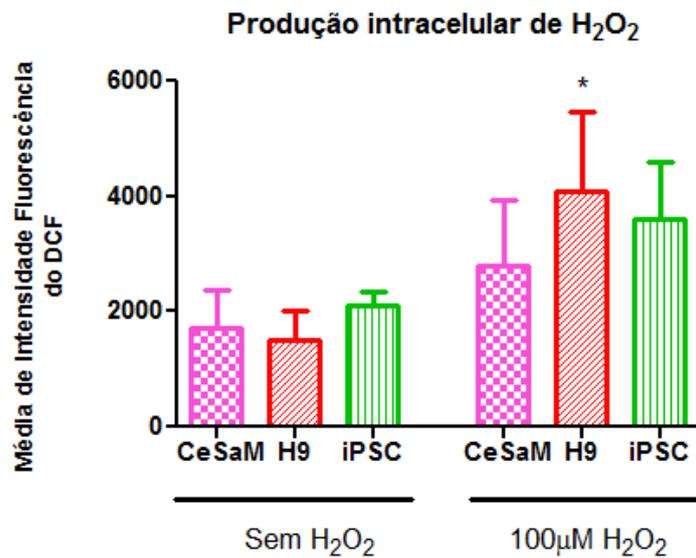


**Figura 23: Inibição da produção de  $H_2O_2$  com DPI nas CeSaM (n=4).** As NADPH oxidases são responsáveis por cerca de 40% da produção de  $H_2O_2$  nas CeSaM, entretanto, não são as únicas fontes geradoras de EROs neste tipo celular (\*\*\*)  $p < 0,05$  vs 0  $\mu M$  DPI).

#### 4.6) Comparação da produção intracelular de $H_2O_2$ entre os diferentes tipos celulares:

A fim de estimar o quanto de EROs essas células apresentavam intracelularmente e se as mesmas são capazes de manter essa concentração intracelular mediante uma situação de estresse, utilizamos o CM-H2DCFDA, quantificando a média de intensidade de fluorescência (MIF) por citometria de fluxo. Observamos que as mesenquimais derivadas do sangue menstrual, em condições basais, apresentaram a mesma média de intensidade de fluorescência ( $1712 \pm 659$  MIF) quando comparada as H9 ( $1511 \pm 502$  MIF) e iPSC-CeSaM ( $2112 \pm 228$  MIF), refletindo uma concentração semelhante de EROs intracelular. Entretanto, quando em contato com  $H_2O_2$ , os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares

aumentam menos na CeSaM ( $2785 \pm 1145$  MIF) e iPSC-CeSaM ( $3597 \pm 991$  MIF) do que na H9 ( $4097 \pm 1379$  MIF), indicando que as células derivadas do sangue menstrual apresentam uma maior capacidade de manejar o estresse oxidativo (Figura 24).



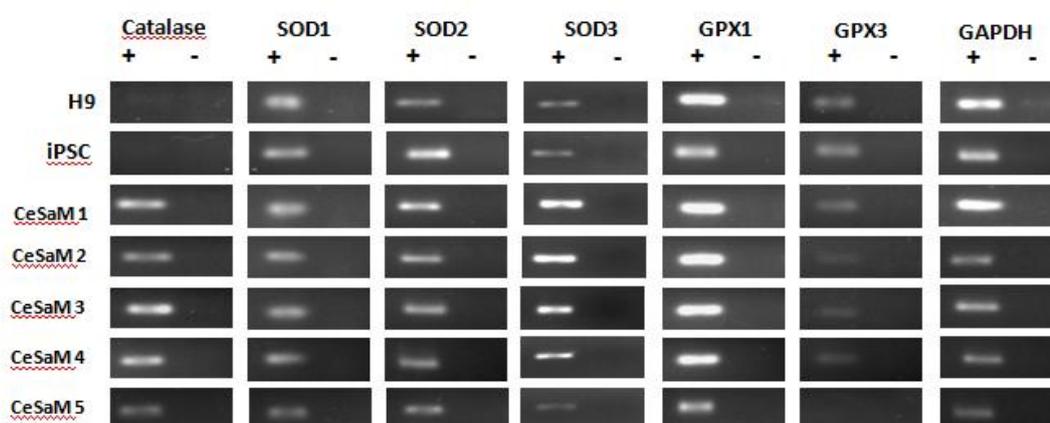
**Figura 24: Produção intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando o CM-H2DCFDA por citometria de fluxo nas CeSaM (n=6), H9 (n=3) e iPSC (n=3).** As H9 aumentaram os níveis intracelulares de EROs na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (\*\*\*)  $p < 0,05$  vs H9 sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### **4.7) Avaliação dos níveis de RNA mensageiro das enzimas antioxidantes por RT-PCR em tempo real nos diferentes tipos celulares:**

Considerando que as CeSaM apresentaram alta resistência à concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram capazes de produzir EROs e conseguiram manter os níveis intracelulares de EROs na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno, nosso

próximo passo foi avaliar os níveis de RNA mensageiro por RT-PCR convencional e em tempo real das enzimas antioxidantes nos três diferentes tipos celulares estudados, uma vez que essas enzimas são fundamentais na remoção das espécies reativas de oxigênio dos sistemas biológicos.

Primeiramente, verificamos por RT-PCR convencional a presença dos RNA mensageiros para catalase, superóxido dismutase 1,2,3 e glutathiona peroxidase 1 e 3 nos três diferentes tipos analisados (Figura 25).

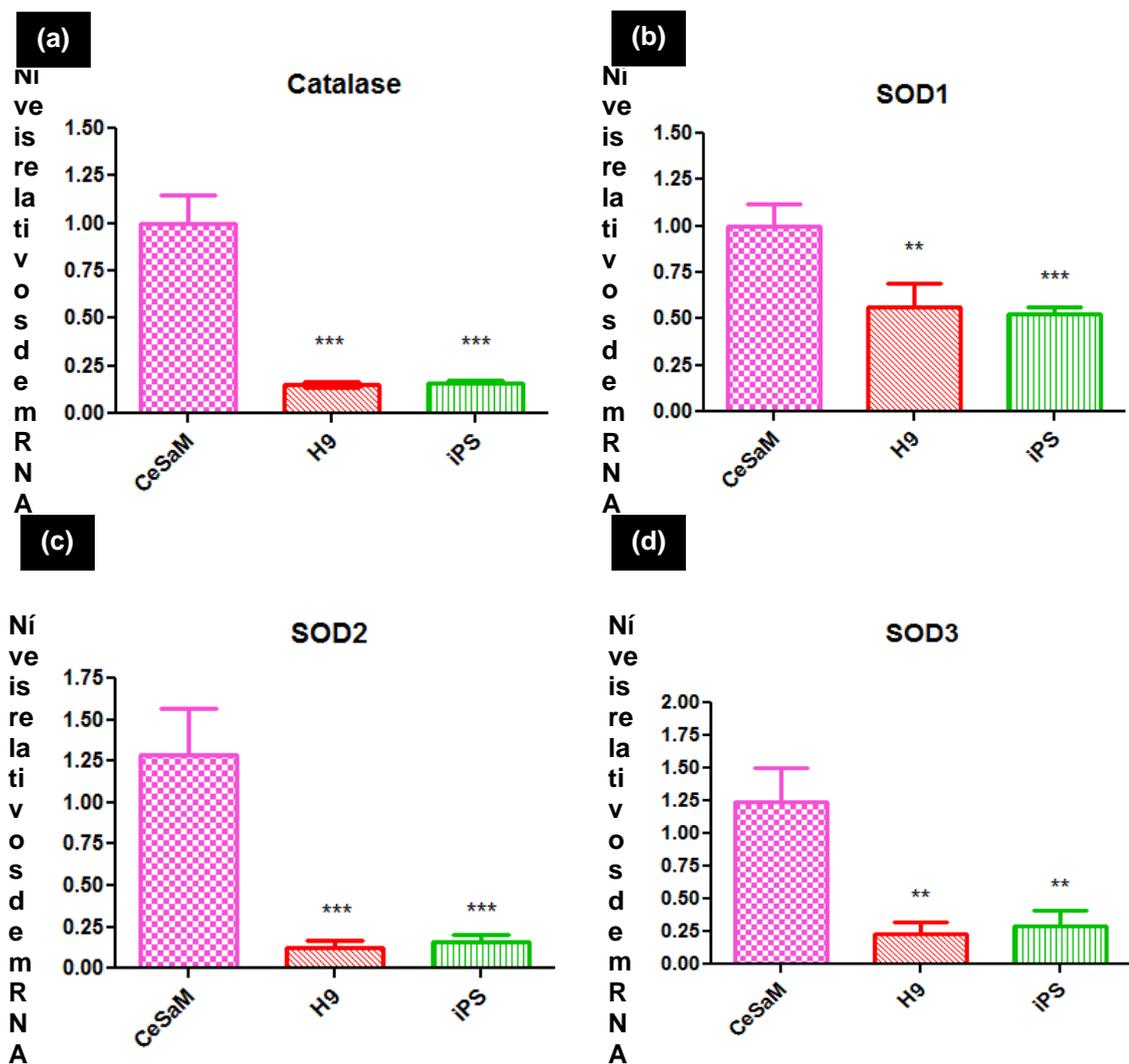


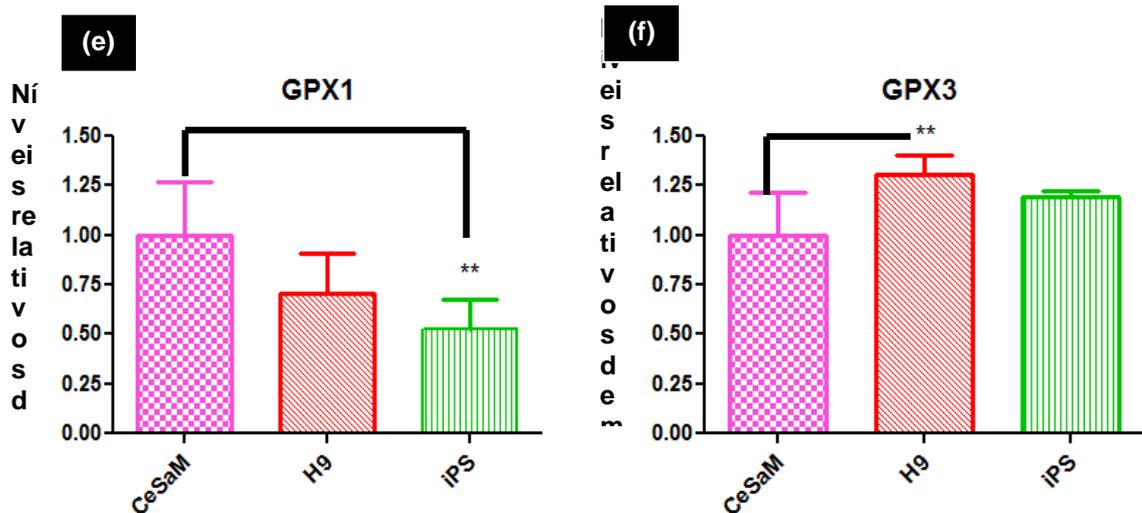
**Figura 25: Gel de agarose com os produtos de amplificação da reação de RT-PCR para as diferentes enzimas antioxidantes nas CeSaM, H9, e iPSC. (+) cDNA feito a partir da enzima transcriptase reversa. (-) amostra proveniente da reação sem a enzima transcriptase reversa.**

Em seguida, realizamos o RT-PCR em tempo real para avaliar se havia diferença no nível de expressão dos RNA mensageiros, comparado os diferentes tipos celulares. Observamos que as CeSaM possuem cerca de 5 vezes mais RNA mensageiro para catalase e superóxido dismutase 2 e 3 do que a H9 e iPSC. Além disso, as CeSaM apresentaram cerca de 2 vezes mais RNAm para a superóxido dismutase 1 do que a H9 e iPSC, bem como a CeSaM apresentou cerca de duas vezes mais níveis de RNA mensageiros para glutathiona peroxidase 1 somente em relação a iPSC, não havendo diferença estatística com relação a H9. Entretanto, a

H9 apresentou uma expressão maior da glutationa peroxidase 3 quando comparada a CeSaM (Figura 26).

Estes dados sugerem que as CeSaM são mais resistentes ao estresse oxidativo devido à elevada expressão das enzimas antioxidantes.





**Figura 26: RT-PCR em tempo real para as diferentes enzimas antioxidantes.** Os dados foram normalizados pela expressão da CeSaM. A CeSaM (n=9) expressa mais RNA do que a iPS (n=6) e H9 (n=6) para catalase (A), superóxido dismutase 1 (B), 2 (C) e 3 (D). Com relação a GPX1 (E) a CeSaM só apresenta uma expressão maior do que a iPSC. Tratando-se da GPX3 (F), a H9 apresentou uma expressão curiosamente maior do que a CeSaM.

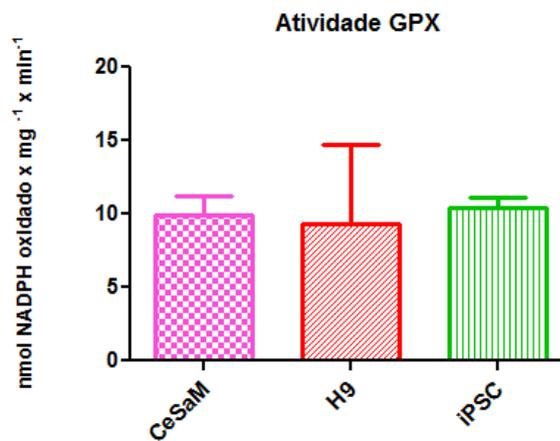
#### 4.8) Atividade da glutathiona peroxidase nos diferentes tipos celulares:

A atividade enzimática é um fator importante a ser analisado, já que a presença do RNA mensageiro ou da proteína para uma determinada enzima não informa se atividade da mesma é maior ou menor. Neste contexto, existem células que apresentam uma maior quantidade da enzima do que outras, entretanto, a sua atividade pode ser igual ou menor.

Uma das enzimas antioxidantes que já estudamos é a glutathiona peroxidase. Esta realiza a conversão do  $H_2O_2$  em espécies não reativas, como a glutathiona oxidada (GSSG) e a água. A enzima GPX necessita de glutathiona na forma reduzida

(GSH) para degradar tanto o  $H_2O_2$  quanto peróxidos orgânicos. Desta forma, a glutathione redutase (GR) participa como enzima antioxidante acessória, reduzindo a GSSG em GSH às custas da oxidação do NADPH.

Neste experimento, a atividade da GPX dos três tipos celulares foi semelhante, não havendo diferença estatística entre as amostras (Figura 27).



**Figura 27: Atividade da glutathione peroxidase.** Todos os tipos celulares apresentaram uma atividade semelhante. CeSaM (n=7), H9(n=6) e iPSC (n=6).

## 5. Discussão:

Inspirados pela proposta de buscar novas fontes de células-tronco que fossem obtidas por procedimentos menos invasivos e que tivessem a mesma plasticidade encontrada nas células mesenquimais de medula óssea, cuja utilização vem crescendo em ensaios clínicos (WAGNER *et al*, 2009; JOYCE *et al*, 2010; MAZO *et al*, 2012), decidimos estudar a existência de uma subpopulação de células do sangue menstrual com características de células-tronco mesenquimais, uma vez que o tecido endometrial passa por renovações constantes.

Em 2007, Cui e colaboradores foram os primeiros a identificar uma população de células-tronco com características mesenquimais no fluido menstrual. No entanto, algumas questões quanto à caracterização destas células, como o perfil imunofenotípico, o potencial de diferenciação e a plasticidade celular, continuam em aberto e precisam ser respondidas para que esta fonte de células-tronco possa ser utilizada em terapias de reparo e/ou regeneração tecidual.

Na primeira etapa do nosso estudo visamos isolar e caracterizar as células-tronco mesenquimais derivadas do sangue menstrual (CeSaM). Optamos por usar a fração derivada do sangue menstrual isolada por Ficoll. O processo de coleta e isolamento das células demonstrou ser seguro, exequível e reprodutível, corroborando o protocolo já descrito por MENG *et al* (2007) que também utilizou Ficoll para o isolamento (Figura 9).

Conforme observado neste estudo, estas células são capazes de aderir ao frasco de cultura, atendendo ao primeiro critério de classificação de células mesenquimais publicado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT)

(DOMINICI *et al*, 2006) (Figura 9), apresentando uma morfologia fibroblastóide, formando morros e vales.

Além disso, realizamos uma identificação imunofenotípica das células cultivadas *in vitro* para investigar se as CeSaM atendiam ao segundo critério de classificação de células-tronco mesenquimais proposta pela ISCT. Para classificar uma célula como CTM é necessária a expressão de antígenos específicos em sua superfície, apresentando expressão de CD105, CD73 e CD90 acima de 95% mensurados por citometria de fluxo e expressão menor ou igual a 2% de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006).

Como ainda não foi estabelecido um critério específico, com um painel imunofenotípico ampliado para caracterizar as CTMs de sangue menstrual, adaptamos o nosso painel ao já estabelecido pela ISCT, expandindo para a análise dos antígenos CD31, CD133, CD166, CD54, CD44 e CD117.

Nossos resultados mostraram uma expressão menor que 2% de antígenos associados a linhagens hematopoiéticas (CD45, CD34, CD19 e HLA-DR) e endoteliais (CD133 e CD31), considerada negativa, segundo os critérios já descritos acima. Essas células apresentaram elevada expressão de CD73, CD90 e CD105 (Figura 15 e 16), sendo que este perfil está de acordo com a literatura das células-tronco mesenquimais derivadas do sangue menstrual (MENG *et al*, 2007; PATEL *et al*, 2008; CUI *et al* 2007).

Conforme descrito por Cui e colaboradores (2007) e confirmado por este estudo, as CeSaM não expressam moléculas do MHC classe II (HLA-DR). Estas moléculas são fortes aloantígenos que, se expressos, podem mediar o reconhecimento alorreativo de linfócitos T CD4+. Este dado é importante para

permitir que as CeSaM possam atenuar problemas como rejeição do sistema imune, possibilitando não só o transplante autólogo, mas também o alogênico.

Como um dos objetivos do nosso grupo foi caracterizar as células indiferenciadas presentes no sangue menstrual, para posteriormente diferenciá-las em diferentes fenótipos, investigamos a expressão de CD117, o qual já foi descrito em células progenitoras cardíacas (BELTRAMI *et al.*, 2003; BEARZI, *et al.* 2009). A baixa expressão de CD117 demonstrada neste trabalho nas CeSaM, também foi observada por Cui e colaboradores (2007) e Hida e colaboradores (2008), entretanto, o grupo de Patel, em 2008, demonstrou a presença de células positivas para CD117. No endométrio humano (CHO *et al.*, 2004) e murino (CERVELLO *et al.*, 2007) já foram identificadas populações de células-tronco expressando o CD117, indicando que essas células observada por Patel e colaboradores no sangue menstrual, podem ser derivadas dessa população encontrada no tecido endometrial.

Uma vez que conseguimos identificar as células mesenquimais na fração enriquecida de células mononucleares derivadas do sangue menstrual, e conseguimos cultivá-las e expandi-las *in vitro*, mantendo as suas características imunofenotípicas, nos deparamos com outro questionamento com relação a sua capacidade de diferenciação quando cultivadas *in vitro*.

Buscando avaliar seu potencial de diferenciação mesodérmica, as células foram cultivadas em meios de indução de diferenciação osteogênica e adipogênica. Após o tratamento, observamos que todas as células derivadas do sangue menstrual em cultura apresentaram depósitos de cálcio na matriz extracelular, assim como fazem os osteócitos (Figura 17). Quando induzidas com meio adipogênico, essas células apresentaram vacúolos lipídicos em seu citoplasma, assim como observado em adipócitos (Figura 18). Estes dados sugerem que as CeSaM mantidas

em cultura são capazes de se diferenciar quando estimuladas, em concordância com o terceiro critério descrito pela ISCT (DOMINICI *et al*, 2006) e também com os artigos da literatura (MENG *et al*, 2007; PATEL *et al*, 2008). Essa capacidade de diferenciação é muito importante, uma vez que confirma que as CeSaM são realmente células-tronco multipotentes, podendo originar outros tipos celulares de origem mesodérmica, característica importante no âmbito da terapia celular.

Também realizamos experimentos de diferenciação condrogênica, entretanto, eles não foram bem sucedidos, já que não encontramos diferenças entre as colorações das células controle e diferenciadas. Acreditamos que o tipo de coloração utilizado (Alcian Blue) possa ter contribuído, uma vez que se trata de uma coloração inespecífica para condrócitos. Em experimentos futuros, faremos a análise da diferenciação por meio de western blots para colágeno tipo II, que são moléculas características de tecido cartilaginoso e não deixarão dúvidas sobre sua marcação.

O próximo passo foi estudar a proliferação celular das CeSaM. Observamos que elas apresentam uma elevada capacidade de auto-renovação, semelhante à de outros progenitores e células-tronco adultas. Outra abordagem que realizamos foi avaliar se a utilização de contraceptivos orais alteraria o potencial proliferativo das CeSaM, já que estas apresentam receptores para estrogênio, que tem como uma das suas funções estimular a proliferação. As CeSaM de doadoras que não utilizaram anticoncepcionais foram capazes de dobrar a sua população em torno de 38 horas, enquanto que as células de doadoras que os utilizam dobram a cada 36 horas (Figura 12). Até então na literatura, nunca havia sido feita uma comparação entre amostras de doadoras que utilizam ou não contraceptivos orais. Entretanto, já que não existe diferença significativa entre as diferentes amostras, podemos dizer que nossos dados estão em concordância com o artigo de PATEL e colaboradores

(2008), que relata um tempo de 36 horas para a duplicação da população. Contudo, eles diferem de Meng e colaboradores (2007), que publicaram que o tempo para duplicação é de 19,4 horas. As diferenças encontradas no tempo de duplicação podem ser explicadas pelos reagentes que compõem o meio de cultivo, bem como pelo método de análise para avaliar a duplicação. O grupo de Meng utilizou um suplemento diferente do usual, que foi o soro fetal de bezerro, o que pode ter contribuído para a discrepância encontrada. Além disso, para avaliar o potencial proliferativo, Meng e colaboradores realizaram o plaqueamento de células isoladas em placa de 96 poços e esses foram contados diariamente, entretanto a visualização das células é muito prejudicada quando a área é muito pequena, dificultando a observação da individualidade celular. Apesar da diferença temporal entre os grupos, o tempo em torno de 36 horas encontrado neste trabalho ainda é considerado rápido, sugerindo que a expansão em larga escala é possível em uma proposta terapêutica.

Apesar das CeSaM estarem presentes em um tecido adulto, elas apresentam a expressão de marcadores envolvidos na capacidade de auto-renovação das células-tronco embrionárias. A expressão gênica nas CeSaM foi positiva para o transcrito Klf4 em todas as amostras. Já a expressão gênica para Nanog, Sox-2 e Oct3/4 foi heterogênea entre as diferentes amostras de CeSaM (Figura 19). Em 2010, Borlongan e colaboradores demonstraram que essas células, de fato, expressavam Nanog e Oct3/4. Além disso, Meng e colaboradores (2007) e Patel e colaboradores (2008) corroboraram esse dado, demonstrando a presença do transcrito Oct3/4 em suas culturas.

Os dados de imunofluorescência mostraram que as CeSaM também apresentam moléculas características de células pluripotentes, expressando TRA1-

60 e TRA1-81, os quais nunca haviam sido descritos antes neste tipo celular. Além disso, elas expressam o antígeno embrionário estágio específico 4 (SSEA-4), corroborando dados já descritos por Patel *et al* (2008) e Borlongan *et al* (2010) (Figura 20).

Portanto, esses achados com relação a pluripotencialidade das CeSaM devem ser melhor investigados, pois é possível que as CeSaM apresentem um estágio intermediário entre as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas, compartilhando e exibindo características de pluripotencialidade e de multipotencialidade. Além das CeSaM, outros estudos sugerem que as células dos tecidos fetais, como as células do líquido amniótico, géleia de Wharton, placenta e membrana amniótica, representam também uma nova classe de células-tronco, com esse perfil intermediário (PAPA & ANAGNOU, 2009). Essa característica sugere que as CeSaM são uma poderosa fonte de progenitores e podem potencialmente ser diferenciadas em outros tipos celulares, das diferentes camadas germinativas, com maior facilidade. Uma vantagem adicional das CeSaM é que elas não são capazes de formar teratomas *in vivo* (dados não publicados do nosso laboratório), diferindo das células-tronco pluripotentes e reforçando o fenótipo intermediário deste tipo celular.

A possibilidade de obtenção de células no estado pluripotente a partir de células somáticas de um indivíduo representa um grande avanço científico. Para alcançar tal objetivo, foram desenvolvidas diversas metodologias para a reprogramação nuclear das células somáticas (YAMANAKA, 2009). O sangue menstrual pode ser uma alternativa para a geração de iPSCs, já que expressam Oct4, Sox2 e Klf4, três dos genes necessários para a geração dessas células.

A outra parte da nossa pesquisa se preocupa com as características das células que estão sendo utilizadas em terapia celular, já que algumas das doenças em que realizamos esse tipo de terapia cursam com o aumento de espécies reativas de oxigênio, como o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi).

Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm mostrado que o transplante de células-tronco é uma ferramenta promissora para regeneração e reparação de diversos tecidos lesados. Entretanto, a baixa relação entre o número de células transplantadas e de células que sobrevivem continua sendo um grande obstáculo para o sucesso da terapia celular. A integridade dessas células-tronco depende da adesão célula-célula e célula-matriz, a qual pode ser inibida pelas espécies reativas de oxigênio geradas na região isquêmica (SONG *et al*, 2010). Além disso, essas EROs geradas podem induzir morte celular nas células transplantadas, tornando interessante a busca por células-tronco resistentes ao estresse oxidativo, que consigam sobreviver melhor neste ambiente hostil para que possam exercer a sua função.

Através do ensaio de viabilidade celular com MTT, observamos que as células derivadas do sangue menstrual apresentaram alta resistência à morte induzida por peróxido de hidrogênio ( $IC_{50} = 1,812$  mM), tendo a viabilidade celular reduzida somente a partir da concentração de 1,5 mM. Já os fibroblastos dermais apresentaram um  $IC_{50}$  bem inferior ao da CeSaM ( $IC_{50} = 0,816$  mM) (Figura 21). Estes dados estão de acordo com dados descritos por Valle-Prieto e colaboradores (2010), que utilizaram células mesenquimais humanas derivadas da medula óssea e fibroblastos dermais, encontrando valores de  $IC_{50}$  bem semelhantes aos encontrados pelo nosso grupo. Entretanto, acreditamos que exista uma variabilidade entre as

células mesenquimais dos diferentes tecidos frente ao estresse oxidativo. Dados não publicados do nosso laboratório indicam que as CeSaM e células-tronco mesenquimais da geléia de Wharton do cordão umbilical apresentam IC<sub>50</sub> elevados e semelhantes, enquanto que as mesenquimais derivadas da placenta e do folículo capilar são menos resistentes, com IC<sub>50</sub> semelhante ao dos fibroblastos. Além disso, essa variabilidade na resistência também foi encontrada em células de ratos, como demonstrado por Peng e colaboradores (2008), as mesenquimais derivadas de cartilagem são mais resistentes à apoptose induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que as mesenquimais de medula óssea e tecido adiposo. Buscando na literatura outros tipos celulares sabidamente resistentes ao OS, encontramos os tireócitos. Uma linhagem de tireócitos de rato chamada PCCL3 apresenta um IC<sub>50</sub> em torno de 800 µM (dados não publicados do Laboratório de Fisiologia Endócrina Doris Rosenthal do IBCCF da UFRJ) e é considerada resistente, provavelmente porque possui uma defesa antioxidante elevada por produzir espécies reativas de oxigênio para biossíntese dos hormônio tireoidianos. Assim, a resistência da CeSaM encontrada nesse experimento ganha ainda mais destaque, já que elas apresentam um IC<sub>50</sub> muito superior ao dos tireócitos.

A produção de EROs ocorre naturalmente em nosso organismo por diversas enzimas que, quando estão sendo produzidas em grandes quantidades, são tóxicas e estão envolvidas com a senescência e apoptose das células-tronco. Em contraste, baixos níveis de EROs possibilitam sua ação como segundos mensageiros, aumentando a proliferação e migração de células-tronco, levando ao aumento da expressão de genes, como o da Akt e ERK 1/2, bem como a ativação de tirosinas quinases e inativação de tirosinas fosfatases (KIM *et al*, 2011). Sabe-se que as células-tronco, assim como muitos outros tipos celulares produzem EROs,

entretando a função dessas espécies que estão sendo produzidas ainda está sendo estudada. Esse fato estimulou o nosso próximo passo, que foi investigar se as CeSaM produzem mais ou menos EROs extracelular do as células pluripotentes, avaliando assim se a produção varia de acordo com a plasticidade da célula-tronco. Comparando-as com as células-tronco embrionárias da linhagem H9 e as células-tronco pluripotentes induzidas derivadas das CeSaM, observamos que as mesenquimais derivadas do sangue menstrual produzem uma maior quantidade de  $H_2O_2$  extracelular (Figura 22). Este dado sugere que as CeSaM, por produzirem mais EROs, teriam uma defesa antioxidante mais elevada para conseguir sobreviver normalmente com essa quantidade que está sendo produzida. O fato de as pluripotentes apresentarem uma menor produção extracelular de  $H_2O_2$  é muito interessante, uma vez que isso pode refletir em uma menor defesa antioxidante contra as EROs, as quais já foram descritas por induzir diferenciação em cardiomiócitos. Sauer e colaboradores (1999) demonstraram que a capacidade das células-tronco embrionárias em diferenciar-se em linhagem de células cardíacas foi criticamente dependente do estado redox dessas células, sendo induzida com baixas doses de EROs exógeno. Talvez, se as pluripotentes produzissem muitas espécies reativas de oxigênio, essas células poderiam não responder ao estímulo exógeno de  $H_2O_2$ , não se diferenciando assim em cardiomiócito.

Sabe-se que nos sistemas biológicos existem várias enzimas responsáveis pela produção de EROs, por exemplo as NADPH oxidases (NOX). As NOX catalisam a geração do ânion superóxido ou  $H_2O_2$ , transferindo um elétron do NADPH para o oxigênio molecular ( $O_2$ ), sendo esta a única função dessa enzima. Sendo assim, avaliamos se as NADPH oxidases contribuem para produção extracelular de EROs nas CeSaM. Observamos, ao utilizar um inibidor desta enzima,

que as NADPH oxidases são responsáveis por cerca de 40% da produção de  $H_2O_2$  nas CeSaM, logo, não são as únicas fontes geradoras de EROs neste tipo celular (Figura 23). Outras fontes de EROs já descritas em diferentes tipos celulares, além das NADPH oxidases, incluem a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, xantinas oxidases, óxido nítrico sintases desacopladas e citocromo P450 (AKKI *et al*, 2009; HORI & NISHIDA, 2008). Neste experimento, essas outras enzimas poderiam estar produzindo EROs no interior celular e estes poderiam estar se dirigindo ao meio extracelular, sendo detectado no ensaio de amplex red/HRP. O peróxido de hidrogênio é uma ERO para a qual a membrana plasmática é parcialmente permeável, logo se ocorre a produção dessa molécula no interior da célula, o  $H_2O_2$  produzido poderia se difundir para o exterior.

Em seguida, observamos que, quando as células eram incubadas com  $H_2O_2$ , os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares aumentaram menos na CeSaM e iPSC do que na H9, indicando uma maior capacidade de manejar o estresse oxidativo das células derivadas do sangue menstrual (Figura 24). O fato de as iPSC terem conseguido manter os níveis intracelulares de EROs pode ser explicado pela manutenção de uma memória epigenética do tecido de origem (KIM *et al*, 2012), uma vez que elas foram geradas a partir das CeSaM, compartilhando algumas características com essas células. Entretanto, aumentaremos o número de repetições desse experimento para a iPSC, já que existe uma tendência deste tipo celular em aumentar a produção de EROs intracelular quando em contato com o peróxido de hidrogênio.

Até então, verificamos que as CeSaM apresentam elevada resistência ao estresse oxidativo, são capazes de produzir mais EROs extracelularmente, bem como são capazes de manejar as espécies reativas de oxigênio exógenas,

eliminando-as e mantendo os níveis intracelulares. Essas características estimularam o estudo das defesas antioxidantes das CeSaM. Assim o próximo passo foi avaliar os níveis de RNA mensageiro por PCR em tempo real das enzimas antioxidantes, comparando-a com as células pluripotentes. Observamos que as CeSaM possuem mais RNA mensageiro para a maioria das enzimas antioxidantes quando comparadas a H9 e iPSC, tais como: catalase e superóxido dismutase 1, 2, e 3. Já no caso da enzima glutatona peroxidase 1, a CeSaM apresentou uma expressão significativamente maior apenas em relação à iPSC. A glutatona peroxidase 3 foi expressa em maior quantidade na células-tronco embrionárias H9, entretanto, como a GPX3 localiza-se na membrana extracelular, sua importância no controle da homeostase celular interna é pequena.

Adicionalmente, tão importante quanto ou mais que os níveis de RNA mensageiros, é a atividade enzimática. Em relação à atividade enzimática da glutatona peroxidase, não foi observada diferença estatística entre as amostras. Sendo assim, faz-se necessário investigar a atividade das outras enzimas antioxidantes, como a catalase e a superóxido dismutase, que são importantes nos sistemas biológicos por promoverem a remoção de peróxido de hidrogênio e de superóxido, respectivamente. Além disso, considerando que a atividade enzimática depende do substrato, seria interessante estimular as células com  $H_2O_2$  para observar se algum tipo celular específico aumenta sua atividade para eliminar as EROs que estão sendo colocada a mais no sistema.

Avaliando todos os dados aqui obtidos, temos que as CeSaM não esbarram em problemas técnicos, principalmente os que estão relacionados à obtenção de células por meios que exigem a internação do doador e procedimentos hospitalares (métodos invasivos). Portanto, é um método não-invasivo, que não traz desconforto

algum à doadora e podem ser facilmente cultivadas e expandidas *in vitro* devido ao seu alto potencial de proliferação, possibilitando a sua produção em larga escala e sua utilização na terapia celular, permitindo também a criação de um banco de células paciente-específico. Além disso, as CeSaM por apresentarem expressão dos principais transcritos presentes nas células pluripotentes, e, ao mesmo tempo, manterem o padrão típico das CTMs apresentam-se como uma promissora fonte de células-tronco para reprogramação celular. Além disso, as CeSaM, por serem mais resistentes e possuírem uma maior defesa antioxidante, seriam capazes de sobreviver no ambiente hostil com elevação de EROs, exercendo por mais tempo o seu efeito e aumentando as chances de sobrevivência das células transplantadas, bem como a possibilidade de diferenciação das mesmas em células diferenciadas do tecido em questão.

## 6. Conclusão:

As CeSaM são uma subpopulação derivada do sangue menstrual aderente ao plástico da garrafa de cultura, exibem um perfil imunofenotípico predominantemente mesenquimal e apresentam características de células multipotentes, pois são capazes de dar origem a células da linhagem mesodérmica.

Adicionalmente, essas células apresentam moléculas características de células pluripotentes, sugerindo que elas são uma poderosa fonte de progenitores e pode potencialmente ser diferenciadas em outros tipos celulares.

Além disso, as CeSaM apresentam alta resistência às espécies reativas de oxigênio. Comparando-as com as H9 e as iPSC-CeSaM, verificamos que as CeSaM produzem uma maior quantidade de  $H_2O_2$  extracelular. Entretanto, quando em contato com  $H_2O_2$ , os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares aumentam menos na CeSaM e iPSC do que na CTE, indicando uma maior capacidade de manejar o estresse oxidativo. Observamos também que as CeSaM possuem mais RNA mensageiro do que a CTE e iPSC para a maioria das enzimas antioxidantes. Entretanto, em relação à GPX, isso não refletiu em um aumento na atividade enzimática.

Assim, nossos dados sugerem que as CeSaM possam ser resistentes ao estresse oxidativo devido à elevada expressão das enzimas antioxidantes, tornando-as fortes candidatas para o uso em terapia celular de doenças isquêmicas, que cursam com a elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio.

## Referências Bibliográficas:

- AGGARWAL, S. AND M. F. PITTENGER. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105(4): 1815-22. 2005.
- AKKI A, ZHANG M, MURDOCH C, BREWER A, SHAH AM. NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47: 15–22. 2009.
- AMANN, B., LUEDEMANN C., *et al.* Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplantation* 18 (3):371-80, 2009.
- ANGELOS MG, KUTALA VK, TORRES CA *et al.* Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290:H341–H347. 2006.
- ASAHARA, T; C. KALKA, *et al.* Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 7 (6): 451-7. 2000.
- BATTIWALLA, M. AND HEMATTI, P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy* 11 (5): 503-15. 2009.
- BEARZI C, LERI A, LO MONACO F, ROTA M, GONZALEZ A, HOSODA T, PEPE M, QANUD K, OJAIMI C, BARDELLI S, D'AMARIO D, D'ALESSANDRO DA, MICHLER RE, DIMMELER S, ZEIHNER AM, URBANEK K, HINTZE TH, KAJSTURA J, ANVERSA P. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(37):15885-90. 2009.
- BELTRAMI, A.P., 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.* 114(6):763-76. 2003.
- BJORNSON, C. R., R. L. RIETZE, *et al.* Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283 (5401): 534-7. 1999.

- Borlongan CV, Kaneko Y, Maki M, Yu SJ, Ali M, Allickson JG, Sanberg CD, Kuzmin-Nichols N, Sanberg PR. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev.*19(4):439-452. 2010.
- BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.1976.
- CERVELLO, I.; MARTINEZ-CONEJERO, J. A.; HORCAJADAS, J. A.; PELLICER, A.; SIMON, C. Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum. Reprod.* 22:45–51. 2007.
- CHAN RW, GARGETT CE. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells.* 24(6):1529-38. 2006.
- CHO, N. H., PARK, Y.K., *et al.* Lifetime expression of stem cells markers in the uterine endometrium. *Fertil. Steril.* 81:403-407. 2004.
- CUI, C. H., UYAMA, T., *et al.* Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol. Biol. Cell* 18:1586-1594. 2007.
- DIKALOV S, GRIENGLING KK, HARRISON DG. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension* 49:717-727. 2007.
- DI NICOLA, M., CARLO-STELLA, *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99(10): 3838-43. 2000.
- DOMINICI, M., LE BLANC, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-7, 2006.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 (5819), 154-156. 1981.
- EVANS, S. M. The role of estradiol and progesterone in modulating the subjective effects of stimulants in humans. *Exp Clin Psychopharmacol.* 15 (5): 418-26. 2007.

- FINKEL T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15: 247–254. 2003.
- FLOHÉ, L; GÜNZLER, W.A. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology* 105 (114-121). 1984.
- FRIEDENSTEIN, A. J., J. F. GORSKAJA, *et al.* Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4 (5): 267-74. 1976.
- GIORDANO, A., GALDERISI, U., *et al.* From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiology* 211 (1): 27-35. 2007.
- GRIENDLING KK, Sorescu D, and Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494–501. 2000.
- GURDON, J. B. E MELTON, D. A. Nuclear reprogramming in cells. *Science*, Vol. 322, pp. 1811-1815. 2008.
- GUYTON, A.C. and HALL, J.E. Female physiology before pregnancy and female hormones. In.: *Textbook of Medical Physiology* - 11th ed. Cap. 81: 1011-1020. 2006.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* v. 35, n. 5, p. 1147-1150. 2007.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Rad. Biol. Med.*, 4. ed. New York: Clarendon Press, p. 880. 2007.
- HARTMAN C. Regeneration of monkey uterus after surgical removal of endometrium and accidental endometriosis. *West J Surg Obstet Gynecol.* 52,87–102. 1944.
- HESS D.C. and BORLONGAN C.V. Stem cells and neurological diseases. *Cell Prolif* 41 Suppl 1: 94-114. 2008.
- HIDA N. NISHIYAMA N, MIYOSHI S, KIRA S, SEGAWA K, UYAMA T, MORI T, MIYADO K, IKEGAMI Y, CUI C, KIYONO T, KYO S, SHIMIZU T, OKANO T, SAKAMOTO M, OGAWA S, UMEZAWA A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells* 26(7):1695-1704. 2008.

- HORI M E NISHIDA K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 81, 457–464. 2009.
- HOTTA, A. E ELLIS, J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *Journal of Cellular Biochemistry*. Vol. 105, pp. 940-948. 2008.
- HUBBARD SA, GARGETT CE. A cancer stem cell origin for human endometrial carcinoma? *Reproduction*.140(1):23-32. 2010.
- ISHIWATA I, ISHIWATA C, NAGAYAMA T, ISHIKAWA H. Histogenesis and culture of human uterine carcinosarcoma. *Cancer Res*. 41(5):1978-83.1981.
- JIANG, X. X., Y. ZHANG, *et al*. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105(10): 4120-6. 2005.
- JONHSON, A., L. RAFF, *et al*. Development of Multicellular Organisms. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> ed., Artmed. 2004.
- JONHSON, A., L. RAFF, *et al*. Histology: The Lives and Deaths of Cells Tissues. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> ed., Artmed. 2004.
- JOYCE N, ANNETT G, WIRTHLIN L, OLSON S, BAUER G AND NOLTA JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*. 5(6): 933–946. 2010.
- KAMATA, Y., TAKAHASHI, Y., *et al*. Local implantation of autologous mononuclear cells from bone marrow and peripheral blood for treatment of ischaemic digits in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology* 46 (5): 882-4. 2007.
- KATO K, TAKAO T, KUBOYAMA A, TANAKA Y, OHGAMI T, YAMAGUCHI S, ADACHI S, YONEDA T, UEOKA Y, KATO K, HAYASHI S, ASANOMA K, WAKE N. Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. *Am J Pathol*.176(1):381-92. 2010.
- KEISINGER, K., BAAL, N., *et al*. The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? *Mol Cell Endocrinol*. 269 (1-2): 65-80. 2007.

- KELLY, E. B. *Stem cells*. s.l. : USA: Greenwood Publishing Group. 2007.
- KIERSZENBAUM A.L. *Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução á Patologia* 2ª Ed. 2007.
- KIM, J.H.; PARK, S.H.; PARK, S.G; CHOI, J.S.; XIA, Y. AND SUNG J.H. The Pivotal Role of Reactive Oxygen Species Generation in the Hypoxia-Induced Stimulation of Adipose-Derived Stem Cells. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* Volume 00, Number 00. 2011.
- KIM K, ZHAO R, DOI A, NG K, UNTERNAEHRER J, CAHAN P, HUO H, LOH YH, ARYEE MJ, LENSCH MW, LI H, COLLINS JJ, FEINBERG AP, DALEY GQ. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 30(1):112. 2012.
- KING, A.E. and CRITCHLEY, H.O.D. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 120:116–126. 2010.
- KRAMPERA, M., S. GLENNIE, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101(9): 3722-9. 2003.
- KRAUSE K., SCHNEIDER C., KUCK KH. & JAQUET K. Stem Cell Therapy in Cardiovascular Disorders. *Cardiovascular Therapeutics* 28, 101–110. 2010.
- LA ROCCA G, ANZALONE R, CORRAO S, MAGNO F, LORIA T, LO IACONO M, DI STEFANO A, GIANNUZZI P, MARASÀ L, CAPPELLO F, ZUMMO G, FARINA F. 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*. 131(2):267-82. 2008.
- LE BLANC, K., C. TAMMIK, *et al*. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31(10): 890-6. 2003.
- LEBLOND, C.P. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. *Natl Cancer Inst Monogr* 14, 119-150. 1964.
- MARCUS, A.J., WOODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *J Cell Mol Med*. 12(3):730-42. 2008.

- MARTIN, G.R. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (12), 7634-7638. 1981.
- MAZO M, ARAÑA M, PELACHO B, PROSPER F. Mesenchymal Stem Cells and Cardiovascular Disease: A Bench to Bedside Roadmap. *Stem Cells International* Article ID 175979, 11 pages. 2012.
- MENG X, ICHIM TE, ZHONG J, ROGERS A, YIN Z, JACKSON J, WANG H, GE W, BOGIN V, CHAN KW, THÉBAUD B, RIORDAN NH. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J. Transl. Med.* 5:57. 2007.
- MITALIPOV, S. AND WOLF, D. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 144: 185-199. 2009.
- MORO MA, ALMEIDA A, BOLAÑOS JP, LIZASOAINA I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke *Free Radical Biology & Medicine* 39 1291 – 1304. 2005.
- MURPHY PM, WANG H, PATEL AN, KAMBHAMPATI S, ANGLE N, CHAN K, MARLEAU AM, PYSZNIAK A, CARRIER E, ICHIM TE, RIORDAN NH. Allogeneic endometrial regenerative cells: An “Off the Shelf” solution for critical limb ischemia? *Journal of Translational Medicine.* 6:45. 2008.
- MURRY, C. E., SOONPAA, M. H., *et al.* Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 02446:1-5. 2004.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Disponível em [www.nih.gov](http://www.nih.gov). Acesso em 15 de Maio de 2009. NIH 2009.
- NETTER, Frank H.. *Atlas de Anatomia Humana*. 2ed. Porto Alegre: Artmed. 2000.
- NOLAN, K., MILLET, Y., *et al.* Tissue engineering and biomaterials in regenerative medicine. *Cell Transplant* 17: 241-243. 2008.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 31, p. 1287-1312. 2001.

- OGA, Z. Fundamentos da toxicologia. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 530 p. 2003.
- OKITA, K.; et al;. Generation of mouse induced pluripotents stem cells without viral vectors. *Molecular and Cellular Biology*. 2008.
- OSHIMA Y, FUJIO Y, NAKANISHI T et al. STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc Res*. 65:428–435. 2005.
- PADYKULA HA, COLES LG, MCCRACKEN JA, KING NW JR, LONGCOPE C AND KAISERMAN-ABRAMOF IR. A zonal pattern of cell proliferation and differentiation in the rhesus endometrium during the estrogen surge. *Biol Reprod*. 31,1103–1118. 1984.
- PADYKULA HA. Regeneration of the primate uterus: the role of stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 622,47–56. 1991.
- PATEL AN, PARK E, KUZMAN M, BENETTI F, SILVA FJ, ALLICKSON JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant*. 17:303–311. 2008.
- PAPPA, K.I., ANAGNOU, N.P. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med*. 4(3):423-33. 2009.
- PENG, L.; JIA, Z.; YIN, X.; ZHANG, X.; LIU, Y.; CHEN, P.; MA, K. AND ZHOU C. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue. *Stem Cells and Development* 17:761–774. 2008
- PERIN, E.C.; WILLERSON, J.T.; PEPINE, C.J. *et al*. Effect of Transendocardial Delivery of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells on Functional Capacity, Left Ventricular Function, and Perfusion in Chronic Heart Failure. *JAMA*. Mar 24. 2012
- PITTENGER, M. F., A. M. MACKAY, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-7. 1999.
- PRIANISHNIKOV VA. On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. *Contraception* 18:213–223. 1978.

- REISINGER, K., BAAL, N., *et al.* The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? *Mol Cell Endocrinol.* 269 (1-2): 65-80. 2007.
- ROBERTSON, J.A. Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. *Nat Rev Genet* 2 (1), 74-78, 2001.
- SADAN, O., MELAMED, E., *et al.* Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases. *Expert opinion on biological therapy* 9 (12): 1487-97. 2009.
- SAUER, H., RAHIMI, G., HESCHELER, J., & WARTENBERG, M. (1999). Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 75, 710–723.
- SCHWAB, K. E., CHAN, R.W., *et al.* Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil. Steril.* 84:1124-1130. 2005.
- SEGERS, V.F. AND LEE R.T. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* 451: 937-942. 2008.
- SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. *Oxidative Stress*, USA:Academic press. p. 1-7. 1985.
- SONG, H.; CHA, M.J.; SONG, B.W.; KIM, I.K.; *et al.* Reactive Oxygen Species Inhibit Adhesion of Mesenchymal Stem Cells Implanted into Ischemic Myocardium via Interference of Focal Adhesion Complex. *STEM CELLS* 28:555–563. 2010.
- STRAUER, B.E., BREHM, M., *et al.* The therapeutic potential of stem cells in heart disease. *Cell Proliferation* 1:126-45. 2008.
- SUJATA, L. AND CHAUDHURI, S. Stem Cell Niche, the Microenvironment and Immunological Crosstalk. *Cellular & Molecular Immunology* 5(2): 107-112. 2008.
- TAKAHASHI, K. E YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblasts cultures by defined factors. *Cell*, Vol. 126, pp. 663-676. 2006.
- THOMAS DB. Do hormones cause breast cancer? *Cancer.* Feb 1;53(3 Suppl):595-604. 1984.

- THOMSON, J.A., J. ITSKOVITZ-ELDOR, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391): 1145-7.1998.
- TORRES-PADILLA, M. E. Mini-Review: Developments in reproductive biology and medicine. *Human Reproduction* 23 (6): 1246-1252. 2008.
- VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interactions*, v. 160, p. 1-40. 2006.
- VALLE-PRIETO, A. E CONGET, P. A.. Human Mesenchymal Stem Cells Efficiently Manage Oxidative Stress. *Stem Cells And Development* Volume 00, Number 00, 2010.
- ZACKS, M.A.; WEN, J. J.; VYATKINA, G. *et al.* An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *Ann. of the Braz. Acad. Sci.*, v. 77, n. 4, p. 695- 715. 2005.
- ZHONG Z, PATEL AN, ICHIM TE, RIORDAN NH, WANG H, MIN WP, WOODS EJ, REID M, MANSILLA E, MARIN GH, DRAGO H, MURPHY MP, MINEV B. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J Transl Med.* 20;7:15. 2009.
- WAGERS, A. J., R. I. SHERWOOD, *et al.* Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297 (5590): 2256-9. 2002.
- WAGNER, J., KEAN, T. *et al.* Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Curr Opin Biotechnol.* 20 (5): 531-6. 2009.
- WEN, J. J.; VYATKINA, G.; GARG, N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: Role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 37, p. 1821–1833. 2004.
- WERNIG, M.; *et al.*; In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES cell-like state. *Nature.* Vol. 448, pp. 318-324. 2007.
- WILLIAMS AR, HARE JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res.* 30;109(8):923-40. 2011.

WOLFF EF, WOLFF AB, HONGLING DU, TAYLOR HS. Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reprod Sci.* 14(6):524-33. 2007.

WOOD C AND ROGERS PAW. Pregnancy after planned partial endometrial resection. *Aust NZ J Obstet Gynaecol.* 33,316–318. 1993.

YAMANAKA, S. A fresh look at iPS cells. *Cell.* 3;137(1):13-7. 2009.

YAMANAKA, S.; BLAU, H. M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature.* Vol. 465, pp. 704-712. 2010.

## Anexo A – Principais Características das Moléculas CD

Monoclonal	Marca	Sinônimos Comuns	Principais/Possíveis funções
CD90 PE-CY5	BD	Thy-1	Marcador para linfócito T; papel na ativação de linfócitos T (?); Inibe a diferenciação das CTHs
CD105 PE	BD	Endoglina	Liga-se a TGF- $\beta$ ; modula respostas celulares a TGF- $\beta$
CD73 PE	BD	Ecto-5'-nucleotidase	sinalização nos linfócitos T; protege contra inflamação vascular
CD34 PE-CY7	BD	Gp 105-120	Adesão célula-célula, inibe a diferenciação hematopoiética
CD45 APC	BD	Antígeno comum dos leucócitos (LCA)	Sinalização mediada pelo receptor antigênico de linfócitos T e B
HLA-DR PE-CY5	BD	MHC classe II	Reconhecimento imune e apresentação de antígenos
CD44 FITC	BD	H-CAM	Adesão célula-célula e célula-matriz; estimula a proliferação e migração celular
CD54 PE-CY5	BD	ICAM-1	Adesão de neutrófilos ao endotélio no sítio de inflamação
CD166 PE	BD	ALCAM	Molécula de adesão; envolvida na hematopoiese e angiogênese embrionária
CD31 FITC	BD	PECAM-1	Molécula de adesão envolvida na diapedese de leucócitos, e adesão em células endoteliais.
CD133 PE	Macs	AC133	Presente em progenitores endoteliais; funções não conhecidas.
CD117 PercP-CY5.5	BD	c-kit	Liga-se ao ligante de c-Kit e medeia seus efeitos biológicos; relacionado à sobrevivência das CTHs

Adaptado de Protein Reviews on the web (PROW), <http://prow.nci.nih.gov/default.htm>

## Anexo B – Artigo da geração da iPSC-CeSaM\*

\* Este artigo já foi aceito pela revista Cell Transplantation.

### HUMAN MENSTRUAL BLOOD-DERIVED MESENCHYMAL CELLS AS A CELL SOURCE FOR RAPID AND EFFICIENT NUCLEAR REPROGRAMMING

Deivid de Carvalho Rodrigues<sup>1</sup>, Karina Dutra Asensi<sup>1</sup>, Leandro Vairo<sup>1</sup>, Ricardo Luiz Azevedo- Pereira<sup>1</sup>, Rosane Silva<sup>1</sup>, Edson Rondinelli<sup>1,2</sup>, Regina Coeli Goldenberg<sup>1</sup>; Antonio Carlos Campos de Carvalho<sup>3</sup>, and Turán Péter Ürményi<sup>1</sup>.

1 Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

2 Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. 3 Instituto Nacional de Cardiologia, Rio de Janeiro, Brazil

Key words: iPSC, Mesenchymal stromal cells, Reprogramming efficiency

#### Abstract

Human induced pluripotent stem cells (iPSC) were originally generated by ectopic expression of Oct4, Klf4, Sox2 and c-Myc genes in adult fibroblasts, albeit with low efficiency (0.01% - 0.1%) and only after 20 days [1]. Menstrual blood-derived mesenchymal cells (MBMC) are multipotent cells that express some of the core embryonic stem (ES) cells' regulator genes, and we investigated whether increased reprogramming efficiency could be obtained by using MBMCs as a cell source. Transduction using retroviral vectors containing Oct4, Sox2 and Klf4 genes led to nuclear reprogramming as early as 5 days post-transduction, with an efficiency of 2% to 5%. The clones were morphologically identical to ES cells, showed the cell surface pluripotency markers SSEA-4 and TRA-1-60 and the transcription factors Nanog and OCT4, and were capable of forming embryoid bodies and of differentiating into cells of the three germ layers. MBMCs could be a good cell source for rapid reprogramming.

#### Introduction

Reprogramming of human adult somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSC) has the potential to be used in regenerative medicine to repair tissues

damaged by disease or injury. Although human iPSC have been generated from various types of somatic cells, such as skin fibroblasts [1], keratinocytes [2], neural stem cells (NSCs) [3], blood cells [4,5] and cord blood-derived endothelial cells (CBEC) [6], there is still a large debate about the best sources from which to derive iPSC. Subsequent studies have shown that age, origin and cell type used profoundly affect reprogramming efficiency. A desirable protocol should aim not only to optimize all these parameters, but also to reduce the number of factors used, the time required for reprogramming and the difficulty to obtain the cells. For example, mouse neural stem cells (NSCs) could be more efficiently reprogrammed than fibroblasts and the reprogramming occurs by the superexpression of only two (OCT4 and KLF4) or even one (OCT4) of the Yamanaka's factor genes, most likely due to their consistent endogenous expression of SOX2 and c-MYC genes [7,8]. In these reports, human embryonic stem (ES) cell-like colonies appeared ~10-15 days after transduction of the factors, which is a substantially shorter time than the ~16–30 days required for the human fibroblasts. However, NSCs are rare cells available in small quantities and not easily accessible without highly invasive procedures, making them poor candidates for reprogramming in a clinical setting.

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are non-hematopoietic cells characterized by plastic adherence in culture, differentiation potential under specific conditions, and a cell surface marker gene expression pattern (presence of CD105, CD73 and CD90, and absence of CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79a or CD19, and HLA class II) [9, 10]. MSCs have been used as an adult somatic cell source for nuclear reprogramming, and in general were shown to be reprogrammed faster and/or with higher efficiency. The faster and higher efficiency reprogramming of MSCs derived from distinct sources, such as third molar teeth [11], umbilical cord matrix and amniotic membrane [12], and bone marrow [13], are usually attributed to the endogenous expression of some of the core pluripotency genes and overall epigenetic landscape.

## Results

To reprogram these cells, a hMBMCs culture was first established as described in methods. After 3 to 4 passages in vitro, the cells displayed a homogeneous morphology and all the characteristics of mesenchymal cells: adherence to plastic dishes, a specific immunophenotypic profile, and the ability to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteocytes in vitro (not shown). We also investigated the gene expression profile of hMBMCs using RT-PCR to detect transcripts of several core pluripotency genes, including those used in the reprogramming experiments. As can be seen in figure 1A, transcripts from Oct4, Sox2, Klf4 and Nanog, but not from Tert, Dnm3tb or Nodal, were detected in MBMCs. Although the profile is different from that of the ES cell line H9 (Figure 1A), as expected, the presence of transcripts from some pluripotency marker genes could lead to a high reprogramming efficiency of MBMCs.

An outline of the reprogramming approach is shown in Figure 1B. MBMC cultures containing 10<sup>4</sup> cells were subjected to two rounds of retroviral transduction, at an interval of 24 hours between rounds, with equal proportions of each of the Oct4-, Sox2- and Klf4-containing recombinant retrovirus. One day after the second transduction, hMBMCs were replated onto inactivated mouse embryonic fibroblast (iMEF) and the medium was changed to ES cell culture medium. The ES cell medium was then replenished every day. Interestingly, small cell clusters with a high nucleus-to-cytoplasm ratio appeared 5 days after the first transduction and typical ES cell-like colonies could be seen at day 10 after first transduction (Figure 1C). These ES cell-like colonies reached the optimum size to be picked-up around day 15 to 17 after the first transduction (Figure 1C), which is a substantially shorter period when compared to that required to reprogram fibroblasts [1]. The reprogrammed MBMCs were then referred to as iPS-MBMC. In order to quantify the reprogramming efficiency, we performed AP staining of iPS-MBMCs at day 15. Figure 1D shows a typical 100-mm dish containing reprogrammed MBMC colonies after AP staining. The reprogramming efficiency was then estimated by dividing the number of AP positive colonies (which possessed cells with the high nucleus-to-cytoplasm ratio and the ES cell-like morphology) by the number of transduced MBMCs. The calculated reprogramming efficiency was approximately 2-5%, which is also significantly higher than that achieved with fibroblasts [1]. Thus, hMBMCs can be a good cell source for reprogramming since they can be obtained by noninvasive procedures.

Fifteen single iPS-MBMCs colonies were mechanically selected and five were successfully expanded up to ten passages. Each of the five iPS-MBMC lines exhibited and maintained a distinct morphology from the original MBMCs and resembled hES cells in morphology as well as in AP staining capacity (Figure 2A and B). We chose three cell lines for further characterization as described in methods.

The three iPS-MBMC lines propagated at a very similar rate but varied in the percentage of spontaneous differentiation during culture procedures, suggesting particular differences between them. Immunocytochemistry assays showed that they expressed the transcription factor genes Oct4 and Nanog as well as the surface protein genes Ssea-4 and Tra-1-60 (Figure 2C). To assess the gene expression pattern in the iPS-MBMC lines, we isolated RNA from iPS cells cultured under feeder- free conditions. Figure 3 shows the detection and quantification by RT-PCR and qRT-PCR of transcripts from the endogenous pluripotency-associated genes Oct4, Sox2 and Klf4 using specific primers designed to detect the endogenous mRNAs of these genes. Transcripts from Nanog, Dnmt3b and Tert genes were detected in iPS-MBMCs (Fig. 3A) while undetectable in MBMCs (Fig. 1A). Moreover, similarly to what has been previously described [1], the three exogenous genes Oct4, Sox2 and Klf4 (referred to as Oct4 tg, Sox2 tg and Klf4 tg) were all silenced in iPS-MBMCs lines after 10 passages, as shown by RT-PCR assays using primer sets specifically designed to amplify the transgenes' mRNAs (Fig 3B). The transcript levels of the three iPS-MBMCs lines were evaluated by qRT-PCR. Robust transcript levels of the pluripotency-associated genes Oct4, Nanog, Dnmt3b, Sox2, Rex1 and Dppa5 (Figure 3D) were observed, comparable to that of the H9 hES cell line and distinct from that of MBMCs.

In order to verify the developmental capabilities of iPS-MBMCs, we generated embryoid bodies (EBs) from all three iPS-MBMCs lines. In Figure 4A and 4B, it can be seen typical round-shaped EBs formed after 5 days in suspension culture . After 14 days, the expression of differentiation- specific genes was analyzed by RT-PCR. As shown in Figure 4C, transcripts from germ layer- specific marker genes were detected in the EBs, indicating differentiation to cell types from all three embryonic germ layers. In addition, immunostaining assays (Figure 4D) show clearly the presence of Nestin (ectoderm), smooth muscle Actin (mesoderm) and  $\alpha$ -Fetoprotein (endoderm) in the EBs. These results indicate that iPS-MBMCs possess the ability to differentiate into cell types from all three germ layers in vitro.

Due to the fact that typical hES-like colonies appeared very early in our reprogramming experiments (Figure 1C), we investigated whether these early iPS-MBMCs colonies (10 days post-transduction) already possessed some of the pluripotency-associated characteristics. If confirmed this would represent an even more reduced time in iPSC generation. We therefore carried out immunocytochemistry staining for Oct4, Nanog and Tra-1-60 in 10 days post-transduction iPS-MBMC colonies. As can be seen in Figure 5A, these three pluripotency-associated proteins could be detected at the correct subcellular localization. Moreover, to verify whether the transcript levels of the two major pluripotency-associated genes Oct4 and Nanog in the 10 days post-transduction iPS-MBMCs are similar to that of the 17 days post-transduction iPS-MBMCs (time at which we usually picked-up colonies from the plates), we measured by qRT-PCR the transcript level kinetics of these genes during the reprogramming procedure. Figure 5B shows Nanog and Oct4 transcript levels in total RNA extracted from iPS-MBMCs 0, 5, 10 and 17 days post-transduction and from hES cell line H9. Transcript levels at 0 day correspond to that of MBMCs. As can be seen in Figure 5B, there is a sharper increase in both Nanog and Oct4 transcript levels between 5 and 10 days of the reprogramming procedure. Also, transcript levels at 10 days post-transduction are not much lower than those at 17 days post-transduction or than those showed by the hES cell line H9. These results suggest that reprogramming to pluripotency may occur before 17 days post-transduction.

In this study we report the rapid and efficient generation of iPSCs from human menstrual blood-derived mesenchymal cells (hMBMCs) by the ectopic expression of Oct4, Sox2 and Klf4 genes. Established iPS-MBMC lines were obtained as fast as 15 to 17 days after the first transduction and successfully characterized as pluripotent cells. Our data indicates that this period could be further reduced to at least 10 days after transduction, since the cells already showed pluripotent characteristics. This makes hMBMCs, together with human keratinocytes (also reported to be reprogrammed in 10 days [2]), the fastest cell types to reprogram. In routine reprogramming experiments it is desirable to shorten the time needed for isolation of the individual iPS colonies due to the limited time in which MEF cells are adequate as feeder cells, usually one week after inactivation. Moreover, the reprogramming efficiency of about 2-5% of hMBMCs, is 200-500 fold higher than that of human fibroblasts [1]. Even though c-Myc is thought to accelerate

nuclear reprogramming in fibroblasts, it is not necessary for efficient reprogramming of hMBMCs.

The molecular basis for the speed and efficiency of hMBMCs nuclear reprogramming is unclear. It is possible that the endogenous expression of some of the core ES marker genes, particularly those used for the transduction experiments, could make these cells more prone to nuclear reprogramming. It has also been described that a more relaxed chromatin structure is associated with regulatory elements of hES core genes in mesenchymal stromal cells [14, 15]. In any case, understanding the underlying mechanisms for the fast and efficient reprogramming of hMBMCs may shed some light on the molecular events governing nuclear reprogramming.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank César Félix Schmidt and Cláudio Nunes Pereira for technical assistance. The present work was supported by Grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and DECIT - Ministério da Saúde, Brazil.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

D.C.R., E.R., R.S., R.C.G., A.C.C. and T.P.U. conceived the project, designed experiments and wrote the manuscript. D.C.R, K.A.D., L.V. and R.L.A.P. designed and carried out experiments.

## **LEGENDS**

Figure 1 (a) Pluripotency-associated gene expression in MBMCs. MBMCs were used for total RNA extraction and RT-PCR assays, H9 cell line were used as positive control. Amplified products were analyzed in 2% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. The RT (+) and (-) samples refers to the presence or absence of reverse transcriptase in transcriptase reaction, respectively. (b) Experimental outline of MBMCs nuclear reprogramming by the ectopic expression of Oct4, Sox2 and Klf4 genes. On day -3, Phoenix Ampho pack cells were transfected with pMXs vectors; 48 and 96 hours later (day -1 and day 1), the retrovirus-containing supernatant were mixed and concentrated to transduce the

MBMCs. On day 3 (d3), the transduced MBMCs were trypsinized and split to iMEF cells plate. The following day (d4) the medium was changed to the human embryonic stem cell medium containing bFGF (HuES+bFGF). (c) Morphology of iPS-MBMCs colonies during reprogramming. Phase-contrast micrographs of representative iPS-MBMCs colonies show morphology comparable to that of hES and distinct from that of parental MBMCs. The kinetics of colony formation shows that the colonies begin to appear as early as 5 days after the first retroviral transduction of MBMCs. After 15 to 17 days, typical iPS-MBMCs colonies were selected for the first manual passage (arrows). (d) Alkaline phosphatase activity staining demonstrates the ES-like feature of iPS-MBMCs colonies. The estimated efficiency of reprogramming is 2-5 days.

Figure 2 Phenotypic characterization of iPS-MBMC clones. (a) Phase-contrast micrographs of clones 1, 3 and 7 show that they have typical hES morphology. (b) Alkaline phosphatase staining showing the ES-like feature of the three iPS-MBMCs clones. (c) Immunocytochemistry of iPS-MBMCs colonies, counterstained by DAPI (blue), confirmed the presence of the ES cell markers TRA-1-60, SSEA-4, Nanog and Oct4 throughout the colonies.

Figure 3 Molecular characterization of iPS-MBMCs. (a) RT-PCR analysis of endogenous transcript profiles shows that an iPS-MBMC clone exhibits a similar profile to that of the hES cell line H9. Gapdh amplification was used as internal control. (b) Retroviral transgene silencing in iPS-MBMCs. Transgene-specific primers were used to detect the exogenous Oct4, Sox2 and Klf4 transcripts. (c) Quantification of transcript levels of pluripotency markers in iPS-MBMC. qRT-PCR was used to evaluate transcript levels of Oct4, Nanog, Dnmt3b, Sox2, Rex1 and Dppa5 in the three iPS-MBMC

lines compared to that of the parental MBMC. H9 ES cells were used as calibrator sample and reactions were normalized to that of  $\beta$ -Actin transcript.

Figure 4 Functional characterization of iPS-MBMCs. (a) Phase-microscopy of EBs after 5 days in suspension culture. (b) Typical cystic EBs. (c) RT-PCR analysis to detect transcripts from endoderm-, mesoderm- and ectoderm-specific genes: Afp, Brachyury and Nestin, respectively. Gapdh was used as internal control. (d) Immunostaining showing expression of the lineage markers Nestin (ectodermal),

smooth muscle Actin (mesodermal) and  $\alpha$ -fetoprotein (endodermal) in iPS-MBMCs clones subjected to differentiation.

Figure 5 Phenotypic and molecular characterization of 10-day iPS-MBMC colonies. Colonies formed 10 days after transduction were analyzed for the presence of typical ES cell markers. (a) Immunostaining assay of iPS-MBMC colonies, counterstained by DAPI (blue), shows the expression of Oct4 (red) and Nanog (red) transcription factor genes throughout the colony nucleus, as well as surface marker TRA-1-60 (green). (b) qRT-PCR analysis of endogenous Oct4 and Nanog transcript level kinetics during nuclear reprogramming. Levels detected at day 0 were used as calibrator samples and reactions were normalized to that of  $\beta$ -Actin transcript.

#### **METHODS:**

Derivation of hMBMCs. Menstrual blood samples were collected from healthy young donors, 24 hours after the beginning of menses, in 5 mL of 1x CMF, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 5 mM EDTA. Mononuclear cells were fractionated in Ficoll (Histopaque 1077) and maintained in DMEM-High Glucose medium (1g/L) supplemented with 20% FBS, 2 mM L- glutamin, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. Reprogramming experiments were carried out using third or fourth passage cells. The mesenchymal nature of the cells was demonstrated by flow cytometry and differentiation assays. Experiments were approved by our local institutional review board (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, protocol no 056/09).

hMBMCs Reprogramming and Maintenance of Undifferentiated iPS-hMBMCs. Reprogramming experiments were carried out by pseudo-typed retroviral transduction of Oct4, Sox2 and Klf4 transcription factor genes using standard protocols [1]. Briefly, Phoenix Ampho Pack cells (Orbigen) were transfected separately with each of the recombinant retrovirus vectors pMX-Oct4, pMX-Sox2 and pMX-Klf4 (Addgene, Cambridge, MA, USA) using Fugene-6 transfection reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA). The combined retroviral-containing supernatants were filtered in 0.22  $\mu$ m low protein binding filters (Millipore) and concentrated by

ultracentrifugation (45,000g 4°C 1h30 minutes) and used to transduce hMBMCs, which were subsequently maintained over a MEF feeder layer. Fifteen to seventeen days after transduction, colonies were picked up, mechanically dissociated into small clumps, and plated on MEF feeder cells. Derived iPS-MBMCs and H9 ES cells (WiCell - used as positive controls) were maintained either on MEF feeder layer or on Matrigel-coated tissue culture dishes (ES qualified; BD Biosciences) with mTESR-1 hES Growth Medium (Stemcell Technology).

RT-PCR and qRT-PCR analysis. Total RNA was extracted from cell lines using RNeasy Plus Kit (Qiagen). cDNA synthesis were performed using the High Capacity Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems) using 0.5 µg of total RNA. Specific primer pairs were designed to span introns and avoid eventual detection of DNA contaminant (table 1). RT-PCR reactions were conducted in a 50 µL reaction mixture containing 2µL of each 10x diluted cDNA reaction volume, 1x PCR Buffer (Invitrogen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 µM of each forward and reverse primer, and 1U of Platinum Taq Polymerase (Invitrogen). The amplification conditions were denaturing at 95°C for 5 min, 30 cycles of denaturing at 95°C for 1 min, annealing at 56°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 10 min. Real-Time PCR amplifications were carried out using the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The amplification reactions were performed in triplicate in 96-well plates in 25 µl final volume that contained 1µl of 10x diluted cDNA reaction volume, 12.5 µl of 2x Power SYBR Master Mix (Applied Biosystems) and 150 nM of each primer, forward and reverse (table 1). The amplification conditions were 55°C for 2 min, 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 30s and 58°C for 1 min. qRT-PCR efficiency and specificity were evaluated using serial dilutions of the template cDNA, and melting curve data. Transcript levels of the target genes were normalized using β-Actin as internal control. Relative gene-specific transcript levels were calculated by the 2<sup>-(ΔΔCt)</sup> method determined by the Applied Biosystems SDS 7500 software v1.4.

Alkaline Phosphatase (AP) Staining and Immunocytochemistry Fluorescence Analysis. iPS- MBMC colonies were AP stained with Alkaline Phosphatase Detection Kit (Millipore). For immunocytochemistry, cells grown on Matrigel-coated coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature. After 3 washes in 10 mM

phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, cells were incubated in PBS with 5% normal goat serum (Invitrogen) and 0.3% Triton-X100 for 30 minutes at room temperature. Cells were then incubated overnight at 4°C with anti-Oct4, anti-Nanog, anti-ASM, anti-AFP, anti-TRA1, anti-SSEA or mouse anti-Nestin (1:200; Millipore) antibodies in PBS with 0.3% Triton. After washing, secondary antibody Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1,000; Jackson, West Grove, PA, USA) in PBS 0.3% Triton-X 100 was added and the cells were incubated for 2 hours at room temperature. Following 3 washes with PBS, nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma) for 3 minutes and the coverslips were mounted on slides using PPD (2,5-Diphenyl-1,3,4-oxadiazole; Sigma). Fluorescence images were recorded using a digital camera attached to an inverted microscope (Carl Zeiss Apotome; Zeiss, GmbH, Germany).

**EB Formation and in vitro Differentiation.** For EB formation, iPS-MBMC colonies were harvested by digestion with collagenase IV (Invitrogen). The cell clumps were transferred to poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-coated dishes in DMEM/F12 containing 20% knockout serum replacement (KSR), 2 mM L-glutamine, 0.1 mM nonessential amino acids, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, and 0.5% penicillin and 0.5% streptomycin (all from Invitrogen). The medium was changed every two days. After 8 days as a floating culture, EBs were transferred to gelatin-coated plates and cultured in the same medium for another 8 days.

## REFERENCES

1. Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872 (2007).
2. Aasen, T. et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26, 1276–1284 (2008).
3. Kim, J.B. et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649–643 (2009).
4. Loh, Y.H. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113, 5476–5479 (2009).
5. Ye, Z. et al. Human induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 113, 5473–5480 (2009).

6. Haase, A. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 5, 434–441 (2009).
7. Kim, J.B. et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454, 646–650 (2008).
8. Kim, J.B. et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136, 411–419 (2009).
9. Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., & Lalykina, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393–403 (1970).
10. Dominici M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317 (2006).
11. Oda, Y. et al. Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem.* 17 29270-29278 (2010).
12. Cai, J. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem.* 9, 11227-11234 (2010).
13. Kunisato, A. et al. Generation of induced pluripotent stem cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells. *Stem Cells Dev.* 19, 229-38 (2010).
14. Kang, M.I. et al. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J Cell Biochem.* 102, 224–239 (2007).
15. Noer, A., Sorensen, A.L., Boquest, A.C., & Collas, P. Stable CpG hypomethylation of adipogenic promoters in freshly isolated, cultured, and differentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Mol Biol Cell.* 17, 3543–3556 (2006).

