

# Isolamento de células osteoprogenitoras derivadas de sangue de cordão umbilical humano: um candidato promissor para terapias celulares para o reparo ósseo

Isolation of human umbilical cord blood-derived osteoprogenitor cells: a promising candidate for cell-based therapy for bone repair

Igor Iuco Castro-Silva<sup>1</sup>, Letícia de Oliveira Castro<sup>2</sup>, Janaína José dos Santos Machado<sup>3</sup>, Maria Helena Alves Nicola<sup>3</sup>, José Mauro Granjeiro<sup>4</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial osteogênico de células osteoprogenitoras de sangue de cordão umbilical humano e provar sua aplicabilidade como candidato promissor para terapias celulares de reparo ósseo. **Métodos:** Culturas primárias de células aderentes de sangue de cordão umbilical humano foram expandidas *in vitro* até a passagem 2 e semeadas para estudo de osteodiferenciação. Análises morfológicas (microscopia de luz), citotóxicas (método de Von Kossa), e funcionais (dosagem de cálcio, atividade de fosfatase alcalina e conteúdo total de proteína na cultura celular) foram conduzidas em 7, 14, 21, e 28 dias após o protocolo de osteoindução. **Resultados:** A fase proliferativa demonstrou unidades formadoras de colônia em 7 dias. Após osteoindução, a morfologia celular cuboidal similar a osteoblastos em 14 dias e nódulos de mineralização e mudanças bioquímicas (aumento do nível de fosfatase alcalina e depósitos de cálcio) em 21 dias confirmaram o processo de osteodiferenciação. **Conclusões:** A cultura celular de sangue de cordão umbilical humano é uma técnica segura, constituindo-se uma fonte alternativa de células osteoprogenitoras para usos experimentais. Mais testes em animais e ensaios clínicos devem ser conduzidos para validar seu uso e estabelecer controle de qualidade de futuras terapias celulares autólogas ou alogênicas objetivando o reparo ósseo.

**Descritores:** Cordão umbilical; Sangue fetal; Cultura celular; Osteogênese; Terapia tecidual; Regeneração óssea

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the osteogenic

potential of human umbilical cord blood-derived osteoprogenitor cells and to prove its applicability as a promising candidate for cell-based therapeutics for bone repair. **Methods:** Primary cultures of human umbilical blood cord adherent cells were expanded *in vitro* until passage 2 and seeded for osteodifferentiation study. Morphological (light microscopy), cytochemical (Von Kossa's method), and functional analyses (calcium level, alkaline phosphatase activity, and total protein content in cell culture) were carried out 7, 14, 21, and 28 days after the osteoinduction protocol. **Results:** The proliferative step showed colony-forming units in 7 days. After osteoinduction, cuboidal cellular morphology similar to osteoblasts at 14 days and mineralization nodules and biochemical changes (increased alkaline phosphatase level and calcium deposits) at 21 days confirmed the osteodifferentiation process. **Conclusion:** Cell culture of human umbilical blood cord is a reliable technique, constituting itself as an alternative source of osteoprogenitor cells for experimental needs. More animal tests and clinical trials must be carried out to validate its use and to establish quality control of future autologous or allogeneic cell-based therapy aimed at bone repair.

**Keywords:** Umbilical cord; Fetal blood; Cell culture; Osteogenesis; Tissue therapy; Bone regeneration

## INTRODUÇÃO

Devido ao crescente aumento na expectativa de vida da população mundial nas últimas décadas, as lesões traumáticas, degenerativas e crônicas do sistema musculoesquelético representam um problema socioeco-

Trabalho realizado no Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói (RJ), Brasil.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói (RJ), Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Química, Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói (RJ), Brasil.

<sup>3</sup> Cryopraxis Cryobiologia – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Metrologia, Padronização e Qualidade Industrial – DIPRO-INMETRO, Duque de Caxias (RJ), Brasil.

Autor correspondente: Igor Iuco Castro-Silva – Rua Marques do Parana, 303 – Prédio da Emergência – 4º Andar – Centro – CEP 24030-210 – Niterói (RJ), Brasil – Tel.: 21-2629-9255 – Email: igoriuco@gmail.com

Data de submissão: 7/7/2011 – Data de aceite: 16/11/2011

Conflito de interesse: não há

nômico expressivo<sup>(1)</sup>. A despeito do grande progresso no desenvolvimento de substitutos ósseos, ainda não há um biomaterial ideal capaz de imitar as propriedades naturais de células osteoformadoras viáveis<sup>(1,2)</sup>. Dessa forma, a bioengenharia usa células isoladas ou células associadas a carregadores para substituir funções específicas, com a intenção de criar tecidos duros autólogos ou alogênicos no laboratório, juntamente com possíveis agentes terapêuticos<sup>(3,4)</sup>. Os avanços técnicos em biologia celular e molecular possibilitaram a coleta de células precursoras de osteoblastos (células-tronco mesenquimais – MSC, e células osteoprogenitoras - OPC), e sua diferenciação em tecido ósseo, a partir de uma ampla variedade de tecidos humanos, como aspirado de medula óssea, osso esponjoso, gordura, músculo, periósteo, sinóvia, polpa dental, sangue periférico, derme e cordão umbilical<sup>(1,4,5)</sup>.

As células estromais derivadas de sangue de cordão umbilical humano (SCUH) testadas para fins de medicina regenerativa podem ser expandidas *ex vivo* sem perder suas propriedades biológicas favoráveis, como autorrenovação, aderência a recipientes de plástico, expressão de antígenos de superfície (CD105+/CD45-)<sup>(6)</sup>, alta plasticidade (multidiferenciação em osteoblastos, condroblastos, adipócitos, neurônios, mioblastos, queratinócitos, endotélio, hepatócitos, células secretoras de insulina)<sup>(1,7-9)</sup>, atividade imunomodulatória (supressão de rejeição de aloenxerto celular)<sup>(8,10)</sup> e mantêm sua viabilidade após armazenagem a longo prazo por criopreservação<sup>(11)</sup>. A capacidade osteogênica de células SCUH pode ser demonstrada *in vitro* pela diferenciação em osteoblastos ativos quando há estimulação adequada em um carregador de monocamada ou tridimensional com base no fosfato de cálcio<sup>(12,13)</sup> e, *in vivo*, pelo osso ectópico em um sítio subcutâneo<sup>(13)</sup> e reparo ósseo realçado de defeitos de tamanho crítico em calvárias<sup>(14)</sup> e fêmur<sup>(12)</sup> de ratos. Todavia, a dificuldade em produzir culturas e a grande heterogeneidade dos resultados (morfologia, taxas de crescimento, e dados de potencial diferenciação) de células de SCUH são notáveis<sup>(7,11,15)</sup>. As evidências desse comportamento podem ser encontradas em um estudo com 25 doadores de células de SCUH, em que houve isolamento bem sucedido em apenas duas amostras, uma com uma cultura de células que apresentava proliferação e pluripotência normais e a outra, com o desenvolvimento de linhagens aneuploides e osteogênese diminuída *in vitro*<sup>(16)</sup>.

## OBJETIVO

Considerando que estudos prévios apontaram a capacidade controversa de osteodiferenciação e a deman-

da por uma fonte promissora em terapêutica baseada em células para o reparo ósseo, o objetivo deste estudo preliminar *in vitro* foi realizar uma avaliação morfológica, citoquímica e funcional do potencial osteogênico de SCUH-OPC.

## MÉTODOS

### Isolamento e expansão celular

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal Fluminense (registro CEP-UFF 56/07, Niterói, Brasil) e realizado mediante consentimento prévio dos doadores. Uma equipe de enfermeiros (Cryopraxis, Rio de Janeiro, Brasil) colheu o SCU de feto a termo, de cinco grávidas híginas (20 a 28 anos de idade) no Hospital ProMatre (Rio de Janeiro, Brasil).

Todas as amostras frescas de SCU, em tubos Falcon de 50 mL, passaram por um processo de separação celular com Ficoll-PaquePlus (Histopaque™ - GE Healthcare, Rio de Janeiro, Brasil; densidade = 1,077 g/mL) e centrifugação (671 x g, 30 min, em temperatura ambiente). As células monocelulares foram coletadas e colocadas novamente em suspensão em meio RPMI com Hepes e albumina 5%, transferidas em temperatura fria para o laboratório e processadas até 24 horas após o nascimento. Houve centrifugação adicional (671 x g, 15 min, em temperatura ambiente) e nova suspensão em  $\alpha$ -MEM com 2 mM de L-glutamina, soro bovino fetal (Gibco-Invitrogen, São Paulo, Brasil) a 20% e 100  $\mu$ g/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), com armazenamento em recipientes de plástico de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, São Paulo, Brasil) a 37°C, 5% de pressão CO<sub>2</sub>, e 95% de atmosfera úmida. A cada 2 dias, o meio de cultura contendo células não aderentes foi cuidadosamente removido e centrifugado; o *pellet* foi misturado a um meio completo fresco e a suspensão de células foi devolvida ao seu recipiente anterior. Aproximadamente 1 semana após a incubação, apareceram colônias aderentes bem definidas e parecidas com fibroblastos. A subcultura ocorreu em cerca de 80% de confluência em monocamada aos 28 dias, quando a cultura celular foi retirada usando 0,25% tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Após 14 dias, as células estavam quase confluentes e uma nova subcultura foi feita até a osteoindução. O uso do método de exclusão com Trypan blue (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e a câmara Neubauer de contagem permitiram a análise de viabilidade das células, a seguir: NC x D x 10<sup>4</sup>/Q, onde NC = número de células viáveis, D = diluição da amostra, Q = quartos da câmara Neubauer de contagem.

## Desenho experimental de osteoindução

Após a expansão, as células SCUH-MSC ( $1,0 \times 10^5$  células/mL) na passagem 2 foram semeadas em placas com 24 poços (Corning Inc., Califórnia, Estados Unidos) em  $\alpha$ -MEM enriquecido com soro bovino fetal a 20%. Após 96 horas, com 80% de confluência máxima, as células foram tratadas com uma solução osteogênica bem definida<sup>(1)</sup> contendo 20 nM de dexametasona (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), e 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (DAG)<sup>(4,6)</sup>. O meio osteogênico foi trocado a cada dois dias. Essas células foram monitoradas por períodos de tratamento bem definidos quanto à diferenciação osteoblástica *in vitro*<sup>(1)</sup>, em 7, 14, 21, e 28 dias.

Para cada cinco amostras de SCUH, cinco experimentos independentes (análise morfológica, detecção citoquímica de nódulos de mineralização, dosagem de cálcio, atividade de fosfatase alcalina, e conteúdo proteico total) foram feitos segundo os períodos de tratamento correspondentes, usando três réplicas cada ( $n = 300$ ).

## Análise morfológica

Fotomicrografias foram obtidas usando microscópio invertido (contraste de fase) Labomed TCM 400 (Feldmann Wild Leitz, Manaus, Brasil) e documentadas com uma câmera digital Canon Powershot A310 3.2 Mp (Canon, Califórnia, Estados Unidos).

## Detecção citoquímica de nódulos de mineralização

Para detectar a capacidade de SCUH de mineralizar a matriz extracelular na forma de nódulos mineralizados, foi usada a coloração de von Kossa. Resumidamente, a camada de células foi fixada por formalina a 10% (10 min) e rigorosamente lavada com PBS (10 min). A seguir, foi adicionado nitrato de prata a 5% seguido da exposição à luz ultravioleta por 60 min. A camada de células foi novamente lavada com PBS (três vezes), imersa em tiosulfato de sódio a 5% por 3 min, corado com safranina a 0,5%. A análise citoquímica foi feita usando microscópio invertido (contraste de fase), Labomed TCM 400 (Feldmann Wild Leitz, Manaus, Brasil), e as fotomicrografias foram documentadas com uma câmera digital Canon Powershot A310 3.2 Mp (Canon, Califórnia, Estados Unidos).

## Dosagem de cálcio

Foi utilizado um *kit* comercial (Enzipharma, São Paulo, Brasil) para quantificar a presença de cálcio no sobrenadante (ou cálcio livre) ou no precipitado (cálcio aprisionado) da cultura celular. Em cada período do

experimento, o meio de cultura (sobrenadante) ou a camada de células (precipitado) foi coletado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em microtubos (Eppendorf™, Campinas, Brasil). A seguir o precipitado, camada contendo células e a matriz extracelular, foi digerido em 0,5 M de HCl durante 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  e congelado até o momento da dosagem. As amostras foram lidas no leitor de microplacas-espectrofotômetro (Beckman Coulter, Califórnia, Estados Unidos) no comprimento de onda de 560 nm usando o cálcio como padrão de referência. O branco para a máquina foi água destilada (para o meio) e HCl 0,5 M (para o precipitado).

## Atividade da fosfatase alcalina

Em cada período experimental, o meio de cultura foi coletado (1mL), transferido para um microtubo (Eppendorf™, Campinas, Brasil) e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação da atividade da fosfatase alcalina. Resumidamente, alíquotas de 100  $\mu$ L foram adicionadas ao meio da reação para a determinação da atividade enzimática usando um *kit* comercial (Enzipharma, São Paulo, Brasil). Depois de 10 minutos de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , foram adicionados 100  $\mu$ L de 1,0 M NaOH, interrompendo a reação. A densidade óptica foi medida no leitor de microplaca-espectrofotômetro (Beckman Coulter, Califórnia, Estados Unidos) na frequência de ondas de 405 nm.

## Proteína total

O conteúdo de proteína total no sobrenadante da cultura celular foi determinado em todas as amostras usando o método de Bradford conforme proposto pelo fabricante (Bio-Rad kit™ - Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos). O meio de cultura foi coletado (1 mL), transferido a um microtubo (Eppendorf™, Campinas, Brasil) e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para determinação posterior da proteína total. Resumidamente, alíquotas de 20  $\mu$ L foram adicionadas ao meio de reação (1 mL) para a determinação da concentração de proteína solúvel. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida e a densidade óptica foi medida no leitor de microplacas-espectrofotômetro (Beckman Coulter, Califórnia, Estados Unidos) na frequência de ondas de 405 nm.

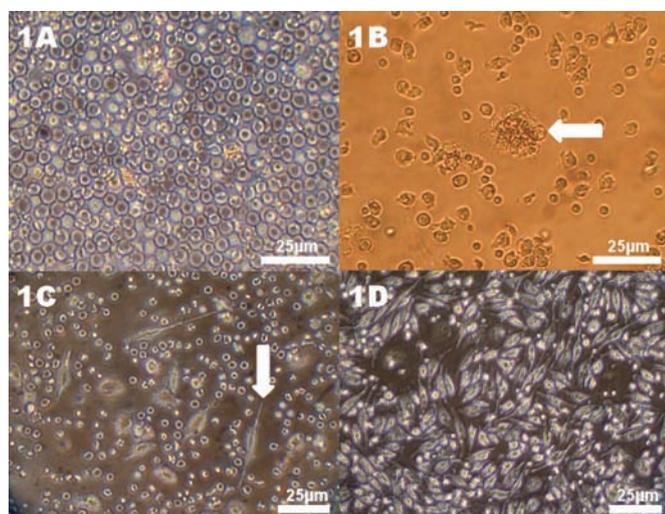
## Análise estatística

Os resultados bioquímicos foram mostrados em gráficos representando a média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados de cada ensaio foram analisados com software InStat 3.10 (GraphPad Inc., Califórnia, Estados Unidos) usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e o teste de comparações múltiplas de Dunn como pós-teste.

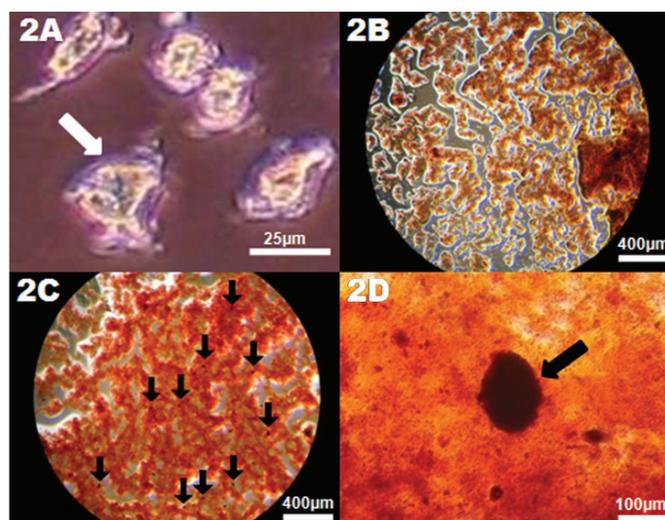
## RESULTADOS

### Análise morfológica

A cultura primária de SCUH foi inicialmente caracterizada como sendo composta de células arredondadas e mononucleares (Figura 1A) com adesão lenta a recipientes plásticos, aos 7 dias, durante a expansão *in vitro* (Figuras 1B e 1C) e que alcançavam confluência em 28 dias, adotando um fenótipo mesenquimal semelhante ao de fibroblasto (Figura 1D). A subcultura de células SCUH diminuiu em metade do tempo da confluência celular para 14 dias. Após o processo de semeadura para o ensaio de osteogênese, 80% de confluência foi



**Figura 1.** Etapa proliferativa na cultura primária de células SCUH. (A) Células mononucleares arredondadas e não aderentes, em 1 dia, (B) Unidade formadora de colônia aderente (seta preta) em 7 dias, (C) Células semelhantes a fibroblastos aderentes (seta branca) em 7 dias e (D) Monocamada de células confluentes, 28 dias



**Figura 2.** Análise morfológica do processo de osteodiferenciação. (A) Células com formato cubóide (seta branca), 14 dias após contato com o meio osteoindutor. (B-D) Coloração Von Kossa, sem formação de nódulos ósseos em 14 dias (B) ou demonstrando presença múltipla de pequenos nódulos de mineralização (setas pretas) em 21 dias (C-D)

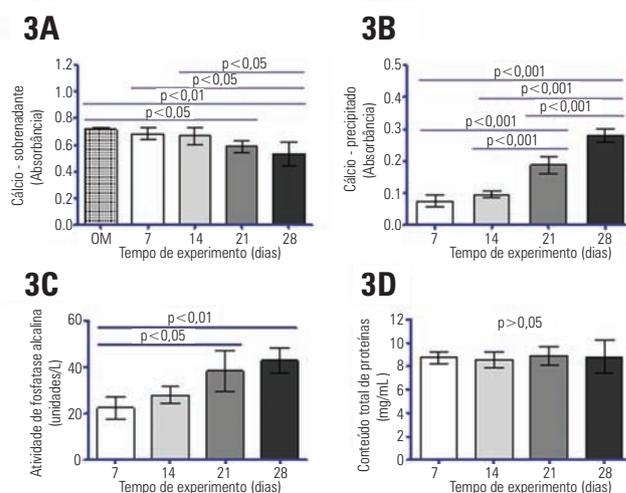
obtida apenas em 4 dias, confirmando a expansão mais demorada dessas células imaturas derivadas de SCUH. Algumas unidades formadoras de colônias estromais aderentes (CFU) (Figura 1B) foram evidentes após 7 dias em expansão e poderiam sugerir ninhos de células tronco mesenquimais clonogênicas. A alteração fenotípica de células fibroblastóides ou indiferenciadas (Figuras 1C e 1D) para morfologia poliédrica ou cuboide semelhantes a osteoblastos (Figura 2A) ocorreu após 14 dias de osteoindução.

### Análise citoquímica

A osteoindução na cultura de células SCUH até 14 dias (Figura 2B) não exibiu sinais positivos de biomineralização. Entretanto, múltiplos nódulos mineralizados pequenos e corados de preto foram observados pelo método de von Kossa após 21 dias de osteoindução na cultura de SCUH-OPC (Figuras 2C e 2D), continuando o seu aumento em número e tamanho aos 28 dias.

### Análise funcional

Todos os achados bioquímicos ajudaram a corroborar o processo de osteodiferenciação e nenhuma diferença significativa foi observada entre os doadores de células SCUH para cada período de tratamento ( $p > 0,05$ ). Em comparação com o meio puro osteoindutivo, o nível de cálcio no sobrenadante da cultura celular declinou em 21 dias (absorbância:  $0,59 \pm 0,02$ ;  $p < 0,05$ ) e, de forma mais significativa, em 28 dias (absorbância:  $0,53 \pm 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 3A). Por outro lado, o nível de cálcio no precipitado representado pelas células



**Figura 3.** Análise funcional do processo de osteodiferenciação de SCUH-OPC com 7, 14, 21 e 28 dias. (A) Nível de cálcio em sobrenadante de cultura celular em comparação com o meio osteogênico (MO), (B) Nível de cálcio em precipitado de cultura celular, (C) Atividade de fosfatase alcalina e (D) Conteúdo total de proteínas no sobrenadante de cultura celular

aderentes e sua matriz extracelular aumentou durante o mesmo período de 21 dias (absorbância:  $0,19 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ) e obteve o maior valor em 28 dias em comparação com todos os períodos experimentais (absorbância:  $0,28 \pm 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 3B). A atividade da fosfatase alcalina teve um crescimento significativo durante o período de 21 dias ( $38,31 \pm 4,44$  U/L;  $p < 0,05$ ) até 28 dias ( $42,88 \pm 2,75$  U/L;  $p < 0,01$ ) (Figura 3C). O conteúdo total de proteína se manteve inalterado durante os períodos experimentais em todas as amostras de SCUH-OPC ( $p > 0,05$ ) (Figura 3D), salientando, assim, a expressão particular de fosfatase alcalina na osteogênese *in vitro*.

## DISCUSSÃO

Há um grande esforço para introduzir a terapia celular como uma opção para pacientes com defeitos ósseos. A coleta de células de SCU, uma rica fonte de células-tronco hematopoéticas com benefícios práticos e éticos, representa um método não invasivo alternativo à coleta de MSC de medula óssea<sup>(3,11,16)</sup>, embora também exiba desafios específicos para a regeneração óssea<sup>(1)</sup>.

As culturas de células de SCUH são notoriamente heterogêneas em função da qualidade de preparados de laboratório, incluindo amostras de tecido fresco, meios de cultura celulares, presença de soro animal, citocinas, densidade celular, número de passagens mediante cultura e indução osteogênica<sup>(9,11,15)</sup>. Condições ótimas em culturas de células SCUH incluem um volume mínimo aspirado de 33 mL, tempo da coleta até o isolamento de menos de 15 horas, e uma alta concentração inicial de células ( $1,0 \times 10^6$ - $10^8$  células)<sup>(4,5,17)</sup>. É realizada a cocultura inicial de material hematopoético e MSC derivados de SCUH (populações de células osteoprogenitoras e células aderentes aparecem após 3 a 5 semanas *in vitro*)<sup>(4,11,18)</sup>. A clonogenicidade de células de SCUH é determinada pela presença de CFU<sup>(4)</sup> e a frequência da variação de MSC de 0 a 2,3 clones por  $1,0 \times 10^8$  células<sup>(5)</sup>. A cultura primária de SCUH demorou a atingir a confluência, de 34 dias (passagem 1) até 55 dias (passagem 1-2) subsequentes em função da presença de células mais imaturas<sup>(1)</sup>. Uma vez estabelecida, a cinética de proliferação de células SCU não diferiu de maneira significativa daquela de medula óssea, resultando em 20 duplicações de população dentro de 8 passagens<sup>(5)</sup>, até mais de 50 duplicações de população após 15 semanas<sup>(4)</sup>, assim como sua capacidade de multilinhagens<sup>(3,5,16)</sup>. Diferentes meios de cultura incluindo  $\alpha$ -MEM, DMEM, e MSCGM (suplemento de crescimento SingleQuot), enriquecido com soro fetal bovino a 10 a 15% ou lisado de plaquetas humanas e mistura osteogênica (DAG) em combinação com ou sem BMP-2 (10-7M) podem levar a uma grande quantidade de Cbfa1/Runx2, colágeno I<sup>(1,6,19)</sup>, fosfatase alcalina, matriz extracelular mineralizada<sup>(1,6,7,19)</sup>, osteocal-

cina, osteonectina, osteopontina, vimentina, sialoproteína óssea, fator de crescimento fibroblástico-2 e fator de crescimento endotelial vascular, dentre outros marcadores ósseos em culturas celulares de SCU ao longo de 21 dias de diferenciação osteoblástica<sup>(1,6)</sup>. A exposição precoce a um meio com suplementos osteogênicos e plasma humano aumentou de maneira marcada o crescimento celular estromal e a taxa de diferenciação osteogênica, sugerindo que SCU de feto a termo possa agir como uma fonte adequada de OPC, o que terá um impacto significativo sobre o desenvolvimento de constructos ósseos autólogos produzidos pela engenharia de tecidos<sup>(2)</sup>. Esses protocolos corroboram nossa boa experiência usando um volume de amostra adequado (40 a 50 mL de SCUH), meio de cultura (RPMI para a co-cultura inicial de células hematopoéticas e mesenquimais, e  $\alpha$ -MEM com soro bovino fetal a 20% para proliferação mesenquimal e proliferação de OPC), e DAG no passo de osteoindução. Além disso, a similaridade morfológica de células SCUH que haviam passado por criopreservação por 0,1 a 5 anos com amostras frescas<sup>(7,11)</sup> e seu armazenamento de rotina em bancos biológicos poderiam salientar o valor clínico imediato de SCUH<sup>(20)</sup>.

Entretanto, o isolamento e a expansão celulares têm tido mais sucesso usando amostras de medula óssea (10:10)<sup>(9)</sup>, tecido adiposo (10:10)<sup>(21)</sup> e matriz de cordão umbilical (MCU) [8:8<sup>(9)</sup> ou 10:10<sup>(20)</sup>], em comparação com as taxas variáveis nas amostras de SCU [10%<sup>(20)</sup>, 46%<sup>(4)</sup>, ou 63%<sup>(5,21)</sup>]. A frequência de CFU é a mais baixa em SCU, mas SCU-MSC pode ser cultivado por tempo mais longo e demonstra a maior capacidade proliferativa<sup>(21)</sup> por causa da imaturidade das células de recém-nascidos<sup>(1)</sup>, tornando-se assim um bom substituto para medula óssea, que tem um procedimento altamente invasivo e decresce em número de MSC e potencial de diferenciação com o aumento da idade<sup>(1,3,10,21)</sup>. Além disso, as células SCU-MSC expandidas *in vitro* retêm baixa imunogenicidade e um efeito imunomodulatório em linfócitos e células dendríticas maduras, o que é ideal para aplicações alogênicas no futuro<sup>(10)</sup>.

Nossos resultados, baseados em boas práticas laboratoriais e um protocolo proficiente, poderiam sugerir a presença de CFU durante a etapa de expansão de células SCUH e acompanhar seu processo bem definido de osteodiferenciação *in vitro*. Esse comportamento biológico particular poderia ser explicado pela morfologia celular cuboide que se assemelha a osteoblastos em 14 dias<sup>(1)</sup> e a presença de matriz óssea extracelular ao longo de 21 dias, detectada na análise citoquímica com típicos nódulos de mineralização, em culturas de osteoblastos<sup>(1,6,19)</sup> e na análise funcional com a manutenção do conteúdo de proteína total, sugerindo o estabelecimento de crescimento celular em direção a um processo de diferenciação, aumento de expressão da fosfatase alcalina<sup>(13,19)</sup>, e alterações no metabolismo de cálcio (decréscimo de nível

no sobrenadante e aumento de depósito em *pellets*) durante a etapa de osteoindução<sup>(1,14)</sup>. Dessa maneira, como uma fonte arquetípica de células osteoprogenitoras que podem ser colhidas, enriquecidas e expandidas *in vitro*, as células de SCUH foram descritas como significantes para a medicina regenerativa<sup>(11,15)</sup>.

Múltiplos estudos pré-clínicos testaram as SCUH em terapias baseadas em células para o reparo ósseo, mas raros estudos clínicos foram realizados<sup>(15)</sup>. As células de SCUH podem se aderir e espalhar com eficiência em estruturas baseadas em fosfatos de cálcio (hidroxiapatita/fosfato tricálcico)<sup>(2)</sup>, colágeno poroso<sup>(3,6)</sup>, colágeno/fosfato tricálcico<sup>(12)</sup>, ou ácido poli(láctico-ácido glicólico)/hidroxiapatita<sup>(13)</sup>. Além disso, elas podem continuar até a diferenciação osteoblástica<sup>(2,3,6)</sup>, promover osteogênese ectópica<sup>(13)</sup>, ou aumentar o reparo ósseo em defeitos de calvárias de ratos em até 78% em 12 semanas<sup>(14)</sup>. A capacidade de células SCUH de se diferenciarem em osteoblastos maduros quando cultivadas dentro de coágulos plasmáticos humanos sugere sua potencial aplicação em cirurgia ortopédica<sup>(3)</sup>. Curiosamente, um estudo clínico recente realizado em pacientes adultos com pseudoartrose óssea traumática, demonstrou que o autotransplante do osso ilíaco apresentou diferenças estatisticamente significantes com um tratamento baseado em células (células alogênicas estromais SCUH conjugadas a plasma autógeno rico em plaquetas e pó de osso desmineralizado) que exibiu a maior e mais rápida restauração tibiofemoral, diminuindo pela metade o tempo de união óssea (6 meses). Dessa forma, o papel específico da terapia celular com SCUH na restauração óssea e a bioatividade relacionada aos seus carregadores auxiliares merece uma investigação melhor<sup>(17)</sup>.

Considerando questões de segurança, disponibilidade, metodologia de transplante, rejeição e efeitos colaterais, argumenta-se que a terapêutica usando células de SCUH fornece um repositório confiável de células precursoras iniciais, e a presença confirmada de OPC neste trabalho encoraja seu uso como potencial fonte para protocolos de terapia celular para defeitos ósseos. A elucidação de aplicações não hematopoiéticas para SCUH facilitará o desenvolvimento de terapia celular pioneira relevante<sup>(8)</sup>. Ademais, o estudo de SCUH-OPC poderá fornecer novos modelos de pesquisa celular para a compreensão de malformações humanas e transtornos genéticos, além da possibilidade de testar os efeitos de diferentes drogas terapêuticas<sup>(20)</sup>.

## CONCLUSÃO

Poderíamos concluir que a cultura celular do sangue do cordão umbilical humano é uma técnica confiável que se estabelece como uma fonte alternativa de células osteoprogenitoras para necessidades experimentais. Mais testes

em animais têm de ser conduzidos para validar seu uso e para estabelecer o controle de qualidade de futuras terapêuticas baseadas em células autólogas ou alogênicas que visam a reparação óssea.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos especialmente a Dra. Mari Cleide Sogayar, diretora de Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) da Universidade de São Paulo (USP) pela sua colaboração e Cryopraxis, Silvestre Labs, FAPERJ, FINEP, CAPES, e CNPq (CT-Saúde, 55.2644/2005-6) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Jäger M, Zilkens C, Bittersohl B, Krauspe R. Cord Blood - An alternative source for bone regeneration. *Stem Cell Rev*. 2009;5(3):266-77.
- Hutson EL, Boyer S, Genever PG. Rapid isolation, expansion, and differentiation of osteoprogenitors from full-term umbilical cord blood. *Tissue Eng*. 2005;11(9-10):1407-20.
- Barachini S, Trombi L, Danti S, DAlessandro D, Battolla B, Legitimo A, et al. Morpho-functional characterization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood for potential uses in regenerative medicine. *Stem Cells Dev*. 2009;18(2):293-305.
- Reinisch A, Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Bjelic-Radisic V, Lanzer G, et al. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen Med*. 2007;2(4):371-82.
- Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004;22(4):625-34.
- Jäger M, Krauspe R. Antigen expression of cord blood derived stem cells under osteogenic stimulation *in vitro*. *Cell Biol Int*. 2007;31(9):950-7.
- Kögler G, Sensken S, Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp Hematol*. 2006;34(11):1589-95.
- Arien-Zakay H, Lazarovici P, Nagler A. Tissue regeneration potential in human umbilical cord blood. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(2):291-303.
- Zeddou M, Briquet A, Relic B, Josse C, Malaise MG, Gothot A, et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol Int*. 2010;34(7):693-701.
- Wang M, Yang Y, Yang D, Luo F, Liang W, Guo S et al. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Immunology*. 2009;126(2):220-32.
- Lee MW, Choi J, Yang MS, Moon YJ, Park JS, Kim HC, et al. Isolation of Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(1):273-8.
- Jäger M, Degistirici O, Knipper A, Fischer J, Sager M, Krauspe R. Bone healing and migration of cord blood-derived stem cells into a critical size femoral defect after xenotransplantation. *J Bone Miner Res*. 2007;22(8):1224-33.
- Kang JM, Kang SW, La WG, Yang YS, Kim BS. Enhancement of *in vivo* bone regeneration efficacy of osteogenically undifferentiated human cord blood mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93(2):666-72.
- Liu GP, Li YL, Sun J, Cui L, Zhang WJ, Cao YL. Repair of calvarial defects with human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells and demineralized bone matrix in athymic rats. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2010;26(1):34-8.
- Ho AD, Wagner W, Franke W. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy*. 2008;10(4):320-30.

16. Manca MF, Zwart I, Beo J, Palasingham R, Jen LS, Navarrete R et al. Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood. *Cytotherapy*. 2008;10(1):54-68.
17. Qu Z, Mi S, Fang G. Clinical study on treatment of bone nonunion with MSCs derived from human umbilical cord. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2009;23(3):345-7.
18. Kedong S, Xiubo F, Tianqing L, Macedo HM, LiLi J, Meiyun F, et al. Simultaneous expansion and harvest of hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(12):3183-93.
19. Hildebrandt C, Büth H, Thielecke H. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann Anat*. 2009;191(1):23-32.
20. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008;26(1):146-50.
21. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.