



UNICAMP

# CÉLULAS TRONCO HUMANAS SUBMETIDAS À DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS NEURONAIS

Alex Boso Fioravanti, Daniella Crosara-Alberto, Sara T. O. Saad, Li Li Min

Centro de Hematologia e Hemoterapia  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

## INTRODUÇÃO

A terapia por células-tronco (CT), aos olhos do público leigo, é uma promessa de cura para muitas doenças. Esta crença é baseada no fato de que as CT têm capacidade de diferenciação para, virtualmente, todos os tipos celulares, tornando-se assim uma fonte inesgotável de reposição celular. A CT adulta pode ser obtida do próprio paciente, evitando os problemas de rejeição. Entretanto, para que CT adulta seja aplicável clinicamente há necessidade de expansão numérica e diferenciação destas células em cultura 1. A subpopulação de células tronco hematopoéticas (HSC: *hematopoietic stem cell*), cujo principal marcador é CD133+, tem como principal característica a capacidade de diferenciação em células neuronais 2. O ácido all-trans-retinóico (atRA) é um agente anti-proliferativo utilizado para o tratamento de alguns tipos de lesões pré-malignas e tumores, como a leucemia promielocítica. Além disso, o atRA está envolvido na diferenciação neuronal, “modulação neural” e crescimento axonal de neurônios motores. Maden 12, em revisão de literatura, verificou que o atRA induz a diferenciação de vários tipos de neurônios e células da glia por ativar a transcrição de genes que codificam algumas proteínas estruturais, enzimas e receptores de superfície celular (beta 3 tubulina, BRN2, NFκB, STRA13, SOX1, SOX6, neurogenin, PKCε, PSEN1, MAP2, thrombospondin e componentes da via canônica WNT). O objetivo do presente projeto foi induzir com atRA a diferenciação *in vitro* da linhagem HSC CD133+ obtidas de sangue de cordão umbilical em células neuronais.

## METODOLOGIA

As HSC CD133+ foram obtidas a partir de sangue de cordão umbilical de 3 pacientes, após colhido o sangue, este foi preparado com Ficoll do qual se isolou as células mononucleares. Então, por meio de anticorpos monoclonais anti-CD133 do MicroBead Kit (MACS®) e da coluna magnética (MS Columns, MACS®), foram obtidas as HSC CD133+. Essas células foram postas em meio de cultura para expansão celular (IMDM - *Iscove's Modified Dulbecco's Media* + SBF - *Soro bovino fetal* 10% + SCF - *Stem cell factor*(1uL/mL) + TPO - *Thrombopoietin* (1uL/mL) +IL3 - *Interleucina* 3(1uL/mL) + FLT3 - *FMS-like tyrosine kinase* 3(1uL/mL)) durante 7 dias. Após esse período a cultura de HSC CD133+ foi colocada em meio de diferenciação (IMDM + SBF 30% + Ácido all-trans-retinóico diluído em DMSO) por 3 dias. A caracterização das células foi feita por

citometria de fluxo e microscopia confocal avaliando a expressão de CD133, nestina e beta 3 tubulina após o isolamento, expansão e diferenciação.

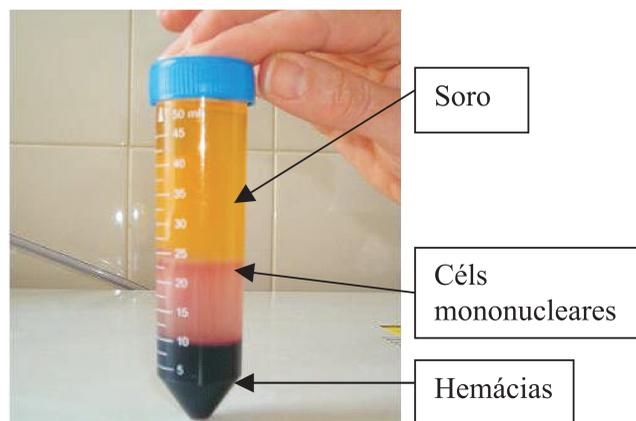


Figura 1. Sangue com Ficoll

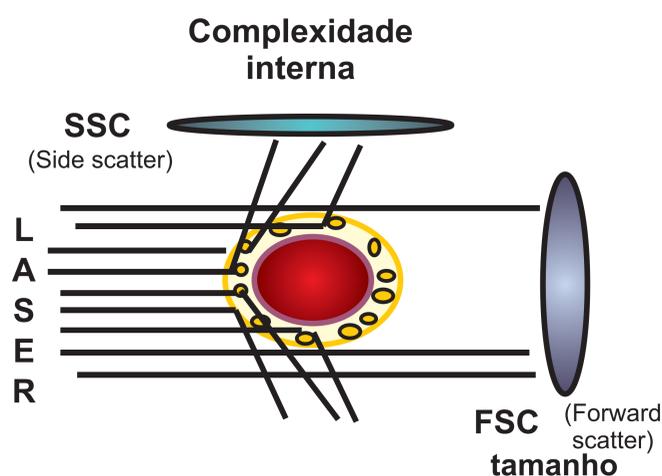


Figura 2: Citômetro de Fluxo: análise das características físicas das células – tamanho e complexidade interna.

## RESULTADOS

Expansão de HSC CD133+ em cultura

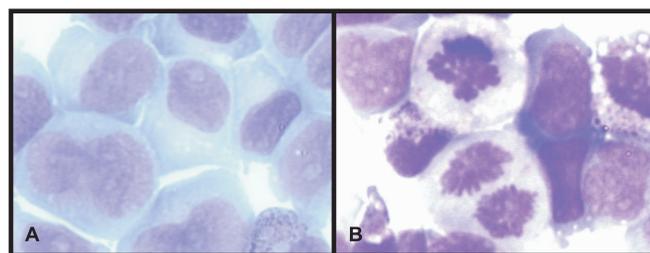


Figure 3: Imagens de microscopia óptica invertida mostrando as células HSC CD133+ em cultura para expansão. Em A observa-se que essas células são mononucleares, em B observa-se figuras de mitoses. Coloração leishman 400x aumento.

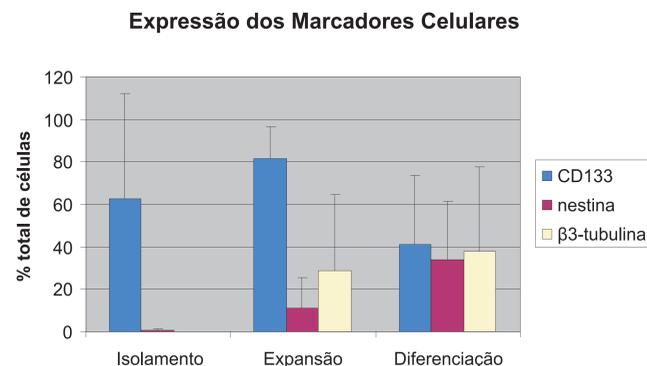


Figura 4: Gráfico representativo da expressão dos marcadores celulares CD133 (azul), nestina (vermelho) e β<sub>3</sub>-tubulina (amarelo) nas diferentes etapas do experimento. n=3

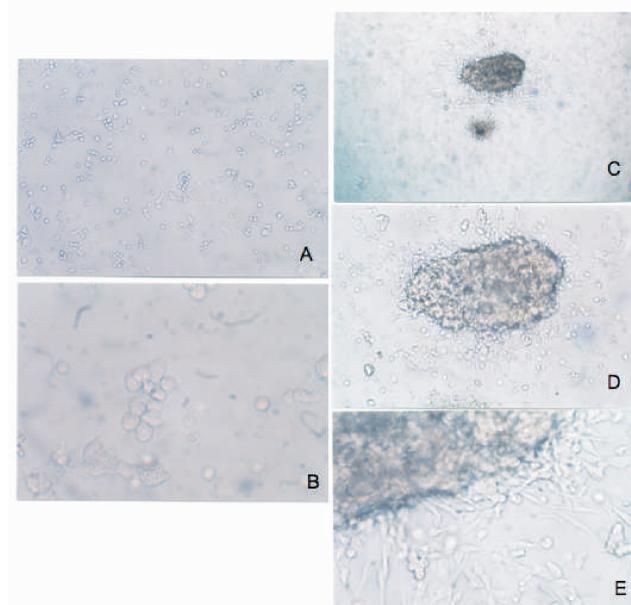


Figura 5: Fotografia em microscópio óptico invertido de células (A,B) controle não tratadas com ATRA e (C, D, E) células tratadas com ATRA (10uM) por 3 dias. A, C: panorâmicas. B, E: aumento de 1000x e D aumento de 200x.

## CONCLUSÃO

A incubação com atRA (10μM, 3 dias) demonstrou que a positividade de células CD133+ passou para 41,13% e a porcentagem de células positivas para nestina e 3-tubulina foi de 33,62 e 38%, respectivamente. Além disto, observou-se mudança morfológica das células, pois apresentaram formações sugestivas de neuroesferas, quando avaliadas em microscópio óptico invertido. Estes dados sugerem que a incubação das células CD133+ com atRA induz modificação fenotípica sugestivas de neurônios.

Apoio Financeiro: FAPESP CNPq PIBIC

