

---

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE EM CÉLULAS-TRONCO DE  
PACIENTES COM DISPLASIA CORTICAL DE TAYLOR**

**JULIANO VIANA BORGES**

**Porto Alegre  
2015**

---

---

**JULIANO VIANA BORGES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE EM CÉLULAS-TRONCO DE  
PACIENTES COM DISPLASIA CORTICAL DE TAYLOR**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre do Programa de Pós-graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Orientadora: Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado

**Porto Alegre  
2015**

---

---

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**B732a** Borges, Juliano Viana  
Avaliação da atividade da telomerase em células-tronco de  
pacientes com displasia cortical de Taylor. / Juliano Viana  
Borges. – Porto Alegre, 2015.  
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Gerontologia Biomédica) –  
Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do  
Rio Grande do Sul - PUCRS.

Linha de Pesquisa: Aspectos Biológicos do  
Envelhecimento.

Orientação: Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado.

1. Gerontologia Biomédica. 2. Telomerase. 3. Células-  
Tronco. 4. Cordão Umbilical. 5. Displasia Cortical de Taylor.  
6. Envelhecimento – Aspectos Biológicos.  
I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

**CDD 618.97**  
**612.67**

Ficha elaborada pela bibliotecária Cíntia Borges Greff CRB 10/1437

---

---

---

**JULIANO VIANA BORGES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE EM CÉLULAS-TRONCO DE  
PACIENTES COM DISPLASIA CORTICAL DE TAYLOR**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre do Programa de Pós-graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

\_\_\_\_\_  
Ângelo José Gonçalves Bós

\_\_\_\_\_  
Ana Cristina Aramburu da Silva

\_\_\_\_\_  
Irenio Gomes (suplente)

**Porto Alegre  
2015**

---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação dos diversos atividades da telomerase nas células. ....	15
<b>Figura 2</b> - Representação do ciclo celular, relacionado ao envelhecimento celular e processo de imortalização celular .....	17
<b>Figura 3</b> - Diferentes tecidos que podem ser originados a partir das células-tronco mesenquimais. ....	19
<b>Figura 4</b> - Corte histológico de cordão umbilical representando as duas artérias e a veia, envoltas pela geléia de Wharton.....	21
<b>Figura 5</b> - Fotografias das culturas de pele e fibroblastos humanos. ....	34
<b>Figura 6</b> - Fotomicrografias de culturas de fibroblastos submetidos a diferenciação mesodérmica.....	35
<b>Figura 7</b> - Fotomicrografia da imunofluorescência de fibroblastos humanos cultivados em meio de neurodiferenciação. ....	36
<b>Figura 8</b> - Fotografia dos produtos da amplificação do segmento do gene hTERT por PCR após eletroforese em gel de agarose 2% .....	37
<b>Figura 9</b> - Fotografia dos produtos de amplificação do segmento do gene hTERT por PCR após eletroforese em gel de agarose 2% .....	38
<b>Figura 10</b> - Gráfico de coluna representando a expressão da porção hTERT da telomerase nos diferentes tipos celulares estudados.....	40
<b>Figura 11</b> - Gráfico de barras representando os valores das médias dos Cts para a atividade da enzima telomerase.....	41

---

---

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Descrição dos grupos e amostras utilizadas no estudo. ....	26
<b>Tabela 2</b> - Resultados da atividade da telomerase detectada pelo ensaio TRAP.....	39
<b>Tabela 3</b> - Representação dos resultados de diferenciação, expressão de hTERT e atividade de telomerase. ....	42

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ASC</b>	células-tronco adultas (do inglês: <i>adult stem cells</i> )
<b>BDNF</b>	fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês: <i>brain derived neural fator</i> )
<b>DMEM</b>	meio Dulbecco modificado (do inglês: <i>dulbecco's modified eagle's médium</i> )
<b>DPBS</b>	(do inglês: <i>dulbecco's phosphate-buffered saline</i> )
<b>EDTA</b>	ácido etilendiamino tetraacético (do inglês: <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
<b>ESC</b>	células-tronco embrionárias (do inglês: <i>embryonic stem cells</i> )
<b>FGF</b>	fator de crescimento de fibroblasto (do inglês: <i>fibroblast growth fator</i> )
<b>FITC</b>	isotiocinato de fluoresceína
<b>GCSF</b>	fator estimulante de colônia de granulócitos (do inglês: <i>granulocyte colony stimulating fator</i> )
<b>ISCT</b>	Sociedade Internacional de terapia Celular (do inglês: <i>Intenational Society for Cellular Therapy</i> )
<b>MAP2</b>	anti-microtúbulo neuronal
<b>Min</b>	minutos
<b>NeuN</b>	anti-núcleo neuronal
<b>NFL</b>	anti-citoesqueleto neuronal
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>PFA</b>	paraformaldeído
<b>Seg</b>	segundos
<b>TRAP</b>	Protocolo de amplificação de repetição telomérica (do inglês: <i>telomeric repeat amplification protocol</i> )

---

---

## RESUMO

A Displasia Cortical é uma das formas mais frequentes de malformações do desenvolvimento cortical, sendo uma patologia que causa uma grande parcela de epilepsias parciais refratárias ao tratamento medicamentoso. Essa patologia é caracterizada por um grupo heterogêneo de lesões corticais, podendo também ser descrita como disgenesia cortical ou desordem de migração neuronal. Os aspectos genéticos envolvidos na displasia cortical, como a expressão da enzima telomerase, não são comumente investigados, principalmente devido ao número limitado de casos e a falta de um modelo experimental. **Objetivo:** este estudo teve como objetivo analisar a atividade e a expressão da enzima telomerase em pacientes com displasia cortical de Taylor, fibroblastos normais, células-tronco de tecido de cordão umbilical e linhagem tumoral humana. **Metodologia:** a atividade e expressão da porção hTERT da telomerase foram avaliadas em fibroblastos de paciente com Displasia Cortical de Taylor (n=1) e comparada com fibroblastos de pacientes do grupo controle (n=3) e células-tronco de cordão umbilical (n=3) e a linhagem tumoral A549 humanos que foram mantidas em cultura. A análise do gene hTERT foi feita por PCR e a atividade da telomerase foi medida pelo ensaio TRAP que utiliza a PCR em tempo real. **Resultados:** a atividade da telomerase foi maior nas células tumorais (Ct=28,32), ao passo que nos demais tipos celulares e nos demais tipos estudados os valores foram semelhantes: Controle (Ct=33,73) Cordão Umbilical (Ct=32,88) e Displasia (Ct=33,56). A expressão da porção hTERT da telomerase foi do grupo Controle foi 2,58x mais expresso, os grupos Displasia e Tumor estavam 61,25x e 635,48x mais expressos, respectivamente que o Controle. **Conclusão:** a telomerase se mostrou mais ativa e com maior expressão na linhagem tumoral do que quando comparada com os outros tipos celulares pesquisados. O gene hTERT mostrou mais expresso, no paciente com Displasia Cortical de Taylor do que nos outros grupos Controle e Cordão Umbilical, indicando que a telomerase é mais expressa em pacientes com esta patologia.

**Palavras-chave:** Telomerase; Displasia Cortical de Taylor; Células-Tronco; Cordão Umbilical; A549.

---



---

## ABSTRACT

The Cortical dysplasia is one of the most frequent forms of malformations of cortical development, with a condition that causes a large portion of refractory partial epilepsy to drug treatment. This condition is characterized by a heterogeneous group of cortical lesions and can also be described as cortical dysgenesis or neuronal migration disorder. The genetic factors involved in cortical dysplasia, such as the expression of the telomerase enzyme, are not commonly investigated, mainly due to the limited number of cases is the lack of an experimental model. **Objective:** This study aimed to analyze the activity and the expression of the enzyme telomerase in patients with cortical dysplasia of Taylor, normal fibroblasts, stem cells from umbilical cord tissue and human tumor. **Methodology:** the activity and expression of hTERT portion of telomerase were evaluated in patient fibroblasts with Cortical Dysplasia of Taylor (n = 1) and compared with control patients fibroblasts (n = 3) and umbilical cord stem cells (n = 3) and human tumor cell line A549 were maintained in culture. The analysis of the hTERT gene was done by PCR and the telomerase activity was measured by TRAP assay that uses real-time PCR. **Results:** telomerase activity was higher in tumor cells (Ct = 28.32), while in other cell types and other types studied values were similar: control (Ct = 33.73) Umbilical Cord (Ct = 32.88) and dysplasia (Ct = 33.56). The expression of hTERT portion of telomerase was the control group was 2,58x more expressed, the Dysplasia and tumor groups were 61,25x and 635,48x more expressed respectively as the control. **Conclusion:** The telomerase appeared to be more active and higher expression in the tumor cell line when compared to other cell types surveyed. The hTERT gene was more expressed in the patient Taylor cortical dysplasia than in the other groups and control umbilical cord indicating that telomerase is expressed in most patients with this disease.

**Keywords:** Telomerase; Cortical dysplasia of Taylor; Stem Cells; Umbilical Cord; A549.

---

---

## SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
1.1 ENVELHECIMENTO CELULAR.....	12
1.2 TELOMEROS E TELOMERASE.....	13
1.3 CÂNCER E TELOMERASE.....	16
1.4 CÉLULAS-TRONCO.....	17
1.5 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	18
1.6 CORDÃO UMBILICAL COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS.....	20
1.7 DISPLASIA CORTICAL.....	21
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	25
4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	26
4.3 OBTENÇÃO FIBROBLASTOS.....	27
4.3.1 Extração dos fibroblastos de pele de abdominoplastia.....	27
4.3.2 Extração dos fibroblastos de pele de neurocirurgia.....	27
4.3.3 Extração de células-tronco de tecido de cordão umbilical.....	28
4.4 DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA.....	28
4.5 NEURODIFERENCIAÇÃO.....	29
4.6 AVALIAÇÃO DA NEURODIFERENCIAÇÃO.....	30
4.7 EXTRAÇÃO DO RNA E SÍNTESE DO cDNA.....	30
4.8 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DA PORÇÃO hTERT DA TELOMERASE POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	31
4.9 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA SUB-UNIDADE hTERT DA TELOMERASE POR PCR TEMPO REAL.....	31
4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE.....	32

---

---

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 RESULTADOS .....	34
5.1 OBTENÇÃO DOS FIBROBLASTOS Á PARTIR DE TECIDO HUMANO.....	34
5.2 DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA DE FIBROBLASTOS E TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO.....	35
5.3 NEURODIFERENCIAÇÃO DE FIBROBLASTOS E TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO .....	36
5.4 EXPRESSÃO DA TELOMERASE EM FIBROBLASTOS E TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO .....	37
5.5 EXPRESSÃO DA SUB-UNIDADE hTERT DA TELOMERASE EM FIBROBLASTOS E TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO.....	38
5.6 ATIVIDADE DA TELOMERASE EM FIBROBLASTOS E TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO	39
5.7 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA TELOMERASE ENTRE OS FIBROBLASTOS DO PACIENTE COM DISPLASIA CORTICAL, DE PACIENTES NORMAIS, DE TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL E CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS.....	39
6 DISCUSSÃO .....	43
7 CONCLUSÕES.....	47
8 REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS .....	54
ANEXO 1 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA .....	55
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	56
ANEXO 3 – ARTIGO.....	58
Telomerase activity of fibroblasts from umbilical cord tissue, normal skin tissue, and skin tissue from patient with Taylor’s cortical dysplasia .....	58

---

## **1 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.1 ENVELHECIMENTO CELULAR**

O envelhecimento é um processo complexo que ocorre em todos os sistemas do nosso organismo levando à deterioração de muitas funções fisiológicas com o passar da vida de um indivíduo. Portanto, várias teorias foram criadas com a finalidade de explicar os processos que envolvem o envelhecimento, sendo que a maioria delas é baseada em fatores imunológicos, genéticos e de estresse oxidativo (radicais livres)(1,2). Entre as teorias sistêmicas encontram-se as alterações metabólicas, neuroendócrinas e imunológicas.

Sabemos que as teorias estocásticas tem um papel muito importante no processo de envelhecimento celular. Entre as teorias moleculares e genéticas, podemos citar a da senescência celular pelo encurtamento dos telômeros. Esse processo de envelhecimento é conhecido como senescência replicativa, no qual as células com baixa ou nenhuma atividade da enzima telomerase, vão perdendo sequências teloméricas até chegar em um estado crítico de encurtamento (3). A célula alcança esse estágio quando a divisão não é mais possível, então dizemos que ela atingiu o Limite de Hayflick (4). Em algumas situações, determinada célula pode sofrer um processo de imortalização, devido ao fato da existência de mutações em fatores específicos que regulam processos de proliferação e morte celular. Dentre esse fatores podemos citar a P53 e a telomerase.

---

## 1.2 TELOMEROS E TELOMERASE

As extremidades cromossômicas possuem estruturas chamadas telômeros, que tem como principal função reduzir a degradação dos cromossomos pela perda do material genético. Os telômeros funcionam como um “relógio” que controla a capacidade replicativa das células e a entrada dessas em fase de senescência (5). Os telômeros dos cromossomos humanos consistem de longas séries de sequências curtas e repetidas, formadas por bases TTAGGG e por proteínas associadas entre as quais podemos citar a TRF-1 e TRF-2, sendo TRF-1 responsável por regular o comprimento dos telômeros e TRF-2 pela sua integridade. O tamanho dessas sequências teloméricas pode variar de uma espécie para outra, ou até mesmo entre mesma espécie e indivíduo, dependendo do tipo celular analisado, e números de divisões que esta célula já passou (6). Por exemplo, uma célula com muitas divisões, teoricamente possui menos atividade da telomerase que células do mesmo tipo com menos divisões.

No mecanismo de replicação celular existe um “problema”, onde a DNA polimerase não consegue sintetizar na totalidade uma das fitas de replicação descontínua do cromossomo, assim, uma parte é perdida a cada replicação, levando ao encurtamento dos telômeros. Portanto a cada divisão celular, ocorre a regressão contínua do tamanho dos telômeros, que vai perdendo em torno de 50-200 pb por divisão (7). Levando isso em consideração, alguns estudos têm demonstrado que, se compararmos células somáticas como fibroblastos e leucócitos, de indivíduos novos e mais velhos podemos perceber uma significativa redução no comprimento telomérico dos cromossomos de pessoas mais idosas. Quando observamos fibroblastos em cultura, podemos notar que estes, com o passar do tempo e das divisões celulares, vão perdendo sequências teloméricas resultando na diminuição do comprimento dos telômeros (8, 9).

Com o passar das divisões celulares, o encurtamento dos telômeros atinge uma fase crítica, na qual, as células não conseguem mais se dividir sem que haja perda do material genético, entrando assim, na fase de senescência celular. Quando a célula atinge essa fase da vida, isto é, ela atingiu o limite de Hayflick, na qual temos grande perda das sequências teloméricas e alta instabilidade genômica, a

---

---

célula pode entrar em período de morte celular ou imortalização (10, 11). Segundo Bodnar et al (1998), esse processo de senescência pode ser atrasado, pela introdução de telomerase em células humanas adultas, diminuindo a perda telomérica e aumentando o tempo de vida destas células (12). A reprogramação celular, é outra maneira que temos de ‘burlar’ o relógio cronológico, como o método apresentado por Takahashi et al (2006;2007), onde genes de pluripotência (OCT4, C-MYC, KLF4 e SOX2) foram inseridos por meio de vetores virais em fibroblastos de pele de camundongos e posteriormente em fibroblastos humanos. Nessas células foi possível observar características de células ditas pluripotentes, sendo uma delas, a atividades da enzima telomerase (13, 14).

Para evitar o encurtamento dos telômeros, algumas células possuem um mecanismo de reposição de sequências teloméricas, que é realizado por um complexo enzimático composto por uma DNA-polimerase dependente de RNA, conhecida como telomerase. Isolado pela primeira vez em 1978 por Blackburn et al (1978), esse complexo consiste de duas estruturas principais: o componente funcional de RNA (hTERC), que serve como um molde para a síntese telomérica do DNA e a proteína catalítica (hTERT), com atividade de transcritase reversa, que sintetiza a cadeia telomérica (5, 15). Novas pesquisas têm indicado que esse complexo está envolvido também em outras atividades: na proliferação celular, extensão do tempo de vida, retardando o envelhecimento celular e modulando a diferenciação celular (Figura 1).

A maioria das células somáticas possui atividade de telomerase quase indetectável, devido à perda da capacidade de transcrição das suas subunidades após o período embrionário. Assim, com o passar das divisões celulares, não há como impedir o encurtamento dos telômeros que ocorre a cada divisão celular (17). Em outras células esta enzima é necessária para a manutenção em longo prazo da capacidade proliferativa, como podemos citar, células de câncer e células-tronco (12). O que pode explicar a baixa atividade da enzima em alguns tecidos, é que embora a porção de RNA funcional (hTERC) presente neste complexo enzimático seja expressa na maioria dos tecidos, a porção catalítica da enzima (hTERT) é expressa somente nessas linhagens celulares de constante renovação e divisão celular (18-20). Vários estudos já demonstraram, que em tumores podemos encontrar atividade da telomerase, primeiramente com Kim *et al* (1994), detectaram

---

que 90 de 101 amostra tumorais possuíam atividade da telomerase (19). Posteriormente muitas amostras tumorais já foram evidenciadas com atividade de telomerase positiva (21).

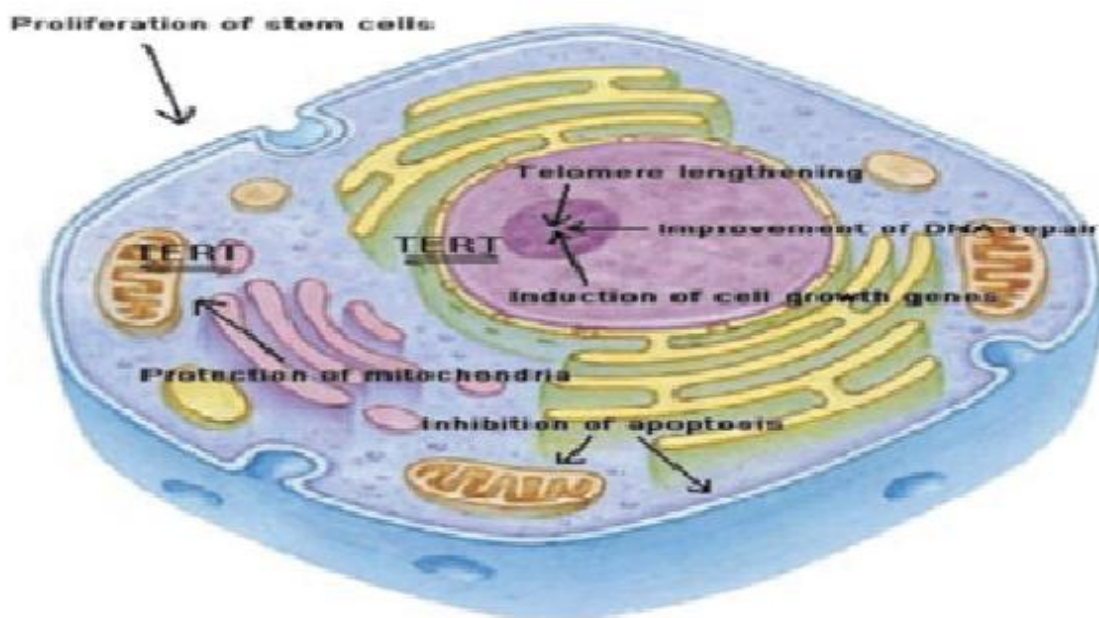


Figura 1 - Representação dos diversos atividades da telomerase nas células.(16)

As células somáticas normais possuem níveis muito baixos de atividade da telomerase, pelo fato da porção catalítica da enzima (hTERT), ser menos transcrita após períodos embrionários, ocorrendo a perda do material genético com o passar das divisões. Ao contrário das células somáticas, as células-tronco, mantêm a atividade da telomerase por longos períodos e conseguem manter a sua capacidade proliferativa sem perda telomérica, tal como as células cancerígenas (12). Em algumas células normais, que possuem telômeros curtos demais e com atividade da telomerase insuficiente, além de não conseguir se replicar, o crítico encurtamento dos telômeros pode levar a uma instabilidade cromossômica e conseqüentemente á uma malignidade (22).

Ultimamente a telomerase vem sendo muito estudada ultimamente, pela sua possível relação com determinadas doenças. Por exemplo, a disceratose congênita é uma genodermatose multissistêmica rara que apresenta manifestações mucocutâneas características, tais como hiperpigmentação reticulada da pele, unhas distróficas e leucoceratose em mucosas. Essa patologia esta associada com a

diminuição do tamanho dos telômeros, onde os pacientes que possuem menores comprimentos teloméricos eram portadores de sintomas graves da doença (23, 24). Mutações nos genes que são responsáveis por transcrever as subunidades da telomerase, já foram observadas em pacientes com fibrose pulmonar idiopática (25). Quando falamos de alterações em telômeros e telomerase, o câncer surge como uma das principais patologias, pois já se sabe que células tumorais possuem um grande poder de expansão e divisão, sendo influenciado por alta atividade da telomerase.

### 1.3 CÂNCER E TELOMERASE

Quando falamos de células somáticas humanas, temos a consciência de que estas possuem um determinado tempo de vida e de divisões. Em cultura células normais podem se dividir em uma média máxima de 40-50 vezes, até entrarem em senescência (26). Células que atingem esse nível de envelhecimento, entram em uma fase conhecida como 'crise', onde estão num período de instabilidade genética, sendo mais propício o aparecimento de novas mutações, podendo ocorrer o desenvolvimento de algumas malignidades. Dentro dessas mudanças inesperadas, podemos citar a supressão no silenciamento da telomerase, como um dos principais fatores para o aparecimento de malignidades (27, 28). A partir da instabilidade genética, as células precursoras cancerígenas são conduzidas á uma repressão da apoptose, permitindo que algumas vias metabólicas sejam ativadas, podendo acarretar na imortalização destas células (Figura 2) (29).

Quando as células atingem um nível crítico de tamanho telomérico alguns mecanismos impedem que esta célula continue se dividindo. Em algumas células que possuem oncogenes ativos, a p53 pode ser inibida, assim as células continuam se dividindo, ficando ainda mais instáveis geneticamente, possibilitando o aparecimento de mais mutações por translocações e deleções (30).

---





**Figura 2** - Representação do ciclo celular, relacionado ao envelhecimento celular e processo de imortalização celular.

A expressão da telomerase é um dos processos chave no aparecimento de malignidades, e seus níveis estão alterados na maioria das células tumorais. A sua avaliação tornou-se uma excelente aliada no diagnóstico do câncer, sendo que em torno de 80-90% dos casos, a enzima pode ser encontrada ativa. Portanto, a telomerase têm papel importante no crescimento tumoral e imortalização celular e a sua reativação parece ser um evento crucial para a proliferação de tumores (31). A disfunção telomérica, pode ser ocasionada pela diminuição crítica das sequências dos telômeros ou pela perda função das proteínas associadas ao complexo (32).

#### 1.4 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são em geral classificadas como células-tronco embrionárias (ESC) e células-tronco “adultas” ou somáticas (ASC). As células-tronco de origem embrionária são extraídas da massa interna do blastocisto (que é o embrião entre o quinto e sétimo dia após a fecundação) e são consideradas totipotentes, isto é, têm a capacidade de originar células derivadas das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma (33). Já as células-tronco adultas ou somáticas são células indiferenciadas que, no entanto, se encontram em

tecidos diferenciados (especializados), que estão presentes em todas as etapas da vida após a fase de blastocisto. Essas células são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida (34).

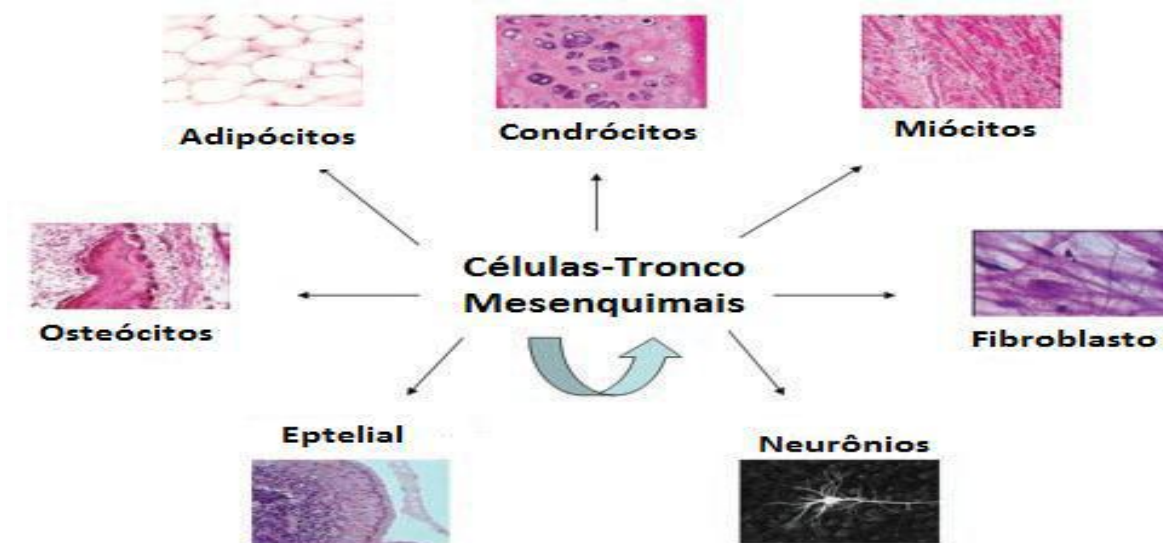
As células-tronco são tipos celulares muito especiais, tendo em vista, que possuem algumas características próprias que as distinguem de outros tipos celulares. São células indiferenciadas e não especializadas; são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes e são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular (35).

As primeiras células-tronco reportadas em humanos foram as células-tronco hematopoiéticas, que são ditas como células multipotentes e dão origem a vários tipos de células do sangue, tanto da linhagem mielóide quanto da linhagem linfóide (36). Existem vários tipos de células-tronco adultas reconhecidas pela comunidade científica, as hematopoiéticas que dão origem as células do tecido sanguíneo, e as células mesenquimais, que dão origem aos tecidos adiposo, ósseo e de cartilagem (37).

## 1.5 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais podem ser definidas como células multipotentes, pois são capazes de se diferenciar em vários tipos celulares: osteócitos, adipócitos e condrócitos se cultivadas em meios com fatores específicos (Figura 3)(38-40). Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo processo de reepitelização e reestruturação tecidual para a manutenção de todos os tecidos do organismo (41, 42).

---



**Figura 3** - Diferentes tecidos que podem ser originados a partir das células-tronco mesenquimais(46).

As células-tronco mesenquimais constituem uma pequena população da medula óssea, correspondendo a aproximadamente de 0,01% a 0,001% das células medulares. Entretanto podem ser isoladas e expandidas com alta eficiência e induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens em condições de cultura definidas (43). Além de ossos, cartilagem e gordura, pesquisas nesse campo, têm demonstrado que as células-tronco mesenquimais podem se diferenciar em neurônios e astrócitos (células da neuroglia) e outros tipos celulares, desde que fatores específicos sejam adicionados às culturas (44, 45). Essas células têm um alto potencial de expansão, estabilidade genética e podem ser facilmente coletadas. Além disso, elas possuem mais duas características muito importantes: (1) são capazes de migrar para locais de lesão tecidual; (2) possuem fortes propriedades imunossupressoras que podem ser exploradas tanto em transplantes autólogos como em heterólogos (46).

A diferenciação das células-tronco mesenquimais está envolvida com diversas etapas mediadas por fatores bioativos, localizados no sítio onde ocorre essa diferenciação, ou inseridos ao meio de cultivo quando essa diferenciação é induzida através de direcionamento *in vitro* (47). Além de responder a estímulos e então se diferenciar, as células-tronco mesenquimais são capazes de sintetizar um amplo espectro de fatores de crescimento e citocinas, dando a elas condições imunomoduladoras, pró-angiogênicas, anti-apoptóticas, quimioatraentes e anti-fibróticas (48).

Os critérios básicos de classificação das células-tronco mesenquimais foram propostos pela *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) em 2006 e incluem a adesão a superfície plástica, imunofenotipagem com marcadores específicos de superfície celular: CD105, CD73, CD90, CD45, CD34, CD11b e HLA classe 2 e diferenciação em tecidos especializados: adipócitos, osteócitos e condrócitos (49).

## 1.6 CORDÃO UMBILICAL COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

O cordão umbilical é uma atrativa fonte para extração de células-tronco, pelo fato de ser de fácil obtenção, por ser descartado após o parto e não oferecer risco para a mãe e para o bebê, esta fonte vem sendo cada vez mais utilizada em pesquisas. O cordão umbilical humano tem em média 50 cm de comprimento e é composto por uma veia e duas artérias. Esses vasos sanguíneos são envoltos por tecido conectivo mucóide, conhecido como: geléia de Wharton (Figura 4). Do cordão umbilical podemos obter um grande número de células-tronco sendo dois os tipos celulares, as células-tronco hematopoiéticas e as mesenquimais. As células hematopoiéticas extraídas do cordão têm se mostrado úteis para o tratamento de algumas desordens hematopoiéticas, tal como, as leucemias (50, 51). Já as células extraídas da geléia de Wharton, têm demonstrado características semelhantes as células mesenquimais obtidas de outros tecidos, tais como aparência, e a formação de colônias de fibroblastos (52). Quando observamos os marcadores de superfície que estão presentes nesta linhagem celular, podemos constatar a expressão dos principais marcadores mesenquimais, tais como, CD90, CD105 e CD73.

A linhagem mesenquimal que pode ser obtida a partir do tecido de cordão possui características de plasticidade semelhante às de células oriundas de outros tecidos. Foi demonstrado que este tipo celular possui a capacidade de diferenciação em tecidos especializados, como por exemplo a produção da linhagem mesodérmica a partir dessas células, originando células diferenciadas em adipócitos, osteócitos e condrócitos (53).

---



**Figura 4** - Corte histológico de cordão umbilical representando as duas artérias e a veia, envoltas pela geléia de Wharton. **1 e 2:** artérias; **3:** veia; **4:** região da geléia de Warthon.

### 1.7 DISPLASIA CORTICAL

A Displasia Cortical é uma das formas mais frequentes de malformações do desenvolvimento cortical, sendo uma patologia que causa uma grande parcela de epilepsias parciais refratárias ao tratamento medicamentoso (54). A displasia cortical focal é formada por vários grupos heterogênicos de lesões corticais, podendo também ser descrita como disgenesia cortical ou desordem de migração neuronal. A displasia cortical focal engloba múltiplos tipos de alterações divididas em dois principais grupos:

1) Anormalidades na arquitetura cortical: uma desorganização colunar dada pela formação de micro-colunas orientadas verticalmente constituídas de pelo menos oito neurônios e uma interrupção laminar pela alteração da composição da sexta camada tangencial do córtex.

2) Anormalidades citológicas: Células neuronais hipertróficas, fora do local anatômico, encontradas na camada V. Neurônios imaturos: células ovais ou redondas com grandes núcleos e membrana fina, normalmente ausente no córtex adulto. Neurônios dismórficos: células com tamanho anormal e morfologia de

dendritos e axônio, apresentam também acúmulo de proteínas de neurofilamentos. Células balonares: células grandes com membrana mal definida, com núcleo único ou duplo e citoplasma eosinofílico com características de células neuronais e linhagem glial, característica da displasia cortical focal tipo Taylor, descrita pela primeira vez em 1971(55, 56).

Palmini e colaboradores em 2004 (54) classificaram as displasias corticais de acordo com observações na substância branca e na arquitetura da camada cortical. As classificações foram descritas da seguinte forma: Tipo Ib - Presença de neurônios heterotrópicos na substância branca, alteração na arquitetura da camada cortical e presença de neurônios gigantes. Tipo IIa - Presença de neurônios heterotrópicos na substância branca, alteração na arquitetura da camada cortical, presença de neurônios gigantes e presença de células dismórficas. Tipo IIb – Presença de neurônios heterotrópicos na substância branca, alteração na arquitetura da camada cortical, presença de neurônios gigantes, presença de células dismórficas e presença de neurônios balonares. No ano de 2011, Blumcke e colaboradores (57) modificaram a classificação de Palmini, distinguindo três tipos de displasia cortical focal como Tipo I, II e III. Os mecanismos envolvidos na gênese da displasia cortical focal ainda não foram elucidados e são pouco investigados, principalmente pelo número limitado de casos e a falta de modelos experimentais adequados (55).

Aspectos genéticos da displasia cortical não são comumente investigados, principalmente devido ao número limitados de casos e a pela falta de um modelo experimental adequado. Uma visão abrangente sobre as mudanças genéticas leva a conclusão que as mutações nos genes que codificam as proteínas reguladoras, resultando na alteração parcial na função das proteínas, podem ser a possível causa da displasia focal. A displasia cortical focal pode envolver qualquer parte do cérebro, pode variar em tamanho e localização e pode ser multifocal (58).

Um dos tipos de displasia cortical que vêm sendo estudada é a displasia de Taylor que também é caracterizada por lesões corticais, levando a crises epiléticas, podendo levar a diversas complicações neurocognitivas (59, 60). Seu diagnóstico é feito principalmente por neuroimagem, ressonância nuclear magnética e por anatomopatologia após análise de biópsia (61).

---

## **2 JUSTIFICATIVA**

Sabe-se que uma das causas do desenvolvimento das displasias corticais é devido a alterações na migração e formação do córtex cerebral, levando a deformações citológicas e da arquitetura e desta região do encéfalo. Também se sabe que a telomerase esta envolvida nos processos de divisão e proliferação celular no nosso organismo. Levando isso em consideração, pode se indagar se a telomerase possui atividade e expressão normais nas células de pacientes com displasia cortical de Taylor.

O estudo e avaliação da atividade e expressão da telomerase são importantes em células de pacientes com displasia cortical de Taylor para que possa contribuir para um melhor esclarecimento biológico, fisiológico e de envelhecimento desta patologia, pois já foi demonstrado que displasias corticais, podem estar associadas a alguns tumores. Entretanto, os níveis de atividade da enzima telomerase em células-tronco de tecido de cordão umbilical, fibroblastos e linhagens tumorais humanas serão determinados, em condições similares de cultura, para se estabelecer os níveis característicos desses diferentes tipos celulares.

---

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a atividade da telomerase em células diferenciadas, células-tronco e linhagens tumorais humanas.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a atividade da telomerase em fibroblastos de pele humana, de tecido de cordão umbilical humano e linhagens de células tumorais humanas;
  - Comparar a atividade da telomerase nos fibroblastos de pele, de tecido de cordão umbilical humano e linhagens de células tumorais humanas;
  - Detectar e quantificar a expressão da subunidade hTERT da telomerase em fibroblastos de pele humana, de tecido de cordão umbilical humano e linhagens de células tumorais humanas;
  - Estabelecer a diferenciação mesodérmica (osteogênica e adipogênica) das células tecido de cordão umbilical e fibroblastos de pele humana;
  - Avaliar a capacidade de neurodiferenciação dos fibroblastos de pele e tecido de cordão umbilical humano.
-



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto aqui apresentado já obteve aprovação da Comissão Científica do Instituto de Geriatria e Gerontologia e do Comitê de Ética da PUCRS com o número: 22339313.2.0000.5336. O presente estudo está em conformidade com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 466/12), bem como com a diretriz número 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (*Council for International Organizations of Medical Sciences, CIOMS; 2002*).

Este estudo foi realizado juntamente com outro projeto (*Avaliação da migração e neurodiferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) de pacientes com displasia cortical*, de autoria do Doutorando Daniel Rodrigo Marinowic, orientado do Dr. Jaderson Costa da Costa) aprovado com número do Comitê de Ética: 17943213.9.0000.5336.

Os experimentos foram todos realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular e no Centro de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas após aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

---

## 4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

As amostras analisadas foram divididas em quatro grupos: grupos Controle, Cordão Umbilical, Displasia e Tumor. O grupo Controle foi composto por três amostras de fibroblastos de pele (PN1, PN2, PN3) que da pele de três pacientes diferentes saudáveis submetidos à três abdominoplastias no Centro de Cirurgia Plástica da PUCRS. O grupo Cordão Umbilical foi composto de três amostras de células-tronco extraídas de três cordões umbilicais (CU1, CU2, CU3) oriundos do Centro de Obstetrícia da PUCRS. O grupo Displasia foi composto por uma amostra (D1) de fibroblastos de pele da cabeça de um paciente submetido à procedimento cirúrgico no Centro de Cirurgia de Epilepsia da PUCRS. O grupo Tumor foi composto por células da linhagem tumoral de carcinoma de pulmão A549 (ATCC® CCL-185™) e essa amostra foi nomeada A549. As amostras estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1 - Descrição dos grupos e amostras utilizadas no estudo.**

GRUPO	IDENTIFICAÇÃO	TIPO DE TECIDO
DISPLASIA	D1	FIBROBLASTO DE PELE
CONTROLE	PN1 PN2 PN3	FIBROBLASTO DE PELE
CORDÃO UMBILICAL	CU1 CU2 CU3	FIBROBLASTO DE CORDÃO UMBILICAL
TUMOR	A549	LINHAGEM TUMORAL DE CARCINOMA DE PULMÃO

### 4.3 OBTENÇÃO FIBROBLASTOS

#### 4.3.1 Extração dos fibroblastos de pele de abdominoplastia

Os fibroblastos do grupo Controle foram extraídos a partir de fragmentos de pele de abdominoplastias. Para realizar a extração dos fibroblastos da pele, a gordura foi retirada e a pele fragmentada em pequenos pedaços. Os fragmentos de pele foram transferidos para placas de cultura e cultivados com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, 100 µg/mL de gentamicina e 20 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos (FGF) em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 10 dias. Após o período de cultivo os fragmentos de pele foram retirados, restando apenas os fibroblastos aderidos à placa.

#### 4.3.2 Extração dos fibroblastos de pele de neurocirurgia

Um pedaço de pele obtido de um paciente com displasia cortical de Taylor foi fragmentado em pequenos pedaços e transferidos para placas de cultura e cultivadas com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, 100 µg/mL de gentamicina e 20 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e cultivadas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 10 dias. Após o período de cultivo os fragmentos de pele foram retirados, restando apenas os fibroblastos aderidos a placa.

---

#### 4.3.3 Extração de células-tronco de tecido de cordão umbilical

As amostras do grupo Cordão Umbilical foram extraídas a partir do tecido do cordão umbilical de três pacientes. O sangue presente no cordão foi aspirado para que seguido da dissecação da região das células de interesse que se localizam no tecido gelatinoso, conhecido como geleia de Warthon. O tecido alvo foi fragmentado e transferido para placa de Petry e então cultivado com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, 100 µg/mL de gentamicina e 20 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos (FGF) em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 10 dias. Após o período de cultivo os fragmentos do cordão foram retirados, restando apenas as células-tronco aderidas a placa.

#### 4.4 DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA

Conforme mencionado, anteriormente (Item 1.5) a ISCT considera células-tronco mesenquimais somente aquelas capazes de adesão à superfície de cultura, expressão positiva dos CD90, CD105 e CD73 e negativos para CD45, CD34 CD11b e HLA classe 2 e de se diferenciar em, pelo menos, adipócitos e osteócitos.

A diferenciação adipogênica foi induzida nas amostras extraídas dos tecidos de pele e cordão em meio DMEM suplementado com 10<sup>-8</sup> mol/L de dexametasona e 5 µg/mL de insulina, por quatro semanas. Para confirmação da diferenciação, os meios da cultura foram retirados a cultura foi lavada com DPBS. A seguir as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% a temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período o PFA foi retirado e as células foram coradas com a solução *Oil Red O* (Sigma Aldrich), por 5 minutos (62).

A diferenciação osteogênica foi em DMEM suplementado com 10<sup>-8</sup> mol/L dexametasona, 5 µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato e 10<sup>-8</sup> mmol/l β-glicerolfosfato

---

---

durante quatro semanas. Para observação do depósito de cálcio, as culturas foram lavadas com DPBS e coradas por cinco minutos a temperatura ambiente com *Alizarin Red S* (Nuclear) com Ph 4,2 (62).

Linhagens de fibroblastos de camundongo NIH 3T3, que passaram pelos mesmos procedimentos de diferenciação e coloração foram usadas como controle de células terminalmente diferenciadas. As células após passarem pelo processo de diferenciação, foram coradas e observadas através de microscopia óptica invertida (NIKON Eclipse TE 2000-S) em aumento de 100X.

#### 4.5 NEURODIFERENCIAÇÃO

O método de neurodiferenciação utilizado é uma adaptação do método descrito por Song *et. Al.*, 2008. As células foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,001% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Gibco), 10% de soro fetal bovino, 100 U.I./mL de penicilina, 100 U.I./mL de estreptomicina e 100  $\mu$ g/mL de gentamicina por um período de três dias à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período as células foram dissociadas da placa de cultura com tripsina/EDTA 0,25% e então recultivadas em meio DMEM/F12 (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U.I./mL de penicilina, 100 U.I./mL de estreptomicina e 100  $\mu$ g/mL de gentamicina durante três dias. As culturas foram novamente tratadas com tripsina/EDTA 0,25%, e transferidas para placa de cultura de seis poços em meio Neurobasal Medium N5 (Gibco) suplementado com: 20 ng/mL de fator neurotrófico derivado de cérebro (Brain Derived Neurotropic Factor - BDNF) (Sigma-Aldrich), 20 ng/mL de fator de crescimento de granulócitos (Granulocyte Colony Stimulating Factor - GCSF) (Bergamo), 10% de soro fetal bovino, 100 U.I./mL de penicilina, 100 U.I./mL de estreptomicina e 100  $\mu$ g/mL de gentamicina. As culturas foram mantidas à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por um período de sete dias, finalizando do protocolo de neurodiferenciação (63).

---

---

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA NEURODIFERENCIAÇÃO

A neurodiferenciação foi avaliada por imunofluorescência. Após a finalização do protocolo de neurodiferenciação, o meio foi retirado e as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% por trinta minutos. As culturas foram lavadas com tampão Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) e foi adicionado 1 mL por poço de solução de bloqueio (Soro Fetal Bovino) e incubado por uma hora a temperatura ambiente. Após, foi adicionado o anticorpo Fluoropan Neuronal Marker (Chemicon) conjugado com isotiocinato de fluoresceína (FITC) diluído em solução de bloqueio (1:100). Esse anticorpo é composto de um conjunto de anticorpos formado por anti-núcleo neuronal (NeuN), anti-citoesqueleto neuronal (NFL), anti-microtúbulo neuronal (MAP2) e anti-microtúbulo neuronal ( $\beta$ -tubulina III) para caracterização da citoarquitetura e polarização neuronal. As células foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas. A seguir, foi adicionado 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI) a 0,01% para marcação nuclear. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão DPBS. As células foram analisadas utilizando microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter.

#### 4.7 EXTRAÇÃO DO RNA E SÍNTESE DO cDNA

As amostras extraídas a partir dos tecidos de pele (grupo Displasia e Controle) e de tecido de cordão foram mantidas em cultura até a 5<sup>o</sup> passagem. Após esse período de cultivo as células foram dissociadas da cultura pelo processo de tripsinização, para a extração do RNA após a retirada do meio de cultura e lavagem com DPBS. O RNA total foi extraído por meio do kit RNA SV-Total (PROMEGA) e a síntese do cDNA foi realizada pelo o kit SuperScript II Reverse Transcriptase (INVITROGEN) conforme orientação dos fabricantes.

---

---

#### 4.8 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DA PORÇÃO hTERT DA TELOMERASE POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A PCR foi realizada para determinar a expressão do gene que codifica a porção catalítica da telomerase, mais conhecida como hTERT, a partir do cDNA obtido, anteriormente (Item 4.8). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação foram: direto- 5'-AGAGTGTCTGGACAAGTTGC-3' e reverso- 5'-CGTAGTCCATGTTTCCAATCG-3'. A PCR foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação à 95°C/5min seguido por 30 ciclos de com as seguintes condições: 95°C/30seg, 54°C/40seg e 72°C/40seg. Os produtos do PCR foram visualizados após separação por de eletroforese em gel de agarose 2%.

#### 4.9 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA SUB-UNIDADE hTERT DA TELOMERASE POR PCR TEMPO REAL

A técnica da PCR em tempo real foi empregada para quantificar a expressão da sub-unidade hTERT da telomerase. Para quantificação e comparação das amostras, utilizamos um controle endógeno da reação, empregando os oligonucleotídeos iniciadores do gene GAPDH direto: 5'-CCATCACCATGTTCCAGGAG-3' e reverso: 5'-GCATGGACTTGTGGTCATGAG-3'. Nesse tipo de estratégia a expressão de um gene constitutivo, ou seja, genes que são constantemente expressos. O experimento foi realizado sob as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação à 95°C/5min seguido por 30 ciclos de com as seguintes condições: 95°C/30seg, 54°C/40seg e 72°C/40seg

Adicionalmente empregou-se outra forma de análise considera que a expressão da subunidade da enzima no grupo controle (fibroblastos normais) igual a 1x para depois se determinar quantas vezes mais esta sendo expressa a enzima nas outras amostras (Displasia, Cordão Umbilical e Tumor). Para cálculo dos valores

---

---

de expressão foi utilizada a técnica de Brabender e colaboradores (2002), baseada na razão entre o Ct dos grupos analisados (64).

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE

A atividade da telomerase foi mensurada por meio do kit TRAPEZE RT TELOMERASE DETECTION KIT (MILLIPORE), que utiliza a técnica da PCR em tempo real. As amostras foram extraídas conforme orientações do fornecedor e após a extração as amostras foram quantificadas para mensurar a concentração de proteínas a serem utilizadas em cada reação, a qual deve ser realizada com no máximo, 1,5 µg/µL de amostra.

Este kit infere os resultados quantitativos da atividade da telomerase, que são medidos através da transferência de energia que resulta em forma de fluorescência emitida pelas amostras após os ciclos de temperatura. Os resultados da PCR em tempo real são apresentados em Cycle Threshold (Ct), que é uma interseção entre a curva de amplificação e a linha de Ct. Os resultados são interpretados de modo que quanto menores valores de Ct, maior a atividade da telomerase nas amostras.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados referentes a atividade da telomerase foi utilizado o programa estatístico SPSS, versão 16.0. Para avaliação da expressão da sub-unidade hTERT foi empregado o Teste Z para comparação dos grupos. A avaliação da atividade da telomerase utilizou o teste estatístico ANOVA uma via (*one way*), para avaliar se existiam diferenças estatísticas entre os grupos. Será

---

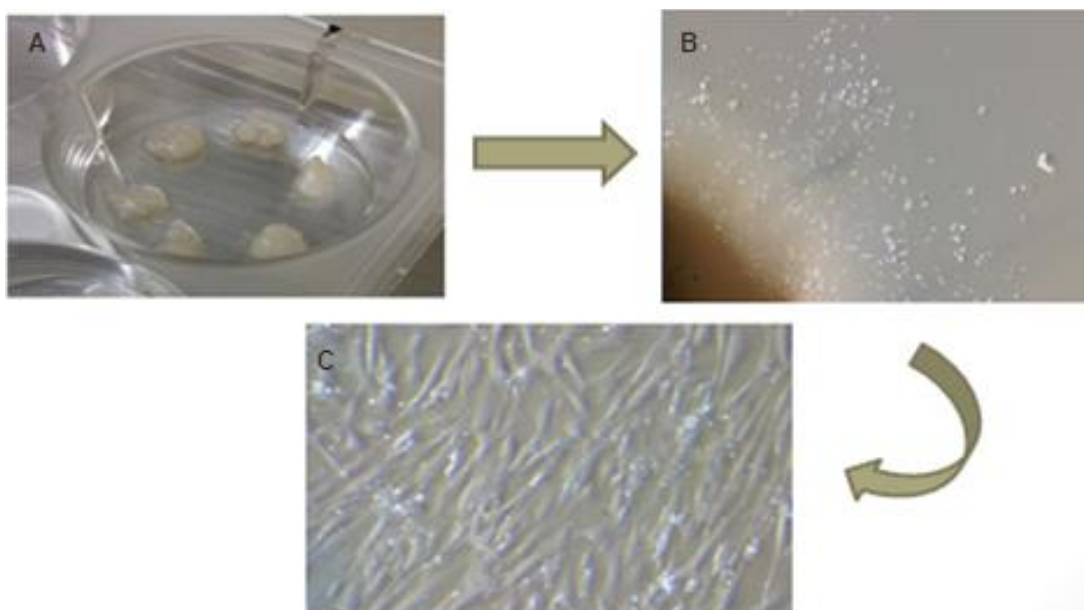


considerado como nível de significância  $p \leq 0,001$ . Os dados para comparação da segunda análise serão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 OBTENÇÃO DOS FIBROBLASTOS Á PARTIR DE TECIDO HUMANO

Os fibroblastos obtidos de pele e tecido de cordão umbilical humano, a partir de fragmentos de pele, podem ser visualizados na Figura 5. No quadro A, pode-se visualizar os fragmentos fixados à placa dia inicial de cultura. Nos quadros B (100 x) e C (100x) é possível observar que os fibroblastos se aderem, multiplicam e expandem após 5 e 10 dias em cultura.



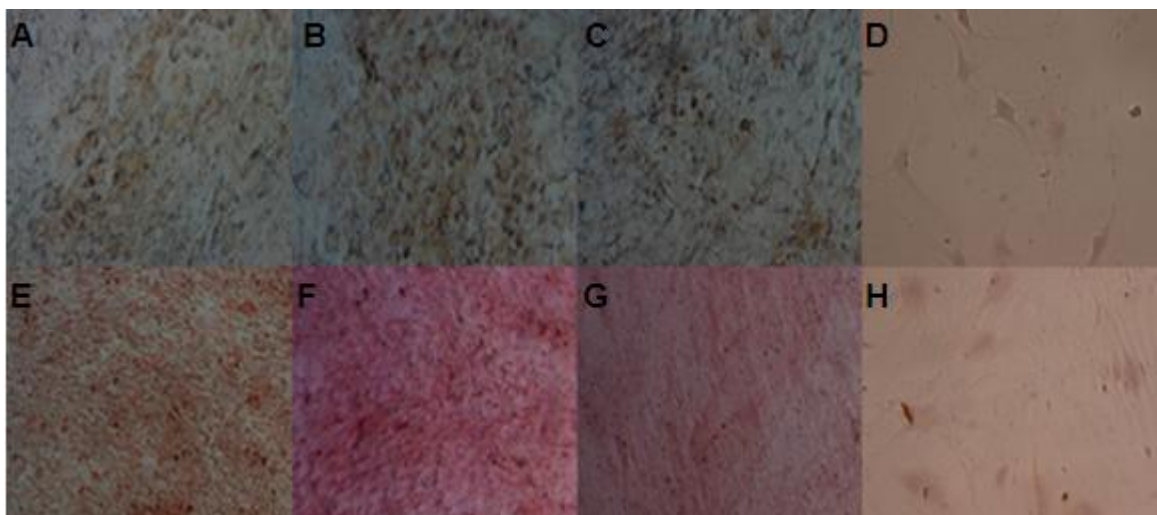
**Figura 5** - Fotografias das culturas de pele e fibroblastos humanos. **A:** tecido de pele fragmentado colocado em cultura. **B:** Fibroblastos migrando do tecido para a placa de cultura. **C:** fibroblastos aderidos após a retirada do tecido.

## 5.2 DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA DE FIBROBLASTOS E TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

As células dos grupos Displasia, Controle e Cordão Umbilical após cultivo por 4 semanas em meios específicos para diferenciação mesodérmica (osteogênica e adipogênica), foram caracterizadas por métodos de coloração específicos para células ósseas e de gordura.

Após análise por microscopia óptica, foi possível observar que as células oriundas dos três grupos pesquisados foram capazes de se diferenciar em linhagens ósseas (Figura 6, E, F e G) como comprovado pela coloração com *Alizarina Red S*, que tem especificidade por precipitados de cálcio, característicos de células ósseas.

Em relação á diferenciação adipogênica (Figura 6, A, B e C), as células se diferenciaram em células de gordura, caracterizadas pela coloração com *Oil Red O*, que é um corante que tem especificidade por concentrados de gordura presentes em células de linhagem adipogênica. As células 3T3 que foram utilizadas como controle de células terminalmente diferenciadas que foram coradas quando se utilizou os mesmos corantes (Figura 6, D= cultura em meio adipogênico e H= cultura em meio osteogênico).

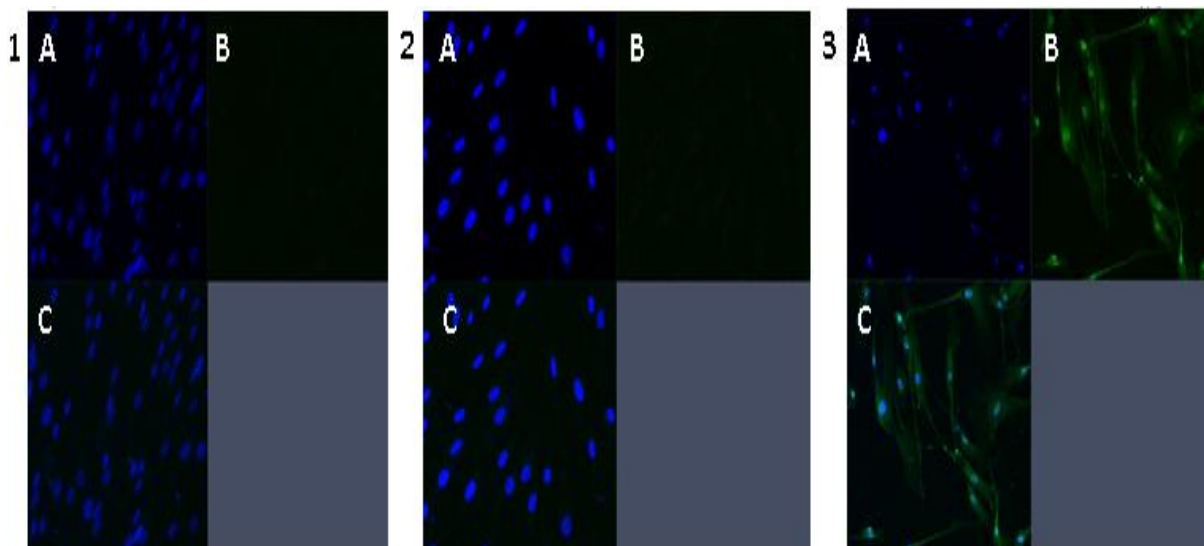


**Figura 6** - Fotomicrografias de culturas de fibroblastos submetidos a diferenciação mesodérmica. Diferenciação adipogênica de fibroblastos do grupo displasia (A), controle (B) e cordão (C). Diferenciação osteogênica de fibroblastos do grupo displasia (E), controle (F) e cordão (G). Controle de células terminalmente diferenciadas (NIH3T3) cultivadas em meio de diferenciação adipogênica (D) e em meio de diferenciação osteogênica (H). Aumento de 100x.

### 5.3 NEURODIFERENCIAÇÃO DE FIBROBLASTOS E TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Os fibroblastos de pacientes com displasia, de indivíduos normais e de tecido de cordão umbilical humano foram submetidos a neurodiferenciação e as células foram avaliadas por meio da marcação imunofluorescente com anticorpos específicos para proteínas neurais (Figura 7). Os fibroblastos adultos obtidos a partir da pele de paciente com displasia e de pacientes normais, não se diferenciaram (Figura 7, quadros 1 e 2), pois não é possível detectar marcação das estruturas neuronais (B e C) nestas culturas, as quais apresentaram somente a marcação nuclear (azul).

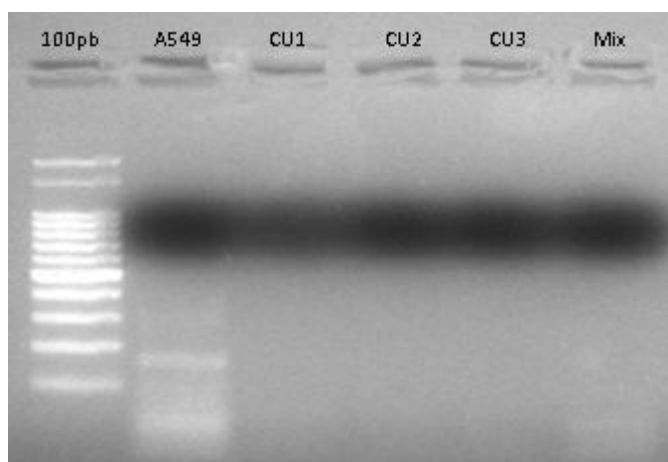
Por outro lado, quando analisamos as amostras de tecido de cordão umbilical (Figura 7, quadro 3), que são células que possuem um maior poder de diferenciação, (por se tratarem de células originárias de um tecido fetal), foi possível detectar a diferenciação neuronal (verde), pois além de evidenciar a marcação do DAPI (Figura 7, A) também visualizamos as estruturas neuronais conferidas pelo anticorpo Fluoropan (Figura 7, B e C).



**Figura 7** - Fotomicrografia da imunofluorescência de fibroblastos humanos cultivados em meio de neurodiferenciação. (1) Fibroblastos de pele de paciente com displasia; (2) fibroblasto de pele de paciente normal; (3) fibroblastos de tecido de cordão umbilical humano. (a) coloração nuclear com DAPI; (b) coloração das estruturas neurais com anticorpo Fluoropan e (c) sobreposição.

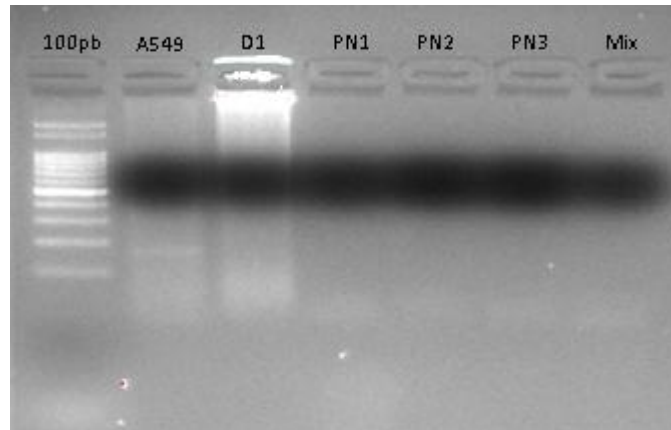
#### 5.4 EXPRESSÃO DA TELOMERASE EM FIBROBLASTOS E TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Na Figura 8 são apresentados o produto da reação em cadeia da polimerase para amplificação de um segmento do gene que codifica a porção hTERT da enzima telomerase. Na coluna A549 é possível um fragmento de 183 pb correspondente à presença do gene alvo na amostra avaliada. Por outro lado, não foi detectada a presença da enzima nas amostras de fibroblastos de tecido de cordão umbilical humano (CU1, CU2 e CU3).



**Figura 8 - Fotografia dos produtos da amplificação do segmento do gene hTERT por PCR após eletroforese em gel de agarose 2%. 100 pb: marcador de peso molecular. A549: amostra da linhagem tumoral humana; CU1, CU2 e CU3: amostras de tecido de cordão umbilical humano, e Mix: controle da mistura da reação (negativo).**

Um padrão semelhante foi detectado nas amostras de fibroblastos de pacientes com displasia e de pacientes normais (Figura 9, D1, PN1, PN2 e PN3), isto é, não foi detectado a presença do gene hTERT ao passo que na amostra tumoral A549 (Figura 9, A549) foi possível observar o produto de 183 pb indicando a presença da porção hTERT.



**Figura 9 - Fotografia dos produtos de amplificação do segmento do gene hTERT por PCR após eletroforese em gel de agarose 2%. 100 pb marcador de peso molecular. A549: amostra da linhagem tumoral humana; D1: fibroblastos de paciente com displasia; PN1, PN2 e PN3: fibroblastos de pacientes normais e Mix: controle da mistura da reação (negativo).**

#### 5.5 EXPRESSÃO DA SUB-UNIDADE hTERT DA TELOMERASE EM FIBROBLASTOS E TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

A expressão da sub-unidade da telomerase hTERT detectada nos fibroblastos do paciente com displasia, dos fibroblastos de pacientes normais, de tecido de cordão umbilical e da linhagem tumoral (A549) esta apresentada na figura 10. Os resultados estão apresentados da maneira que o grupo controle é considerado como tendo expressão 1x. Assim, nos fibroblastos de paciente com displasia a porção hTERT da enzima estava 61,24 vezes mais expressa e nas células da linhagem tumoral (A549) estava 635,48 vezes mais expressa do que nos fibroblastos de pacientes normais. Por outro lado, os fibroblastos de tecido de cordão umbilical humano apresentaram uma expressão 2,58 vezes mais enzima do que o detectado no grupo Controle, isto é, fibroblastos de pacientes normais.

## 5.6 ATIVIDADE DA TELOMERASE EM FIBROBLASTOS E TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Na Tabela 2 estão apresentados os dados obtidos para a quantificação da atividade da enzima telomerase em fibroblastos de paciente com displasia, fibroblastos de paciente normais, fibroblastos de tecido de cordão umbilical humano e em uma linhagem tumoral humana. Como pode ser visualizado na tabela, a atividade desta enzima foi maior nas células tumorais (Ct= 28,32) pois os resultados da avaliação são expressos em valores de Cycle Threshold (Ct) e quanto menor o valor do Ct, maior a atividade da enzima telomerase em determinada amostra. Nas demais amostras não foi detectada grande variação na atividade da enzima.

**Tabela 2 - Resultados da atividade da telomerase detectada pelo ensaio TRAP.**

GRUPO	MÉDIA Ct	DP±	VARIÂNCIA
CONTROLE	33,73	0,91	0,45
CORDÃO U.	32,88	1,14	3,54
DISPLASIA	33,56	1,18	0,51
TUMOR	28,32	0,38	0,35

## 5.7 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA TELOMERASE ENTRE OS FIBROBLASTOS DO PACIENTE COM DISPLASIA CORTICAL, DE PACIENTES NORMAIS, DE TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL E CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

A comparação da expressão da enzima nas diferentes amostras estudadas foi analisada por meio do Teste Z. A comparação leva em conta a hipótese nula de que o grupo controle, isto é, fibroblastos de pacientes normais possui expressão igual a 1. A maior expressão da enzima foi detectada na linhagem de células tumorais (Tumor= 635,48x) seguido das células do paciente com displasia (Displasia= 61,25x), entretanto, nos fibroblastos de cordão umbilical (2,58x) e nos fibroblastos de

pacientes normais a expressão da enzima estava bastante reduzida. Assim, na comparação entre os diferentes tipos celulares houve uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre a expressão da enzima nas células tumorais e nas células dos pacientes com relação aos outros grupos (pacientes normais e cordão umbilical). A apresentação das análises realizadas em cada amostra de todos os grupos pode ser observada na figura 10.

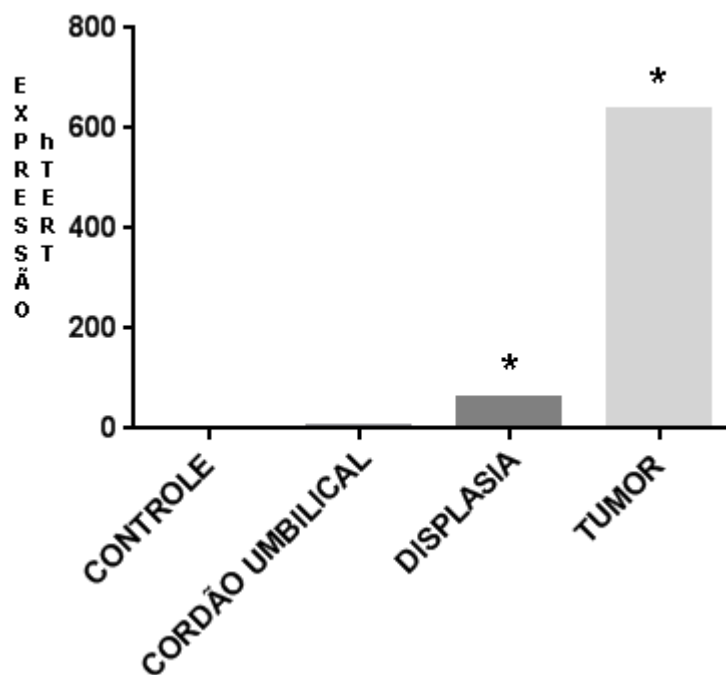


Figura 10 - Gráfico de coluna representando a expressão da porção hTERT da telomerase nos diferentes tipos celulares estudados. Controle: fibroblastos de pele de pacientes normais; Cordão umbilical: fibroblastos de tecido de cordão umbilical; Displasia: fibroblastos de pacientes com displasia e Tumor: células da linhagem tumoral humana A549.  $*(p < 0,001)$ .

Os valores de atividade da enzima telomerase foi comparada entre as médias dos quatro grupos pelo teste ANOVA de uma via (*one way*). Foi detectada uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) somente entre a atividade da enzima nas células tumorais e os outros três grupos (células de pacientes com displasia, células de pacientes normais e células de cordão umbilical) como mostra a figura 11.



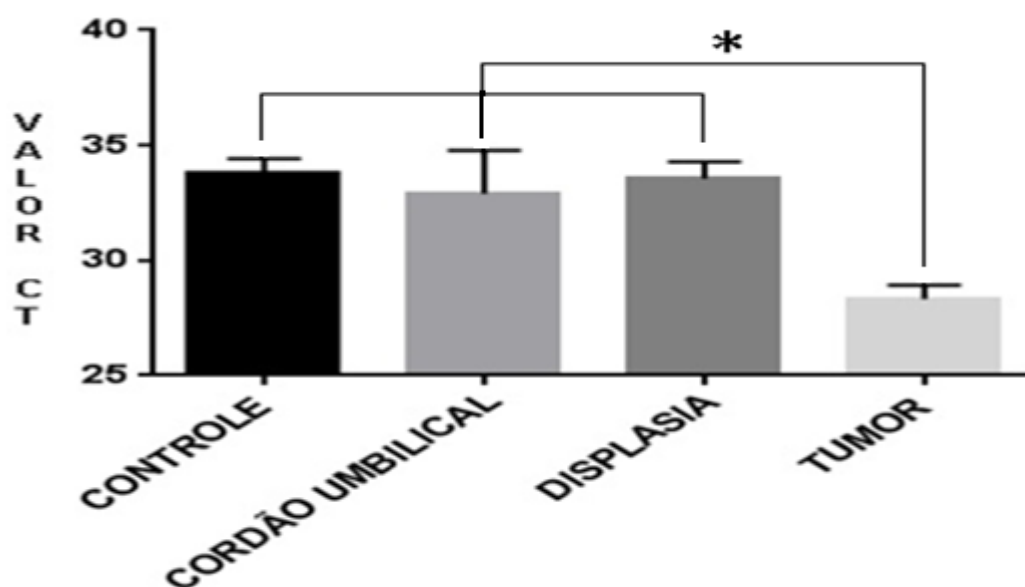


Figura 11 - Gráfico de barras representando os valores das médias dos Cts para a atividade da enzima telomerase. Controle: fibroblastos de pele de pacientes normais; Cordão umbilical: fibroblastos de tecido de cordão umbilical; Displasia: fibroblastos de pacientes com displasia e Tumor: células da linhagem tumoral humana A549. \*( $p < 0,001$ ).

A apresentação das análises realizadas em cada amostra de todos os grupos pode ser observada na tabela 3.

**Tabela 3 - Representação dos resultados de diferenciação, expressão de hTERT e atividade de telomerase.**

GRUPO	AMOSTRA	DIFERENCIAÇÃO			PCR		AT (Ct)
		A	O	N	PCR	RT(X)	
	PN1	+	+	-	-	1	33,32
<b>CONTROLE</b>	PN2	+	+	-	-	1	33,93
	PN3	+	+	-	-	1	33,96
	CU1	+	+	+	-	1,19	33,20
<b>CORDÃO U</b>	CU2	+	+	+	-	2,44	31,39
	CU3	+	+	+	-	4,10	34,07
<b>DISPLASIA</b>	D1	+	+	-	-	61,25	33,56
<b>TUMOR</b>	A549	nd	nd	nd	+	635,48	28,32

Controle= fibroblastos de pacientes normais; Cordão U= fibroblastos de tecido de cordão umbilical; Displasia= fibroblastos de paciente com displasia; Tumor= linhagem celular tumoral A549; A= adipogênica; O= osteogênica; N=neurogênica; PCR: reação em cadeia da polimerase convencional; RT(X)= expressão da porção hTERT da telomerase por PCR em tempo real; AT(Ct)= atividade da telomerase por meio da técnica de TRAP; (+)= positivo; (-)= negativo; nd= não determinado.

---

## 6 DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado a existência de diversos fatores relacionados com o envelhecimento e proliferação celular. Dentre os fatores envolvidos podemos citar a enzima telomerase, como um dos principais, devido a sua capacidade de proteção das extremidades cromossômicas que está diretamente relacionada a integridade do material genético e senescência celular. Esta enzima está ativa em alguns tipos celulares: como as células-tronco e células cancerígenas, o que sugere uma íntima associação entre a capacidade de proliferação e crescimento destas células (65). Já nas células somáticas ditas “adultas” a atividade da enzima não é observada em altas concentrações, sendo que a sua expressão vai decaindo após o período embrionário, podendo até desaparecer nas células terminalmente diferenciadas. Até mesmo em células provenientes de cordão umbilical que é um tecido jovem a telomerase se encontra em baixos níveis (66).

No presente estudo, não foi detectada a expressão da porção hTERT da enzima, corroborando dados já descritos na literatura, como resultados obtidos por Chen et al (2014) que demonstraram células-tronco derivadas de cordão umbilical tendem a perder a atividade da telomerase com o aumento do tempo de cultura (67). Nos fibroblastos provenientes das peles das abdominoplastias (grupo Controle) e da pele do paciente com displasia não foi detectado expressão da enzima. O mesmo foi observado nas culturas de fibroblastos obtidos a partir da geleia de Wharton de cordão umbilical.

As células cancerígenas possuem altos níveis de expressão da porção hTERT, como foi possível detectar nas culturas de linhagem tumoral de carcinoma de pulmão empregada neste estudo A549. Por meio da técnica de PCR convencional foi possível amplificar o fragmento de 183 pb correspondente a um segmento do gene que codifica a porção catalítica (hTERT) da telomerase.

---

---

Em células adultas, como os fibroblastos de pele de pacientes normais, não é comum encontrar altos níveis de expressão do gene hTERT, o que corrobora os dados do presente estudo, assim como foi também observado nos fibroblastos de tecido de cordão umbilical. Por outro lado, nas culturas de fibroblastos do paciente com displasia foi detectado um aumento significativo nos níveis da expressão do gene. Adicionalmente, os níveis de expressão da hTERT nas culturas da linhagem tumoral A549 foi extremamente elevado. Estes dados estão de acordo com a literatura que mostra que células cancerígenas, além de expressarem altos níveis desta enzima, possuem alta atividade após o processo de malignização (68, 69).

A literatura ainda carece de dados sobre a atividade de telomerase e expressão de hTERT em pacientes com displasia cortical de Taylor, provavelmente devido ao fato que não existem muitos estudos relacionando marcadores moleculares com essa patologia. Entretanto, se sabe que em outros tipos de displasia, a expressão da telomerase pode se encontrar em níveis mais elevados que os normais. Podemos citar como exemplo, a displasia esofágica escamosa, onde foi detectado atividade da telomerase em 21 de 47 amostras analisadas. Os autores do estudo sugerem que isso pode ser explicado por se tratar de um tecido em constante renovação ou, por esse tipo de lesão normalmente ser precursora de lesões carcinogênicas (70).

Estudos que analisaram a telomerase pelo ensaio de detecção TRAP (método baseado na amplificação das repetições teloméricas) mostraram que células da linhagem A549 possuem expressão três vezes mais elevada da telomerase quando comparadas com células-tronco embrionárias, quando onde foi evidenciada uma expressão (71). No presente estudo, utilizando a mesma técnica, as culturas de células da linhagem tumoral apresentou atividade significativamente maior quando comparada com os outros grupos.

Um dos critérios estabelecidos pela *International Society for Cellular Therapy*, para caracterização das células-tronco mesenquimais, é que essas células devem ter o poder de diferenciação mesodérmica (adipogênica, osteogênica e condrogênica) (49). As células mesenquimais possuem então a capacidade de diferenciar *in vitro* nessas linhagens. Alguns trabalhos já demonstraram a capacidade de diferenciação mesodérmica de fibroblastos de pele, que podem dar origem á tecidos de algumas linhagens tal como de osso e gordura. Como

---

---

observado em outros trabalhos as amostras providas dos tecidos de pele, do presente estudo foram capazes de se diferenciar em linhagens ósseas e de gordura, *in vitro*, quando induzidas pelos meios de diferenciação utilizados (72, 73). As células aqui cultivadas a partir do tecido e cordão umbilical, que passaram pelo processo de diferenciação osteogênica e adipogênica, pode ser evidenciado depósitos de cálcio e gordura nestas células após o período de indução e coloração para caracterização de células ósseas e de gordura, mostrando que possuem características semelhantes às de outros dados presentes na literatura (53).

Foi induzida a diferenciação neural nas células dos 3 grupos pesquisados (Displasia, Controle e Cordão Umbilical), este processo se deu pelo cultivo das células em 3 etapas que continham 3 tipos diferentes de meios utilizados. Após de diferenciação, obtivemos resultados diferentes dentre os grupos. As células providas das amostras de pele dos grupos Displasia e Controle, não forem capazes de se diferenciar ao serem analisadas após a marcação das estruturas neuronais pelo complexo Fluoropan Neuronal Marker (anti-núcleo neuronal (NeuN), anti-citoesqueleto neuronal (NFL), anti-microtúbulo neuronal (MAP2) e anti-microtúbulo neuronal ( $\beta$ -tubulina III) para caracterização da citoarquitetura), nestas células pode-se somente observar a marcação nuclear que é feita pelo marcador DAPI. Um estudo publicado por Marinowic e colaboradores (2014) demonstrou a capacidade de neurodiferenciação, diferenciação mesodérmica além da expressão do gene de pluripotência KLF4 em fibroblastos NIH-3T3 somente após serem expostos ao co-cultivo com células mononucleares do sangue de cordão umbilical. Os autores sugerem que essas células indiferenciadas podem ter conferido um estado de maior plasticidade aos fibroblastos NIH-3T3 que geraram células de linhagem mesodérmica e neural

Esse resultado difere de alguns trabalhos, tais como o de Shih et al (2005), que observaram que células providas de escalpo capilar teriam a capacidade de neurodiferenciação, então observaram que estas quando induzidas por meios de diferenciação diferentes dos utilizados no nosso projeto, se diferenciaram (74).

Por outro lado, as células-tronco derivadas do tecido de cordão umbilical, que passaram pelo mesmo processo de diferenciação dos fibroblastos de pele, obtiveram melhores resultados de diferenciação quando analisadas por microscopia. Nestas células foram observadas estruturas características de células de linhagem

---

neuronal quando marcadas com Fluoropan Neuronal Marker, indicando que este tipo celular, possui a plasticidade necessária, não apenas para gerar células da linhagem mesodérmica, como a ectodérmica gerando células neuronais. Esse potencial já foi demonstrado por trabalhos anteriores, indicando que células provindas da geleia de Wharton possuem um nível de indiferenciação e plasticidade que algumas células adultas não possuem (75).

---

## **7 CONCLUSÕES**

Os resultados do estudo da expressão e quantificação do gene hTERT e da atividade da telomerase de fibroblastos de pele de paciente com displasiacortical de Taylor, fibroblastos de pacientes normais, fibroblastos de cordão umbilical e células A549 de linhagem tumoral de carcinoma de pulmão, indicam que células tumorais possuem elevados níveis de expressão e atividade da telomerase quando comparadas com células somáticas oriundas de tecidos epiteliais e tecido de cordão umbilical. O estudo também permite inferir que a expressão da subunidade catalítica hTERT da telomerase está mais expressa em células de pacientes com displasia cortical de Taylor do que células de pele e de cordão umbilical de pacientes normais. O estudo também mostrou que células provenientes de tecido de cordão umbilical possuem maior plasticidade e capacidade de diferenciação do que fibroblastos extraídos de pele humana.

---

---

## 8 REFERÊNCIAS

1. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998 Apr;78(2):547-81.
  2. Troen BR. The biology of aging. *Mt Sinai J Med.* 2003 Jan;70(1):3-22.
  3. Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *nature.* 2000;408:53-6.
  4. Linskens MH, Harley CB, West MD, Campisi J, Hayflick L. Replicative senescence and cell death. *Science.* 1995 Jan 6;267(5194):17.
  5. Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Sep;66(3):407-25, table of contents.
  6. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell.* 1989 Nov 3;59(3):521-9.
  7. Huffman KE, Levene SD, Tesmer VM, Shay JW, Wright WE. Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *J Biol Chem.* 2000 Jun 30;275(26):19719-22.
  8. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature.* 1990 Aug 30;346(6287):866-8.
  9. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990 May 31;345(6274):458-60.
  10. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1989 Jul;9(7):3088-92.
  11. Goldstein S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science.* 1990 Sep 7;249(4973):1129-33.
  12. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998 Jan 16;279(5349):349-52.
  13. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76.
-



14. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
  15. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*. 1978 Mar 25;120(1):33-53.
  16. Bollmann FM. The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. *Bioessays*. 2008 Aug;30(8):728-32.
  17. Cong Y, Shay JW. Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell Res*. 2008 Jul;18(7):725-32.
  18. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*. 1996;18(2):173-9.
  19. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994 Dec 23;266(5193):2011-5.
  20. Broccoli D, Young JW, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9082-6.
  21. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 1985 Dec;43(2 Pt 1):405-13.
  22. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*. 2001 May;75(9):4467-72.
  23. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*. 1999 Dec 2;402(6761):551-5.
  24. Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet*. 2004 May;36(5):447-9.
  25. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1;104(18):7552-7.
  26. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961 Dec;25:585-621.
  27. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2008 Mar;8(3):167-79.
-

28. Campisi J, Kim SH, Lim CS, Rubio M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp Gerontol*. 2001 Nov;36(10):1619-37.
  29. Maser RS, DePinho RA. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*. 2002 Jul 26;297(5581):565-9.
  30. Londono-Vallejo JA. Telomere instability and cancer. *Biochimie*. 2008 Jan;90(1):73-82.
  31. Chang S, Khoo C, DePinho RA. Modeling chromosomal instability and epithelial carcinogenesis in the telomerase-deficient mouse. *Semin Cancer Biol*. 2001 Jun;11(3):227-39.
  32. Gilley D, Tanaka H, Herbert BS. Telomere dysfunction in aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 May;37(5):1000-13.
  33. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
  34. Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol*. 2003 Nov;123(4):702-11.
  35. COVAS MAZDT. Células-tronco a nova fronteira da medicina. 2006;1:245.
  36. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 2000 May 1;95(9):2813-20.
  37. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of Cell Science*. 2004 June 15, 2004;117(14):2971-81.
  38. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992;13(1):81-8.
  39. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*. 1999 May;14(5):700-9.
  40. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 1998 Dec;80(12):1745-57.
  41. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Oct-Dec;20(5-6):419-27.
-

- 
42. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009 Apr 15;106(6):984-91.
  43. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
  44. Egusa H, Schweizer FE, Wang CC, Matsuka Y, Nishimura I. Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing. *J Biol Chem.* 2005 Jun 24;280(25):23691-7.
  45. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 14;96(19):10711-6.
  46. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2007 Apr;211(1):27-35.
  47. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006 Aug 1;98(5):1076-84.
  48. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:457-78.
  49. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
  50. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med.* 2001 Jun 14;344(24):1815-22.
  51. Hayani A, Lampeter E, Viswanatha D, Morgan D, Salvi SN. First report of autologous cord blood transplantation in the treatment of a child with leukemia. *Pediatrics.* 2007 Jan;119(1):e296-300.
  52. Kobayashi K, Kubota T, Aso T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of alpha-smooth muscle actin. *Early Hum Dev.* 1998 Jul 10;51(3):223-33.
  53. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells.* 2008 Jan;26(1):146-50.
  54. Palmi A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, et al. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology.* 2004 Mar 23;62(6 Suppl 3):S2-8.
-

- 
55. Kabat J, Krol P. Focal cortical dysplasia - review. *Pol J Radiol.* 2012 Apr;77(2):35-43.
  56. Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JA. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1971 Aug;34(4):369-87.
  57. Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia.* 2011 Jan;52(1):158-74.
  58. Fauser S, Sisodiya SM, Martinian L, Thom M, Gumbinger C, Huppertz HJ, et al. Multi-focal occurrence of cortical dysplasia in epilepsy patients. *Brain.* 2009 Aug;132(Pt 8):2079-90.
  59. Tassi L, Colombo N, Garbelli R, Francione S, Lo Russo G, Mai R, et al. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain.* 2002 Aug;125(Pt 8):1719-32.
  60. Tassi L, Pasquier B, Minotti L, Garbelli R, Kahane P, Benabid AL, et al. Cortical dysplasia: electroclinical, imaging, and neuropathologic study of 13 patients. *Epilepsia.* 2001 Sep;42(9):1112-23.
  61. Urbach H, Scheffler B, Heinrichsmeier T, von Oertzen J, Kral T, Wellmer J, et al. Focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type: a clinicopathological entity with characteristic neuroimaging and histopathological features, and favorable postsurgical outcome. *Epilepsia.* 2002 Jan;43(1):33-40.
  62. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 1999 Mar 15;72(4):570-85.
  63. Song S, Sanchez-Ramos J. Preparation of neural progenitors from bone marrow and umbilical cord blood. *Methods Mol Biol.* 2008;438:123-34.
  64. Brabender J, Park J, Metzger R, Schneider PM, Lord RV, Holscher AH, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Ann Surg.* 2002 Mar;235(3):440-3.
  65. Ju Z, Rudolph KL. Telomeres and telomerase in cancer stem cells. *Eur J Cancer.* 2006 Jun;42(9):1197-203.
  66. Flores I, Benetti R, Blasco MA. Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Jun;18(3):254-60.
  67. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells do not undergo malignant transformation during long-term culturing in serum-free medium. *PLoS One.* 2014;9(6):e98565.
-

- 
68. Attia EA, Seada LS, El-Sayed MH, El-Shiemy SM. Study of telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in normal, aged, and photo-aged skin. *Int J Dermatol*. 2010 Aug;49(8):886-93.
  69. Jakupciak JP, Wang W, Barker PE, Srivastava S, Atha DH. Analytical validation of telomerase activity for cancer early detection: TRAP/PCR-CE and hTERT mRNA quantification assay for high-throughput screening of tumor cells. *J Mol Diagn*. 2004 Aug;6(3):157-65.
  70. Yu HP, Xu SQ, Lu WH, Li YY, Li F, Wang XL, et al. Telomerase activity and expression of telomerase genes in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Surg Oncol*. 2004 May 1;86(2):99-104.
  71. Liu Y, Wu BQ, Zhong HH, Xu ML, Fang WG. Detection of telomerase activity in cultured cells and tumor tissue of lung carcinoma by modified telomeric repeat amplification protocol. *Pathol Int*. 2010 May;60(5):386-94.
  72. Huang HI, Chen SK, Ling QD, Chien CC, Liu HT, Chan SH. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tissue Eng Part A*. 2010 May;16(5):1491-501.
  73. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 2005 Jun-Jul;23(6):727-37.
  74. Shih DT, Lee DC, Chen SC, Tsai RY, Huang CT, Tsai CC, et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*. 2005 Aug;23(7):1012-20.
  75. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21(1):50-60.
-

---

## ANEXOS

---

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA  
COMISSÃO CIENTÍFICA

Porto Alegre, 23 de agosto de 2013.

Senhor (a) Pesquisador (a) Juliano Viana Borges

A Comissão Científica do IGG apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE EM CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS (IPS) DE PACIENTES COM DISPLASIA CORTICAL DE TAYLOR"

Solicitamos que providencie os documentos necessários para o encaminhamento do protocolo de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.

Salientamos que somente após a aprovação deste Comitê o projeto deverá ser iniciado.

Atenciosamente,



**Prof. Alfredo Cataldo Neto**  
Coordenador Adjunto da CC/IGG

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6690 - P. 60 CEP: 90.610-000  
Fone: (51) 3336-8153 Fax (51) 3320-3862  
E-mail: [igg@pucrs.br](mailto:igg@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/igg](http://www.pucrs.br/igg)

## ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DATELOMERASE EM CÉLULAS-TRONCO DE PACIENTES COM DISPLASIA CORTICAL DE TAYLOR

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação da atividade da telomerase em células-tronco pluripotente induzidas (ips) de pacientes com displasia cortical de Taylor”

**I. Justificativa e objetivos da pesquisa:** A displasia cortical é uma das formas mais frequentes de malformações do sistema nervoso, muitas vezes responsável pelo desenvolvimento de epilepsia sem resposta a medicação. Os fibroblastos são células que compõem o tecido conjuntivo (tecido que é responsável pela organização e estrutura dos órgãos do corpo) e são encontrados em diferentes locais, principalmente na pele. No laboratório, os fibroblastos da pele podem ser transformados em células imaturas, podendo assim ser utilizados como única oportunidade para pesquisar os aspectos envolvidos na formação e desenvolvimento das doenças nervosas e também servem de modelo para testes de novos remédios.

**II. O objetivo desse projeto:** Transformar células da pele de pacientes com displasia cortical em linhagens de células-tronco pluripotente induzidas (células imaturas) para estudar os mecanismos envolvidos nessa doença.

**III. Procedimentos a serem utilizados:** Durante seu procedimento cirúrgico, uma amostra residual de pele de cerca de 6 cm<sup>2</sup> será coletada pelo seu cirurgião. Essa amostra coletada não irá gerar nenhum tipo de intercorrência no procedimento cirúrgico, será retirada das bordas da incisão cirúrgica não gerando nenhum tipo de cicatriz adicional ou influência na recuperação normal do procedimento cirúrgico que o(a) senhor(a) irá se submeter. Esse fragmento de pele será encaminhado ao laboratório onde será colocado em um ambiente controlado para o crescimento das células (fibroblastos) que compõem a camada mais interna (derme) da pele. Após esse procedimento, as células cultivadas serão tratadas com um conjunto de fatores genéticos para que assumam um papel semelhante às células que compõem os tecidos no início do desenvolvimento do cérebro. As células serão então colocadas em um ambiente semelhante aos que estimulam a formação do cérebro para que possam ser estudadas as possíveis alterações nas trajetórias de maturação e de migração das células que formariam os tecidos cerebrais.

**IV. Desconfortos ou riscos esperados:** Não existe nenhum risco na participação desse projeto. O material coletado será retirado da borda da incisão cirúrgica durante o procedimento padrão, não gerando nenhum tipo de alteração, desconforto ou dor no processo. A coleta é rápida e será realizada pelo neurocirurgião, não interferindo na atenção do cirurgião nem mesmo no tempo normal do procedimento cirúrgico e nos desfechos de cicatrização e recuperação.

**V. Os benefícios que se pode obter:** O único benefício em participar deste programa é que, doando um fragmento de pele durante seu procedimento cirúrgico, você estará contribuindo para um estudo que buscará compreender os mecanismos envolvidos no início da formação da displasia cortical, com isso, contribuindo para o desenvolvimento de um possível tratamento para mesma.

**VI. Custos de participação, liberdade de abandono e garantia de privacidade:** Não haverá, para o participante, nenhum custo com a realização da pesquisa proposta. Caso você decida não participar do programa, não sofrerá nenhum prejuízo no atendimento dispensado a você. A decisão de não participar do programa não irá afetar o seu atendimento no hospital. Será garantida toda privacidade em relação à participação nesse projeto, bem como os dados obtidos com o resultado dos experimentos, sendo esses utilizados apenas em produções científicas com total sigilo em relação à identidade dos participantes.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador



**CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO FRAGMENTO DE PELE**

Declaro que li as informações anteriormente descritas a respeito do projeto de pesquisa "Avaliação da migração e neurodiferenciação de células-tronco pluripotente induzidas (iPS) de pacientes com displasia cortical" e tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas.

Aceito participar da doação de um fragmento de pele para o projeto proposto, com o objetivo de pesquisa, não sendo usado para doação.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente                      Nome do paciente                      Data

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador                      Nome do Pesquisador                      Data

Este formulário foi lido para \_\_\_\_\_ (paciente) em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ pelo  
\_\_\_\_\_ (pesquisador) enquanto eu estava presente.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha                      Nome da testemunha

**AFIRMAÇÃO DO INVESTIGADOR:** foi oferecido ao participante a oportunidade de tirar dúvidas a respeito dos riscos e desconfortos que podem se associar à participação no programa. Todas as respostas foram devidamente respondidas.

Caso tiver novas perguntas sobre esse estudo, posso chamar o Dra. Denise Cantarelli Machado (pesquisador responsável) no telefone: (51) 3320-3000 ramal: 2364 , ao pesquisador Juliano Viana Borges, pelo fone (51) 81879252 e ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS pelo fone 33203345.

ANEXO 3 – ARTIGO

Telomerase activity of fibroblasts from umbilical cord tissue, normal skin tissue, and skin tissue from patient with Taylor´s cortical dysplasia

Juliano Viana Borges<sup>1</sup>, Daniel Rodrigo Marinowic<sup>1</sup>, Jaderson Costa DaCosta<sup>1,2</sup>,  
Denise Cantarelli Machado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular and Cellular Biology Laboratory, Biomedical Research Institute and <sup>2</sup>Brain Institute, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil.

CORRESPONDING AUTHOR:

Juliano Viana Borges  
Laboratório de Biologia Celular e Molecular  
Instituto de Pesquisas Biomédicas  
Prédio 60 – 2º andar  
Av. Ipiranga 6690  
Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brazil  
CEP 90610-000

email: [juliano\\_vb@hotmail.com](mailto:juliano_vb@hotmail.com)

running head: Telomerase activity of fibroblasts

---

---

**ABSTRACT:** The structures on the chromosome ends called telomeres are protected by an RNA enzyme called telomerase. Its main function is to hold the loss of genetic material, which will lead to cell senescence. The cortical dysplasia is one of the most frequent forms of malformations of cortical development; however the genetic factors are not widely studied. The aim of this investigation was to analyze activity and the expression of the telomerase in patients with cortical dysplasia of Taylor, normal fibroblasts, stem cells from umbilical cord tissue and human tumor. The hTERT expression were evaluated in fibroblasts from patient with Taylor's cortical dysplasia, normal fibroblasts, umbilical cord tissue and human tumor cell line A549 by PCR and the telomerase activity was measured by TRAP assay. The telomerase activity was higher in tumor cells (Ct=28.32;  $P<0.001$ ), while in the other cell types evaluated, the Ct values were similar (normal fibroblast: Ct=33.73; umbilical cord tissue: Ct=32.88; fibroblasts from patient with Taylor's Dysplasia: Ct=33.56). The expression of hTERT was higher on fibroblasts from patient with Taylor's Dysplasia (61.25 times) and tumor cell line A549 (635.48 times) when compared with normal fibroblasts ( $P<0.001$ ). As expected, this study has shown that the telomerase was more active and had higher expression in the tumor cell line considering that tumor cells behave as embryonic cells by reactivating the enzyme activity. However, we also shown that in a disease related with a development disorder such as the Taylor's dysplasia, this enzyme also have re-activated its activity or never lost it completely. This finding requires further investigation.

**Keywords:** Telomerase; Taylor's Cortical Dysplasia; Umbilical Cord Tissue; Normal Skin Fibroblasts and A549 cell line.

---

**Introduction**

The structures on the chromosome ends called telomeres are protected by an RNA enzyme called telomerase. Their main function is to hold the loss of genetic material, which will lead to cell senescence. (1). The telomerase complex consists of two main units: the RNA functional component (hTERC), which serves as a template for telomeric DNA synthesis, and catalytic moiety (hTERT) with reverse transcriptase activity that synthesizes telomeric chain (2).

Most somatic cells have undetectable telomerase activity after the embryonic phase due to the loss of its subunits transcription. So, after cell divisions, there is no way to prevent telomere shortening that occurs with each cell division (3). In other cells, this enzyme is required for long-term maintenance of the proliferative capacity, like the stem cells and cancer cells (4). The explanation for the low activity of the enzyme, is that differentiated cells do not express the catalytic portion of the enzyme (hTERT) that is expressed only on undifferentiated cells and/or malignant (5-7). Studies have shown that in tumors has telomerase activity (6, 8).

Stem cells can be of great help to study of diseases and their origins (9). Among them, we can mention the mesenchymal stem cells, which can be derived from various sites of our body. The mesenchymal cell is widely used because they are cells that have a great degree of plasticity and are easily collected (10, 11). They are present in tissues such as bone marrow, adipose tissue and umbilical cord tissue (12-14).

The cortical dysplasia is one of the most frequent types of malformations of cortical development, with a condition that causes a large portion of partial epilepsy refractory to drug treatment (15). The focal cortical dysplasia consists of various heterogenic groups of cortical lesions and can also be described as cortical dysgenesis or neuronal migration disorder. The focal cortical dysplasia includes many types of modifications divided into two main groups: 1) Abnormalities in cortical architecture: a columnar disorganization given by the formation of vertically oriented micro-columns formed by at least eight neurons and a laminar interruption by changing the composition of the sixth tangential layer of the cortex; 2) cytological abnormalities: hypertrophic neuronal cells outside the anatomical site. Among this group of abnormal cells, include: dysmorphic neurons; balloon cells - these are the

---

features of Cortical Dysplasia Taylor, described the first time in 1971 (16, 17). The diagnosis of dysplasia is normally performed by neuroimaging, magnetic resonance and anatomopathology after biopsy analysis (18). Genetic aspects of cortical dysplasia are not commonly investigated mainly due to the limited number of cases is the lack of adequate experimental models. The study and evaluation of activity and expression of telomerase is important in patients with cortical dysplasia of Taylor to have a better biological, physiological, and aging explanation of this pathology. Therefore, we evaluate the telomerase expression and activity of fibroblasts from umbilical cord tissue, normal skin tissue, and skin tissue from patient with Taylor's cortical dysplasia, and lung tumor cell line in order to investigate its role on a developmental related disease.

---

## **Materials and Methods**

### **Ethical issues**

This study was approved by Scientific Committee of Geriatrics and Gerontology Institute and the Research Ethical Committee of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS). The samples were obtained after the patients signed the informed consent.

### **Samples**

Three samples of normal skin fibroblasts were obtained from three different healthy patients undergoing abdominoplasty; tissue from three umbilical cord and skin fibroblasts from one patient with Taylor's Cortical Dysplasia from Plastic Surgery, Obstetrics Center and Epilepsy Surgery Center from Hospital São Lucas da PUCRS. The lung carcinoma cell line A549 (ATCC CCL-185) was also investigated. For analysis, the samples were divided into the following groups: normal skin fibroblasts (control), umbilical cord tissue, fibroblasts of patient with dysplasia cortical of Taylor and tumor cell line A549.

### **Normal skin fibroblasts collection and culture**

Normal skin fibroblasts were obtained from skin abdominoplasty after fat removal. The skin was cut into small pieces and transferred into culture plates. The tissue was initially cultured with DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 100 U/mL penicillin (Gibco), 100 U/mL streptomycin (Gibco), 100 ug/mL gentamicin (Gibco) and 20 ng/mL fibroblast growth factor (FGF) (Gibco) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 10 days. After this period, the skin fragments were removed, leaving only the fibroblasts attached to the culture plate.

---

---

**Skin fibroblasts from patient with Taylor's Cortical Dysplasia:**

A piece of skin was taken from a patient with Taylor's cortical dysplasia and fragmented into small pieces. The fragments were transferred to culture dishes containing DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin (Gibco), 100 ug/mL gentamicin (Gibco) and 20 ng/mL fibroblast growth factor (FGF) (Gibco) and cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 10 days. After this period, the skin fragments were removed, leaving only the fibroblasts attached to the culture plate.

**Fibroblasts from umbilical cord tissue**

The umbilical cord samples were taken from umbilical cord tissue of three patients. The blood was aspirated followed by dissection of the region of interest cells that are located in gelatinous material, known as Wharton's jelly. The target tissue was fragmented and transferred into a plate and then cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 100 U/mL penicillin (Gibco), 100 U/mL streptomycin (Gibco), 100 ug/mL gentamicin (Gibco) and 20 ng/mL growth factor fibroblast (FGF) (Gibco) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 10 days. After the culture period, the cord fragments were removed, leaving only the fibroblasts attached to the culture plate.

**Mesodermal differentiation**

According to the International Society of Cellular Therapy the requirements for a cell population to be considered undifferentiated such as a stem cell it should present some features such as: adherence to the plastic culture surface, capability of mesodermal lineage differentiation and a profile of specific cluster differentiations (19). Therefore, we performed mesodermal differentiation to determine the plasticity of the different cells evaluated in the present study. The adipogenic differentiation was induced by culturing the cells with DMEM (Gibco) containing 10<sup>-8</sup> mol/L dexamethasone and 5 mg/mL insulin (sigma-aldrich), and osteogenic differentiation by culturing the cells with DMEM (Gibco) supplemented with 10<sup>-8</sup> mol/L

---

---

dexamethasone (Sigma-Aldrich), 5 mg/mL ascorbic acid 2-phosphate (Sigma-Aldrich), and 10 mmol/L of  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma-Aldrich) for four weeks (20).

### **Neural differentiation**

The neural differentiation was induced as described by Song *et al.* (2008) with some modifications. Cells were cultivated in DMEM (Gibco) supplemented with 0.001%  $\beta$ -mercaptoethanol (Gibco), 10% fetal bovine serum, (Gibco) 100 IU/mL penicillin (Gibco), 100 IU/mL streptomycin (Gibco) and 100 mg/mL gentamicin (Gibco), for three days. The culture medium was replaced with DMEM/F12 (Gibco) containing fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, and gentamycin for a further three days. The cells were then transferred to six-well plates and cultivated with Neurobasal Medium N5 (Gibco) supplemented with 20 ng/mL brain-derived neurotropic factor (BDNF) (Sigma-Aldrich), 20 ng/mL granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) (BERGAMO, São Paulo, Brazil), fetal bovine serum (Gibco), penicillin (Gibco), streptomycin (Gibco), and gentamicin (Gibco). The cells were cultured for a further period of seven days (21).

### **Histological staining for osteocytes and adipocytes**

To confirm the cell differentiation, cells were washed with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Gibco) and fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature, followed by Oil Red O staining (Sigma-Aldrich) to label adipocytes, and Alizarin Red S (Merck, Darmstadt, Germany) staining to detect calcium deposits characteristic of the osteogenic lineage. Staining was also performed in NIH-3T3 fibroblasts (ATCC-CRL-1658) co-cultured with cord blood without being differentiated.

### **Immunocytochemistry for neural markers**

When neural differentiated was reached, the culture medium was discarded, and the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. After a wash with DPBS (Gibco), 1 mL per well of blocking solution (fetal bovine serum and bovine serum

---



albumin (Gibco)) was added, and the cells were incubated for 1 hour at room temperature. Followed by incubation at room temperature for 2 hours with the FluoroPan Neuronal Marker (Chemicon, Temecula, CA), which contains FITC conjugated anti-neuronal nuclei (NeuN), anti-neuronal cytoskeleton (NFL), anti-neuronal microtubule (MAP2), and anti-neuronal microtubule ( $\beta$ -tubulin III). The antibodies were diluted (1:100) in blocking solution to characterize the cells cytoarchitecture and neuronal polarization. Then, 0.01% 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) was added for nuclear staining. The cultures were washed twice with DPBS (Gibco) buffer and analyzed using a LSM-5 Exciter confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). For quantitative analysis, ten visual fields were randomly selected under a 20x objective lens, each containing at least 20 cells marked with DAPI (Sigma-Aldrich).

### **RNA extraction and cDNA synthesis**

The RNA from fibroblasts from patient with Taylor's cortical dysplasia, normal skin, umbilical cord tissue and the tumor cell line A549 were extracted using the SV Total RNA-kit (Promega) and a cDNA synthesis was performed by the SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

### **Detection of hTERT portion of telomerase by polymerase chain reaction (PCR)**

PCR was performed to determine the expression hTERT, from cDNA obtained according to previous section. The primers sequences used in the reactions were: forward 5'-AGAGTGTCTGGACAAGTTGC-3', and reverse 5'-CGTAGTCCATGTTTCAATCG-3'. The PCR conditions was as follows: an initial cycle of denaturation at 95°C/5 min, 30 cycles of 95°C/30 sec, 54°C/40 sec and 72°C/40 sec. PCR products were visualized after electrophoresis separation on 2% agarose gel.

### **Expression of sub-unit hTERT of telomerase by real time PCR**

The real-time PCR was used to quantify the expression of hTERT. For quantification and comparison between samples, an endogenous control reaction of GAPDH gene

---

---

was used with the forward primer 5'-CCATCACCATGTTCCAGGAG-3', and reverse primer 5'-GCATGGACTTGTGGTCATGAG-3'. Additionally, another form of analysis that considers the expression of hTERT in the normal fibroblasts (control group) equal to one time was also applied to determine how many times the enzyme was expressed in the other samples. To calculate the expression values, the Brabender technique (2002) based on the ratio between the Ct of the groups was used (22).

### **Telomerase activity quantitation**

The RT trapeze Telomerase Detection Kit (Millipore) based in the PCR real time technique was used. The samples were extracted according to the supplier's directions, and after extraction, the protein concentration was measured. Each reaction was performed with at the most 1.5 mg/uL of protein.

The real time PCR results are shown as Cycle Threshold (Ct). The results are interpreted in a way that the smaller the Ct values are, greater telomerase activity is in the samples.

---

---

## RESULTS

### **Mesodermal differentiation of fibroblasts and umbilical cord tissue**

The normal fibroblasts, fibroblasts of Taylor's cortical dysplasia, and fibroblasts from umbilical cord tissue were characterized by specific staining methods for bone and fat cells (osteogenic and adipogenic).

We observed that cells derived from all three fibroblasts from the different origins were capable to adipogenic differentiation (Figure 1: A, B and C). The cells differentiated into adipocytes, which are characterized by Oil Red O staining (Sigma-Aldrich), which is fat specific dye.

Regarding to osteogenic differentiation, all cells were able to differentiate into bone cells (Figure 1: E, F and G) as evidenced by Alizarin Red S stain (Merck), which is calcium specific dye.

The NIH-3T3 (ATCC) cultures were used as control of terminally differentiated cells and were stained with the same dyes (Figure 1, D = adipogenic culture medium and H = osteogenic culture medium), to prove its fully differentiation.

### **Fibroblasts and umbilical cord tissue neural differentiation**

Fibroblasts from patient skin with dysplasia, normal skin and umbilical cord tissue were cultivated with neural differentiation media and the cells were evaluated by immunofluorescence staining with neural specific antibodies (Figure 2). Adult fibroblasts obtained from patients with dysplasia and from normal skin did not differentiate as shown in Figure 2 (Photomicrography 1 and 2). it was not possible to The neuronal structures did not stained (B and C) and in these cultures only nuclear staining (blue) is detectable.

On the other hand, when examining samples from the umbilical cord tissue (Figure 2, Photomicrography 3), it was possible to observe a clear neuronal marker (green), conferred by Fluoropan antibody (Photomicrography 3, B and C).

---

---

### **Telomerase expression in fibroblasts and umbilical cord tissue**

The Figure 3 and 4 has shown the PCR product amplification of a coding segment corresponding the hTERT portion of telomerase gene. Only in the A549 cultures cells was possible to detect the fragment of 183 bp corresponding to the target gene.

### **hTERT telomerase subunity expression in fibroblasts and umbilical cord tissue**

The expression of hTERT was determined by RT-PCR and the results are shown in Graph 1. For the analysis, the control group (normal fibroblasts) was deemed to have expression equal to one. Therefore, the hTERT portion of the enzyme in fibroblasts from Taylor's Cortical Dysplasia was 61.25 times more expressed and in the tumor line cells (A549) it was 635.48 times more expressed ( $P < 0.001$ ). On the other hand, fibroblasts from human umbilical cord tissue showed a 2.58 times more expression than fibroblasts of control group and this difference was not significant.

### **Telomerase activity in fibroblasts and umbilical cord tissue**

The results of telomerase activity were expressed in Cycle Threshold (Ct) values (Graph 2). The lower the Ct values, higher telomerase activity. Among the samples analyzed, fibroblasts from normal skin, Taylor's cortical dysplasia and umbilical cord tissue presented similar Ct average values. However, the tumor cell line (A549) has shown a lower Ct value indicating that these samples have higher telomerase activity ( $P < 0.001$ ).

### **Overall analysis of telomerase activity and expression on fibroblasts and umbilical cord tissue**

The Table 1 summarizes the data obtained in the present study. It shows the differentiation capability of all three fibroblasts from the different origins, as well as hTERT expression and quantization and the telomerase activity.

---

---

## DISCUSSION

Many studies have demonstrated that several factors are related to cell proliferation and aging. Among the factors involved we can mention the enzyme telomerase, considering their ability to protect the chromosome ends that is directly related to genetic integrity and cellular senescence. This enzyme is active in a few cell types as the stem cells, and cancer cells, suggesting a close association between the ability of these cells to proliferate and growth (23). The enzyme activity of is not found in high levels in "adult" somatic cells, and its expression decays after the embryonic period, and it may disappear in terminally differentiated cells. Even in cells from umbilical cord which is a young tissue, the telomerase levels are low (24). In the present investigation, the enzyme expression was not detected in normal fibroblasts and fibroblast from patient with Taylor's cortical dysplasia cultures, neither fibroblast from the umbilical cord Wharton's jelly, confirming their mature differentiation stage. On the other hand, high levels of hTERT portion expression were detected in the tumor lung carcinoma A549 cells used in this study as expected by its malignant phenotype, feature confirmed by the detection of a 183 bp fragment corresponding to a gene segment of the catalytic portion (hTERT) of telomerase.

Adult cells such as fibroblasts from normal skin and from umbilical cord tissue are not common present high levels of hTERT expression, corroborating the results obtained in the present study (25). Moreover, the fibroblast culture from patient skin with Taylor's dysplasia has shown a significant increased levels of hTERT expression. In addition, the hTERT expression levels from tumor cell line A549 was extremely high. These data are consistent with the others data that described in the literature showing that cancer cells have high activity and high expression levels telomerase after the malignant transformation (25, 26).

The literature still lacks data on telomerase activity and hTERT expression in skin fibroblast from Taylor's cortical dysplasia, probably because there are not many studies investigating the molecular markers related with this pathology. However, it is known that in other types of dysplasia, the telomerase expression can be higher than normal as revealed by Yu and colleagues that shown telomerase activity in 21 of 47 samples from esophageal squamous dysplasia. The authors suggested that it can be explained by a constant renewal characteristic of this type pathology that will probably be a precursor of carcinogenic lesions (26).

---

---

Studies that analyzed the telomerase by TRAP detection assay (method based on amplification of telomeric repeats), showed that tumor cells line A549 have telomerase expression three times higher when compared to embryonic stem cells (27). Using the same technique, we were also able to prove that the tumor cell line A549 showed higher activity when compared to the other groups ( $p < 0.001$ ).

One of the criteria for mesenchymal stem cells characterization was established by the International Society for Cellular Therapy. The cells must have mesodermal differentiation capability (adipogenic, osteogenic and chondrogenic) (19). It has been demonstrated the mesodermal differentiation capacity of skin fibroblasts, which can give rise to tissues of distinct lineages such as bone and adipose tissue (28-30). In the present study, with the exception of tumor cell line, all other cell types differentiate into the osteogenic and adipogenic lineage.

Neural differentiation was induced in fibroblasts derived from the three types of tissue used in this study (normal fibroblasts, fibroblasts from patient with Taylor's cortical dysplasia and umbilical cord tissue), when cultured with specific media. The cultures of fibroblasts derived from normal patients and patients with dysplasia have not been able to differentiate into neuronal cells. However, cultures from umbilical cord tissue fibroblasts showed the neuronal structures as detected by Fluoropan Neuronal Marker staining (anti-neuronal nuclei (NeuN), anti-neuronal cytoskeleton (NFL), neuronal anti-microtubule (MAP2) and neuronal anti-microtubule ( $\beta$ -tubulin III to characterize the cytoarchitecture).

Marinowic and coworkers (2014) demonstrated the ability of neural differentiation, mesodermal differentiation and of pluripotency marker expression (Klf4) in NIH 3T3 fibroblasts when submitted to co-culture with mononuclear cells from umbilical cord blood. The authors suggest that these stem cells may give the support to the fibroblasts plasticity and subsequent differentiation ability after co-cultivation (31).

However, a controversial study realized by Shih *et al* (2005), differentiate hair scalp into neural lineage. It is noteworthy that the neural differentiation media employed by Shih group was not the same used on our study (32).

The neuronal differentiation displayed by fibroblasts derived from umbilical cord tissue can be explained by their undifferentiated origin, indicating that this cell type possesses the necessary plasticity, not only to generate mesodermal but also ectodermal lineage cells. This potential has been shown by previous studies,

---

indicating that cells derived from Wharton's jelly have a differentiation and plasticity features distinct from adult cells (33).

---

## CONCLUSION

Results of the study indicate that tumor cells have higher expression and activity levels of telomerase when compared to somatic cells derived from epithelial tissues and umbilical cord tissue. Indeed, the hTERT catalytic subunit of telomerase is more expressed in fibroblast from patient with Taylor's cortical dysplasia than in normal fibroblasts from skin or from umbilical cord tissue. Additionally, cells from umbilical cord tissue have higher plasticity and differentiation capacity than fibroblasts from human epithelial origin.

## REFERENCES

- Attia EA, Seada LS, El-Sayed MH, El-Shiemy SM. Study of telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in normal, aged, and photo-aged skin. *Int J Dermatol*. 2010 Aug;49(8):886-93.
- Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*. 1978 Mar 25;120(1):33-53.. Cong Y, Shay JW. Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell Res*. 2008 Jul;18(7):725-32.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998 Jan 16;279(5349):349-52.
- Boquest AC, Shahdadfar A, Brinchmann JE, Collas P. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue. *Methods Mol Biol*. 2006;325:35-46.
- Brabender J, Park J, Metzger R, Schneider PM, Lord RV, Holscher AH, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Ann Surg*. 2002 Mar;235(3):440-3.
- Broccoli D, Young JW, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9082-6.
- Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, et al. Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Malignant Transformation during Long-Term Culturing in Serum-Free Medium. *PLoS One*. 2014;9(6):e98565.
- Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Sep;66(3):407-25, table of contents.
- Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*. 1999 May;14(5):700-9.
- D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells
-



---

with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of Cell Science*. 2004 June 15, 2004;117(14):2971-81.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007 Apr;211(1):27-35.

Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 1985 Dec;43(2 Pt 1):405-13.

Huang HI, Chen SK, Ling QD, Chien CC, Liu HT, Chan SH. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tissue Eng Part A*. 2010 May;16(5):1491-501.

Jakupciak JP, Wang W, Barker PE, Srivastava S, Atha DH. Analytical validation of telomerase activity for cancer early detection: TRAP/PCR-CE and hTERT mRNA quantification assay for high-throughput screening of tumor cells. *J Mol Diagn*. 2004 Aug;6(3):157-65.

Ju. Telomeres and telomerase in cancer stem cells. 2006.

Kabat J, Krol P. Focal cortical dysplasia - review. *Pol J Radiol*. 2012 Apr;77(2):35-43.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994 Dec 23;266(5193):2011-5.

Kobayashi K, Kubota T, Aso T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of alpha-smooth muscle actin. *Early Hum Dev*. 1998 Jul 10;51(3):223-33.

Marinowic DR, Domingues MF, Machado DC, DaCosta JC. The expression of pluripotency genes and neuronal markers after neurodifferentiation in fibroblasts co-cultured with human umbilical cord blood mononuclear cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014 Aug 19.

Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21(1):50-60.

Palmini A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, et al. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*. 2004 Mar 23;62(6 Suppl 3):S2-8.

Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999 Mar 15;72(4):570-85.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):146-50.

---

Shih DT, Lee DC, Chen SC, Tsai RY, Huang CT, Tsai CC, et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*. 2005 Aug;23(7):1012-20.

Song S, Sanchez-Ramos J. Preparation of neural progenitors from bone marrow and umbilical cord blood. *Methods Mol Biol*. 2008;438:123-34.

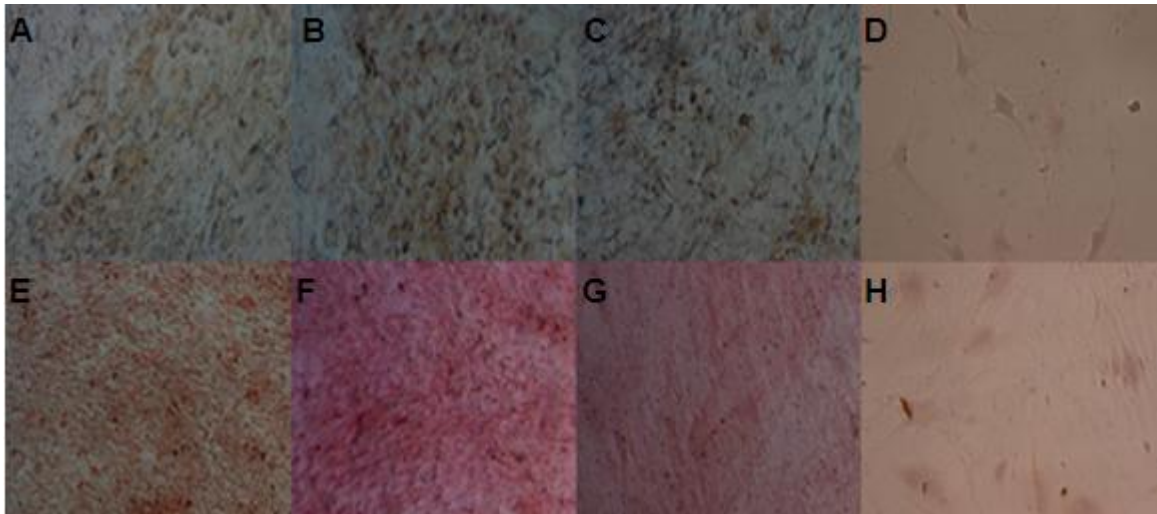
Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JA. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1971 Aug;34(4):369-87.

Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 2005 Jun-Jul;23(6):727-37.

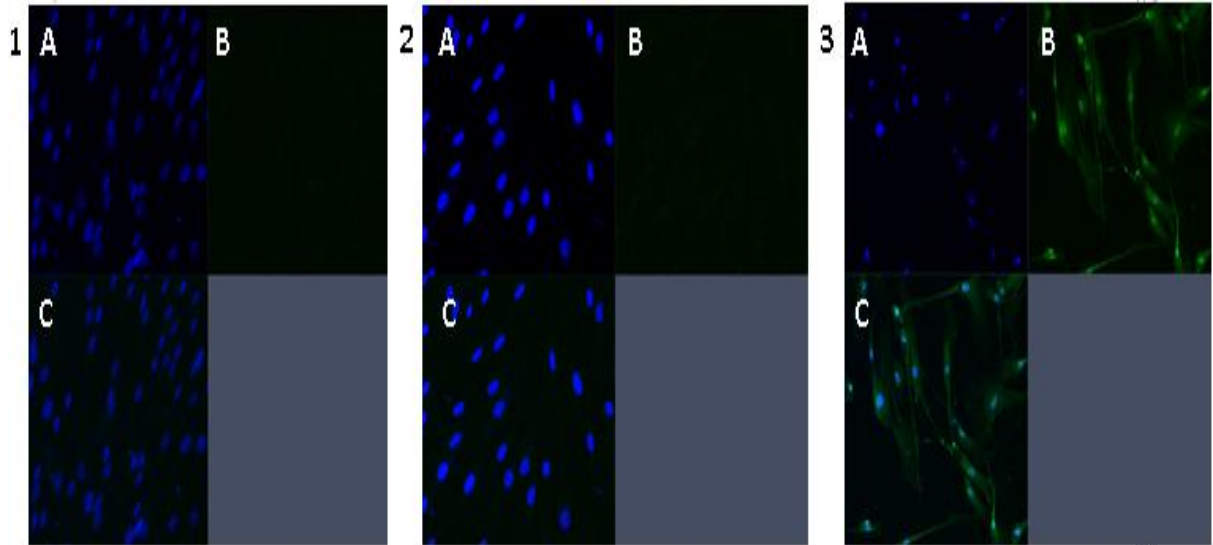
Urbach H, Scheffler B, Heinrichsmeier T, von Oertzen J, Kral T, Wellmer J, et al. Focal

---

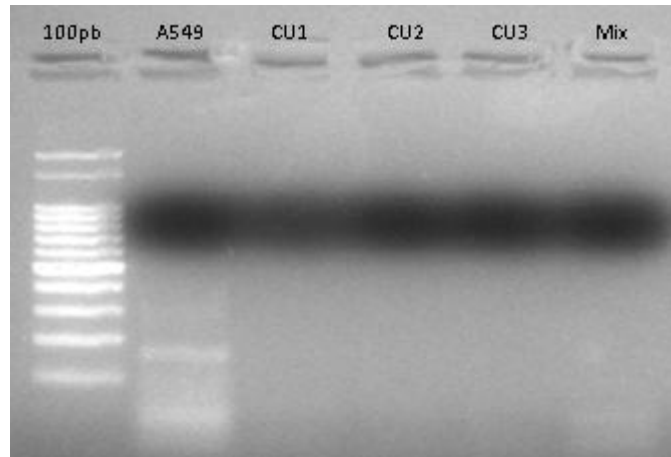
FIGURES, TABLES AND GRAPHS



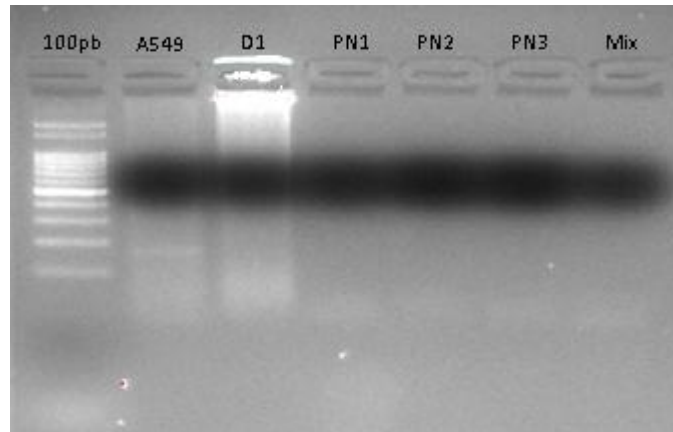
**Figure 1. Photomicrography of fibroblast cultures submitted to mesodermal differentiation.** Adipogenic differentiation of fibroblasts dysplasia group (A) normal fibroblasts (B) and fibroblasts from umbilical cord tissue (C). Osteogenic differentiation of fibroblasts dysplasia group (E) normal (F) and umbilical cord (G). Control terminally differentiated cells (NIH-3T3) cultured in adipogenic (D) and osteogenic (H) differentiation medium (100x).



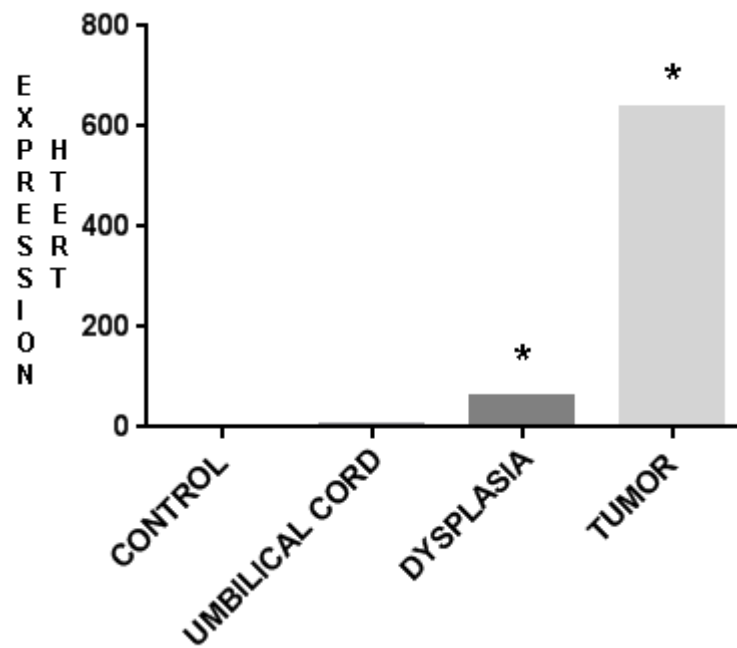
**Figure 2. Photomicrographs of immunofluorescence from human fibroblasts cultured with neural differentiation medium.** (1) skin fibroblasts from Taylor's dysplasia patient; (2) normal skin fibroblasts; (3) fibroblasts from human umbilical cord tissue. (A) Nuclear staining with DAPI; (b) staining of neuronal structure Fluoropan antibody and (c) overlap.



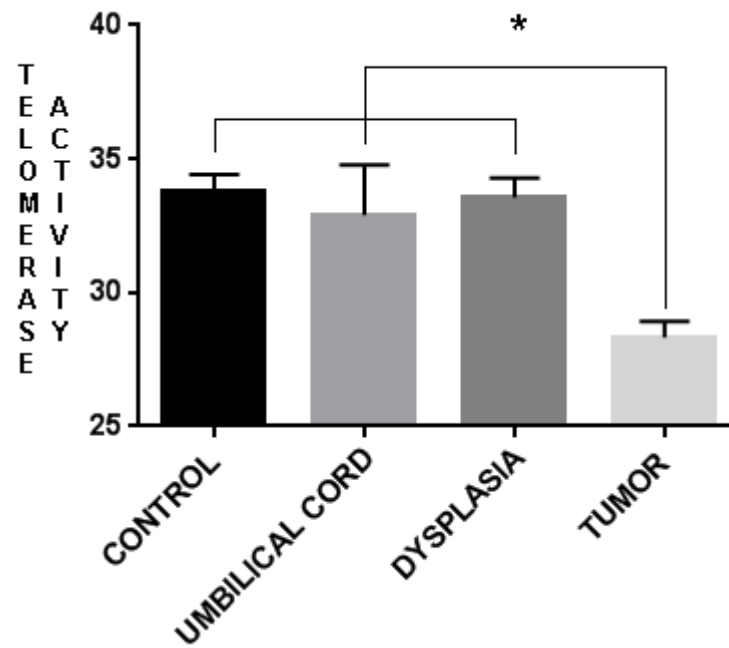
**Figure 3. Photography of hTERT segment gene amplification by PCR after electrophoresis in agarose gel 2%. 100 bp: molecular weight marker 100 bp; A549: human lung tumor cell line; CU1, CU2 and CU3: fibroblasts from umbilical cord tissue; Mix: PCR reaction mixture without DNA (negative).**



**Figure 4. Photography of hTERT segment gene amplification by PCR after electrophoresis in agarose gel 2%. 100 bp: molecular weight marker; A549: human lung tumor cell line; D1: skin fibroblast from Taylor's dysplasia patiente; PN1, PN2 and PN3: skin fibroblasts from normal patients; Mix: PCR reaction mixture without DNA (negative).**



**Graph 1. Bar graph depicting the hTERT portion of telomerase expression by cell types studied.** Control: normal skin fibroblasts; Umbilical cord: fibroblasts from umbilical cord tissue; Dysplasia: skin fibroblasts from Taylor's dysplasia patient; and tumor: human lung tumor cell line A549. \* (P < 0.001).



**Graph 2. Bar graph representing the Ct mean values of telomerase activity.** Control: normal skin fibroblasts; Umbilical cord: fibroblasts from umbilical cord tissue; Dysplasia: skin fibroblasts from Taylor's dysplasia patient; and tumor: human lung tumor cell line A549. \* ( $P < 0.001$ ).



**TABLE 1. Overview of differentiation and expression of hTERT, and telomerase activity from epithelial tissues, umbilical cord tissue and human lung tumor cell line cultures.**

GROUP	SAMPLE	DIFFERENTIATION			PCR		TA (Ct)
		A	O	N	PCR	RT(X)	
CONTROL	PN1	+	+	-	-	1	33,32
	PN2	+	+	-	-	1	33,93
	PN3	+	+	-	-	1	33,96
UMBILICAL CORD	CU1	+	+	+	-	1,19	33,20
	CU2	+	+	+	-	2,44	31,39
	CU3	+	+	+	-	4,10	34,07
DYSPLASIA	D1	+	+	-	-	61,25	33,56
TUMOR	A549	nd	nd	nd	+	635,48	28,32

Control= fibroblast of normal patients; Umbilical Cord= fibroblasts of umbilical cord tissue; Dysplasia= fibroblasts of dysplasia patient; Tumor= tumor cell line A549; A= adipogenic; O= osteogenic; N=neurogenic; PCR: convencional polymerase chain reaction; RT(X)= expression of hTERT portion of telomerase by PCR real time; TA(Ct)= telomerase activity by TRAP; (+)= positive; (-) = negative; nd= non determined.

Your submission entitled "TELOMERASE ACTIVITY ON FIBROBLASTS DERIVED FROM UMBILICAL CORD TISSUE, NORMAL SKIN TISSUE, AND SKIN TISSUE OF CORTICAL DYSPLASIA OF TAYLOR PATIENT" has been received by journal In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://ivan.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office

In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding). Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

---